

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AÇÃO DA GLUTAMINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E PROCESSO
INFLAMATÓRIO NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA GRAVE**

ELIZÂNGELA GONÇALVES SCHEMITT

Porto Alegre

2014

ELIZÂNGELA GONÇALVES SCHEMITT

**AÇÃO DA GLUTAMINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E PROCESSO
INFLAMATÓRIO NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA GRAVE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Orientadora: Prof. Dra. Norma P. Marroni

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Schemitt, Elizângela Gonçalves
AÇÃO DA GLUTAMINA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E
PROCESSO INFLAMATÓRIO NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA
GRAVE / Elizângela Gonçalves Schemitt. -- 2014.
87 f.

Orientadora: Norma Possa Marroni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. fígado. 2. hepatotoxicidade. 3. insuficiência
hepática aguda grave. 4. estresse oxidativo. 5.
glutamina. I. Possa Marroni, Norma, orient. II.
Título.

Com todo o meu amor, dedico este trabalho ao meu esposo Paulo, pelo apoio e companheirismo e aos meus filhos Alison e Amanda, minha melhor produção.

AGRADECIMENTOS

A beleza das pessoas está na capacidade de amar e de encontrar no próximo a continuidade do seu ser... É reconhecer que na vida estaremos sempre precisando de alguém e sempre terá alguém precisando de nós... Por isso, agradeço a todos que me ajudaram direta ou indiretamente durante esta trajetória.

À Profa. Dra. Norma Possa Marroni, minha querida orientadora, pelos ensinamentos científicos e de vida, por me apoiar e exigir na medida certa. Obrigada pelo carinho, atenção e dedicação. Para mim, é um privilégio fazer parte de seu seleto grupo.

Ao Dr. Cláudio Marroni, pela assessoria, orientação, sugestões e correções necessárias para finalização deste trabalho. Meu reconhecimento e carinho.

À Dra. Maria Isabel Morgan Martins, pelo auxílio e colaboração e aos demais professores colaboradores do grupo de pesquisa, meu agradecimento pelos ensinamentos e pela oportunidade de convivência e assim, crescimento profissional.

À Josieli Raskopf Colares, minha querida amiga, com quem sempre pude contar durante essa caminhada. Agradeço pelo carinho, pelo companheirismo, pelas conversas compartilhadas nos momentos de alegria e também nos momentos de angústias. Às amigas queridas Mariana Soares, Renata Minuzzo Hartmann e Francielli Licks, agradeço pelo carinho, pelos momentos de descontração e pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes da ULBRA, Tayná Mendes, Daiana Pereira, Silvia Bona, Andréa Janz Moreira, Adriane Dal Bosco e especialmente a Dra. Graziella Rodrigues, meu carinho e agradecimento pelos conhecimentos compartilhados e pela 'troca de ideias'.

Aos meus amigos, agradeço pelo carinho e compreensão! Em especial às minhas amadas amigas da "BFF". Mais uma etapa e vocês estiveram constantemente comigo. Agradeço pelo carinho, pela amizade e apoio!

Aos parentes distantes, que continuam sempre torcendo por mim: vovô, vovó, tios, tias, primos e primas... Obrigada, vocês são especiais! Saudades...

À minha família, amor incondicional... Meu maninho Suélio, minha cunhada Milene e minha sobrinha amada, Lavínya. Obrigada pelos momentos de descontração. Nossos encontros são regados com alegria e boa conversa. Eu amo vocês! À minha afilhada Karoline, minha companheira e amiga, obrigada por estar sempre comigo e acompanhar todos os meus passos. Ao meu pai Henrique pelo apoio e por sempre me ajudar no que for preciso... meu amor e minha gratidão... À minha mãe Elisabet, pelo exemplo de dedicação, não tenho como agradecer por todo o apoio, paciência e incentivo. Sem o seu carinho, amor e presença nada disso seria possível.

Ao meu esposo Paulo, meu agradecimento especial! Pelo carinho, pela compreensão, pelo amor, pelo companheirismo e pelo incentivo. Sempre a postos para auxiliar e realizar tudo aquilo que não pude fazer nos mais diversos momentos. Sem seu apoio fundamental, nada disso seria possível... Essa conquista, sem dúvida também é sua! Eu te amo!

Aos meus filhos, Alison e Amanda, agradeço simplesmente por existirem. Vocês são meu maior incentivo e minha melhor recompensa! Nada faria sentido sem vocês ao meu lado. Sempre buscarei melhorar por vocês e para vocês! Eu os amo infinitamente!

E por fim, agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente a equipe do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas pela oportunidade de realizar os estudos nesta conceituada instituição. Ao Centro de Pesquisas do HCPA, pela possibilidade de realização deste trabalho e ao FIPE pelo apoio financeiro sem o qual seria inviável concretizar esse projeto. Agradeço também à Universidade Luterana do Brasil e ainda a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

RESUMO

Introdução: A Insuficiência Hepática Aguda Grave (IHAG) é uma síndrome clínica rara, caracterizada por uma disfunção grave e súbita das células do fígado. A tioacetamida (TAA) é uma hepatotóxica, cuja administração em ratos causa a morte de células hepáticas por necrose centro lobular e promove o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). A glutamina é um aminoácido precursor para a síntese de glutatona. **Objetivo:** Avaliar o efeito antioxidante da glutamina em modelo experimental IHAG induzida por TAA em ratos. **Métodos:** Foram utilizados ratos machos Wistar, divididos em 4 grupos por tempo de avaliação: controle, glutamina (25 mg/kg), tioacetamida (400 mg/kg) e animais que receberam tioacetamida e glutamina. Os animais foram avaliados em 24, 36 e 48 horas. Foi coletado sangue para análises de AST, ALT, FA, BT e CRE e amostras de fígado para avaliar a lipoperoxidação (TBARS), a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GPx, CAT e GST), avaliação histológica e análise imuno-histoquímica de NF- κ B, TNF- α e iNOS. **Resultados:** Os níveis de TBARS e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e GST mostraram-se significativamente diminuídos nos animais dos grupos tratados com glutamina quando comparados com os animais dos grupos TAA. A atividade da CAT mostrou-se aumentada nos animais que receberam a glutamina em comparação aos animais dos grupos TAA. A atividade da GPx diminuiu significativamente nos grupos tratados com glutamina quando avaliada em 36 e 48 horas quando comparada com os animais dos grupos TAA, nestes tempos. O dano tecidual e a expressão de NF- κ B, TNF- α e iNOS foram significativamente menores nos animais tratados com glutamina. **Conclusão:** A tioacetamida causa alterações em alguns parâmetros bioquímicos, histológicos e no processo inflamatório, por sua vez a glutamina exerce ação protetora ao fígado dos danos gerados pela tioacetamida no modelo de IHAG.

Palavras-Chave: hepatotoxicidade, lipoperoxidação, radicais livres, antioxidantes, fígado.

ABSTRACT

Introduction: Severe acute liver failure (SALF) is a rare clinical syndrome characterized by severe and sudden dysfunction of liver cells. The administration of the hepatotoxin thioacetamide (TAA) in rats causes the death of liver cells by necrosis and lobular center promotes increased formation of reactive oxygen species (ROS). Glutamine is a precursor for the synthesis of glutathione amino acid.

Objective: To evaluate the antioxidant effect of glutamine in IHAG experimental model in rats induced by TAA. **Methods:** Male Wistar rats were divided into 4 groups by evaluation period: control, glutamine (25 mg / kg), thioacetamide (400 mg / kg) and animals that received thioacetamide and glutamine. Animals were evaluated at 24, 36 and 48 hours. Blood was collected for analysis of AST, ALT, ALP, BT and CRE and liver samples to assess lipid peroxidation (TBARS), the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, CAT and GST), histological and immunohistochemical analysis NF- κ B, iNOS and TNF- α . **Results:** The levels of TBARS and the activity of antioxidant enzymes SOD and GST were significantly decreased in animals in groups treated with glutamine compared with those for groups TAA. CAT activity was shown to be increased in animals receiving glutamine compared to groups TAA. The GPx activity decreased significantly in the groups treated with glutamine when evaluated at 36 and 48 hours compared with those for groups TAA in these times. The tissue damage and the expression of NF- κ B, iNOS and TNF- α were significantly lower in animals treated with glutamine. **Conclusion:** The thioacetamide causes changes in some biochemical, and histological parameters in the inflammatory process, in turn glutamine exerts protective of the liver damage caused by thioacetamide in IHAG model action.

Keywords: hepatotoxicity, lipid peroxidation, free radicals, antioxidants, liver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégia de busca em banco de dados	17
Figura 2: Esquema tridimensional da arquitetura do fígado normal.	19
Figura 3: Vias de biotransformação de xenobióticos.	26
Figura 4: Modelo proposto para lesão hepática induzida por drogas.....	27
Figura 5: Metabolismo da tioacetamida.....	28
Figura 6: Redução do oxigênio molecular com formação de RL.....	29
Figura 7: Etapas envolvidas na reação de lipoperoxidação.	31
Figura 8: Metabolismo do NO.....	32
Figura 9: Via clássica de ativação do NF- κ B.....	34
Figura 10: Ações das enzimas do sistema de defesa antioxidante.....	35
Figura 11: Conjugação de GSH com um xenobiótico genérico.....	36
Figura 12: Estrutura química da molécula de glutamina.	37
Figura 13: Marco teórico esquemático do estudo.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Causas de insuficiência hepática aguda grave.	21
Tabela 2: Exemplos de ervas que podem causar IHAG e suas aplicações.	22
Tabela 3: Fatores prognósticos na IHAG.	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µl	Microlitro
ALT	Alanina aminotransferase
AOX	Antioxidante
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BT	Bilirrubina total
CAT	Catalase
CRE	Creatinina
Cu⁺	Cobre
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EH	Encefalopatia hepática
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
GST	Glutaciona S-transferase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IF	Infiltrado inflamatório
IHAG	Insuficiência Hepática Aguda Grave
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
RNI	Relação normatizada internacional
Kg	Quilograma
LPO	Lipoperoxidação
mg	Miligrama
Ne	Necrose
NF-κB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
NO₂	Nitrito
NO₃	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂^{•-}	Ânion superóxido

OH•	Radical hidroxil
ONOO	Peroxinitrito
RL	Radical livre
SOD	Superóxido dismutase
TAA	Tioacetamida
TASO	Tioacetamida-S-óxido
TASO₂	Tioacetamida-S-dióxido
TBARS	Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES.....	16
2.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO FÍGADO	18
2.3 INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA GRAVE	19
2.3.1 Epidemiologia e Etiologia	20
2.3.2 Fisiopatologia	22
2.3.3 Manifestações clínicas e Diagnóstico.....	23
2.3.4 Prognóstico e Terapêutica.....	23
2.3.5 Modelos experimentais de IHAG	25
2.4 XENOBIÓTICOS	25
2.4.1 Tioacetamida.....	27
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ESTRESSE NITROSATIVO	28
2.5.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres.....	28
2.5.1 Óxido nítrico	31
2.7 PROCESSO INFLAMATÓRIO	33
2.8 ANTIOXIDANTES	34
2.8.1 Glutamina	37
3 MARCO TEÓRICO	39
4 JUSTIFICATIVA	41
5 OBJETIVOS	42
5.1 OBJETIVO GERAL	42
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7 ARTIGO	49
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
8.1 CONCLUSÕES	79
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	81
ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

O fígado exerce muitas funções vitais sendo essencial na regulação do metabolismo, na síntese de proteínas e de outras moléculas, no armazenamento de proteínas e de ferro, na degradação dos hormônios e na inativação e excreção de drogas e de toxinas (1).

Por desempenhar um papel importante no metabolismo de drogas, o fígado é suscetível a um elevado grau de toxicidade. A hepatotoxicidade implica lesão hepática causada por produtos químicos. Certas drogas quando administradas em doses terapêuticas e algumas em overdose podem lesar o fígado. O reconhecimento precoce da droga é fundamental para minimizar os efeitos da lesão. A incidência de doença do fígado induzida por drogas parece estar relacionada a um número crescente de novos agentes que foram introduzidos em uso clínico ao longo das últimas décadas. As drogas têm sido relatadas como sendo responsáveis por aproximadamente 10% dos casos de hepatite e menos do que 5% dos casos hospitalares com icterícia (2).

Devido à baixa incidência de doença hepática induzida por drogas, o potencial hepatotóxico de uma droga usualmente não é reconhecido durante os ensaios de pré-comercialização. Só se manifesta depois da droga ter sido comercializada e utilizada por muito mais pacientes do que os incluídos em ensaios clínicos (3, 4).

A hepatotoxicidade induzida por drogas é o mais comum evento adverso que interrompe o desenvolvimento de um novo medicamento ou leva à retirada de medicamentos autorizados do mercado. A identificação de novos fatores de risco e uma melhor compreensão dos mecanismos patogênicos certamente implicarão melhorias na assistência médica e na evolução farmacêutica no futuro próximo. Assim, a melhor compreensão dos mecanismos que contribuem para o dano hepático induzido por drogas pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (5).

Este estudo tem como objetivo avaliar as alterações hepáticas decorrentes do modelo de Insuficiência Hepática Aguda Grave (IHAG) e os efeitos do tratamento com a glutamina.

Esta dissertação está estruturada em seções. Após a introdução (seção 1) será apresentada a revisão da literatura (seção 2), em seguida, o marco conceitual (seção 3), a justificativa (seção 4), os objetivos do estudo (seção 5) e as referências bibliográficas (seção 6) utilizadas na seção 1 e 2.

Na sétima seção, será apresentado o artigo científico intitulado: “***Effect of glutamine on oxidative stress and inflammation in fulminant hepatic failure***”, submetido para publicação na revista **Toxicology and Applied Pharmacology**.

As considerações finais serão apresentadas na oitava seção.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório Experimental de Gastroenterologia e Hepatologia do Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes da Universidade Luterana do Brasil.

Contou com o auxílio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), processo número 12-0116, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR INFORMAÇÕES

Revisando a literatura, procuramos explorar os principais aspectos envolvidos na IHAG, relacionando o envolvimento do estresse oxidativo e os processos inflamatórios bem como o uso da glutamina como tratamento.

Foi realizada uma busca na literatura envolvendo as bases de dados: PubMed (MEDLINE) e Scielo (Figura 1). Foram consultados também, bancos de dissertações e teses de instituições nacionais e internacionais e livros-texto.

Os termos que aparecem ao longo da dissertação e que foram selecionados para busca são: *Severe acute liver failure (incluindo Fulminant hepatic failure), Thioacetamide, Oxidative stress, Inflammation, Liver, Antioxidants, e Glutamine.*

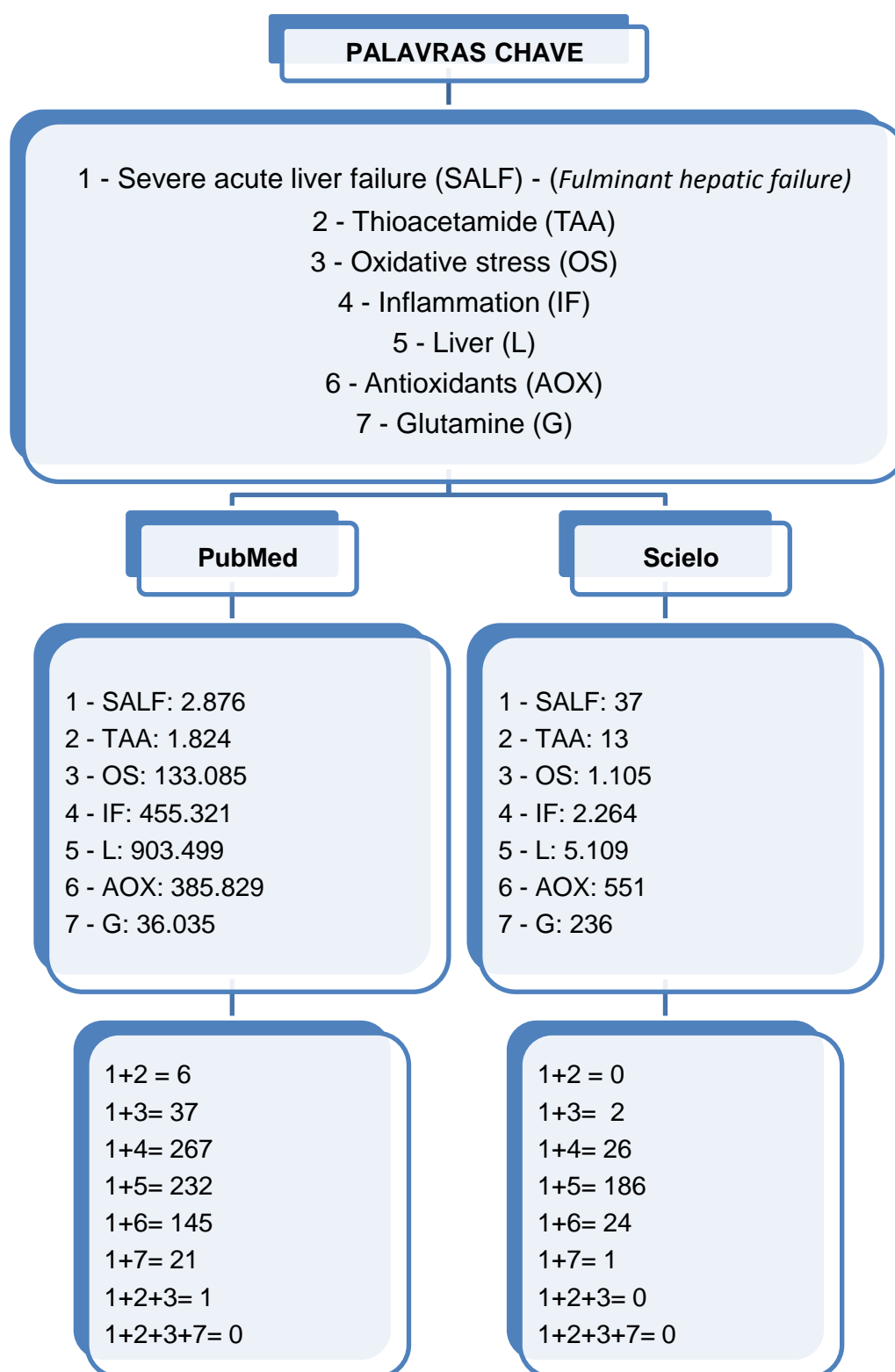


Figura 1: Estratégia de busca em banco de dados

Dentre os artigos encontrados, foi utilizado um total de 159 artigos divididos entre a revisão bibliográfica da dissertação e o artigo produzido.

2.2 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO FÍGADO

O fígado é o maior órgão interno do organismo, pesando em média 1.200 a 1.500 g e medindo 12 a 15 cm no plano coronal e 15 a 20 cm no plano transversal. Situa-se entre o quinto espaço intercostal e a margem costal direita. No adulto o fígado equivale de 1,8 a 3% do peso corporal total e na criança é relativamente maior, chegando a 5% do peso (6). Apresenta dois lobos (o direito com aproximadamente 6 vezes as dimensões do esquerdo) e 8 segmentos. Cada segmento possui suprimento sanguíneo e canais biliares independentes (7).

O fígado representa um órgão vital, pois desempenha funções essenciais no organismo, com atividades de síntese e de excreção (8). Para realizar as suas funções, o fígado possui uma estrutura complexa (Figura 2), constituído principalmente por células hepáticas (hepatócitos), que se anastomosam entre si, formando unidades morfológicas chamadas de lóbulos hepáticos (9).

Cada lóbulo hepático é uma unidade funcional básica do fígado que apresenta uma veia central onde é drenado o sangue aportado pela artéria hepática e a veia porta. Na sua periferia há um espaço porta contendo o ducto biliar, radícula da veia porta e ramo da artéria hepática (7). No lóbulo, os hepatócitos dispõem-se em placas orientadas radialmente a partir de uma veia central, entrelaçadas de forma ordenada por sinusóides hepáticos. Os sinusóides são a consequência da convergência dos ramos intra-hepáticos da artéria hepática e da veia porta. Existem grandes fenestrações nos sinusóides hepáticos, que são altamente permeáveis (6, 7). São formados por capilares compostos de dois tipos celulares: células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos e os macrófagos que no fígado são denominados como células de Kupffer (6).

As células de Kupffer são ativadas por muitos agentes, incluindo endotoxinas, sepse, choque, interferon- γ , ácido araquidônico e fator de necrose tumoral (TNF). Como resultado dessa ativação ocorre produção de: citocinas, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, TNF, interleucina (IL) 1, IL 6 e IL 10, interferon α e β , fator transformador de crescimento e vários prostanóides (6).

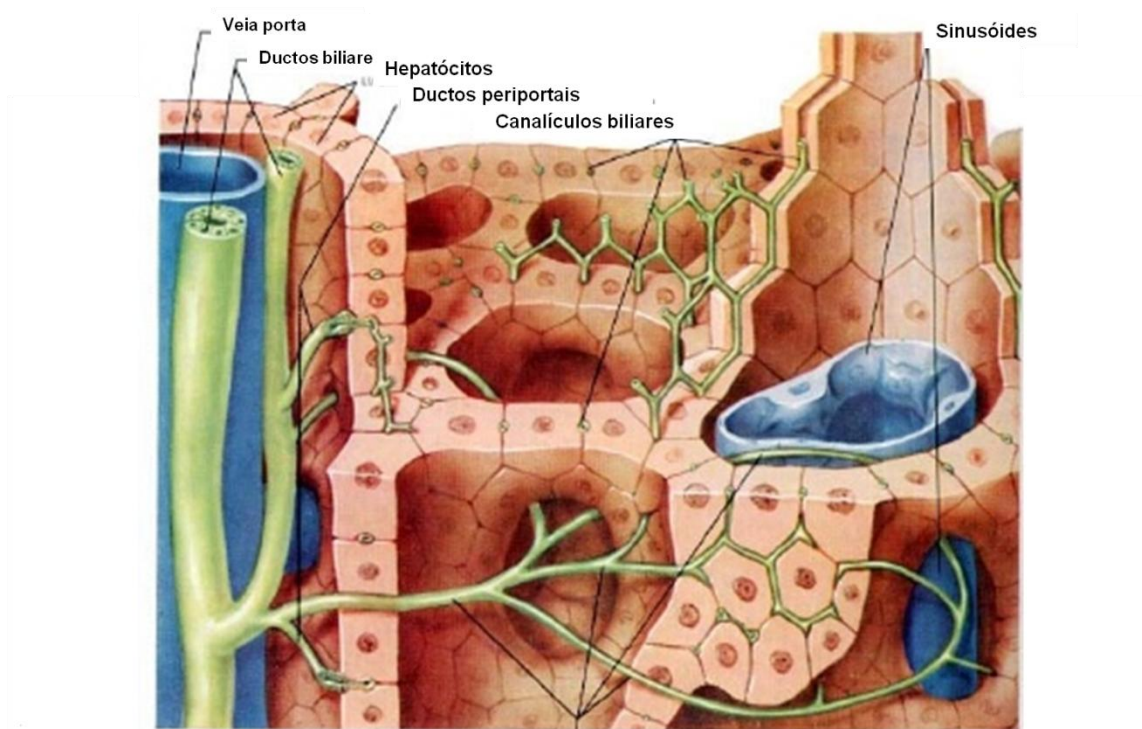


Figura 2: Esquema tridimensional da arquitetura do fígado normal. Fonte: modificado (7)

Dentre suas funções vitais e essenciais à manutenção da homeostasia corporal, o fígado destaca-se pelo seu papel imunológico, participa na síntese proteica e de outras moléculas é responsável pela regulação do metabolismo de diversos nutrientes, armazenamento de vitaminas e ferro, degradação hormonal e a inativação e excreção de drogas e toxinas (10).

2.3 INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA GRAVE

A Insuficiência Hepática Aguda Grave (IHAG) caracteriza-se pela súbita instalação entre pacientes com fígado previamente normal ou em alguns portadores de doença hepática crônica. Em geral, assume evolução rápida, levando à insuficiência hepatocelular, traduzida por profundos distúrbios metabólicos, suscetibilidade particular a infecções bacterianas ou fúngicas, falência de múltiplos

órgãos, coagulopatia e distúrbio do sistema nervoso central, traduzido por letargia, sonolência e coma (11).

A conceituação original foi feita por Lucke e Mallory (1946) (12), que definiram hepatite aguda fulminante “pelo aparecimento agudo de icterícia progressiva, redução volumétrica do fígado e coma hepático, com alargamento do tempo de protombrina (TP), hipertransaminasemia, além de aumentos nos valores sanguíneos de bilirrubina, nitrogênio e amônia”, com a falência hepática instalando-se em oito semanas desde o início do quadro clínico (11). Atualmente a definição mais bem aceita inclui a evidência de coagulopatia (com índice internacional de normalização [RNI] $\geq 1,5$) e de qualquer grau de encefalopatia hepática (13).

O tempo de instalação para definição da IHAG é variável, conforme diferentes autores. A maioria considera um intervalo inferior a oito semanas desde o aparecimento de icterícia até o aparecimento de encefalopatia em doentes sem doença hepática anterior ou inferior a duas semanas em paciente com doença hepática subjacente. Outros consideram um tempo inferior a 26 semanas para o aparecimento do quadro clínico (14). No entanto, pacientes com Hepatite Autoimune, Doença de Wilson, Hepatite B podem evoluir para IHAG, independentemente da presença de hepatopatia crônica (15).

A IHAG constitui um grande desafio para a medicina atual. Em vez de uma doença específica, é considerada uma síndrome com elevada mortalidade e morbidade, sendo de baixa prevalência, podendo ter múltiplas etiologias com diferentes prognósticos (13).

2.3.1 Epidemiologia e Etiologia

A hepatite viral é a causa mais comum de IHAG nos países em desenvolvimento, com incidência maior entre indivíduos expostos ao vírus em fase mais avançada da vida, ocorrendo em 0,2 a 4% destes doentes (11). E a lesão hepática induzida por fármacos predomina na Europa e na América do Norte. A incidência da IHAG não está bem definida, estimando-se cerca de 2.000 casos por ano nos Estados Unidos da América (EUA). A hepatotoxicidade por fármacos é responsável por mais de 50% da IHAG, incluindo a toxicidade por paracetamol em doses excessivas (40%) ou reação idiosincrática por fármacos (12%) (13, 14).

Apesar dos avanços significativos nas técnicas de diagnóstico, os casos de etiologia indeterminada (criptogênico), definidos por resultados sorológicos negativos e sem outras etiologias identificadas variam entre 15 e 44% (14).

A agressão aguda grave ao parênquima hepático pode ser de diferentes etiologias, tais como: doença hepática induzida por fármacos e toxinas (DILI), xenobióticos, hepatites virais, doenças hepáticas metabólicas, vasculares ou auto-imunes, entre outras causas(16). Determinar a etiologia é essencial (Tabela 1), uma vez que esta constitui o fator mais importante para a determinação do prognóstico (14).

Tabela 1: Causas de insuficiência hepática aguda grave.

Viral	
- Vírus de Hepatite A (VHA)	- Vírus de Epstein –Barr (EBV)
- Vírus de Hepatite B (VHB)	- Citomegalovírus (CMV)
- Vírus de Hepatite E (VHE)	- Vírus de <i>Herpes simplex</i> (HSV)
- Vírus de Hepatite D (VHD)	- Vírus de <i>Varicela zoster</i>
Fármacos/toxinas	
- acetaminofeno/paracetamol	- isoniazida
- ácido valpróico	- metildopa
- álcool	- ouro
- amiodarona	- rifampicina
- antidepressivos tricíclicos	- sulfonamidas
- anti inflamatórios não esteróides	- tetraciclina
- cetoconazol	- tetracloreto de carbono
- fenitoína	- <i>Amanita phalloides</i>
- halotano	- produtos de herva nária
- inibidores da monoamino-oxidase (MAO)	- suplementos dietéticos
Vascular	
- Trombose da veia porta	- Síndrome de Obstrução sinusoidal/Doença Veno-oclusiva
- Síndrome de Budd Chiari	- Hepatite isquêmica
Metabólica	
- Doença de Wilson	- HELLP (complicação grave da pré-eclâmpsia)
	- Síndrome de Reye
Outros	
- Infiltração maligna	- Hepatite auto-imune
- Sépsis	- Indeterminada

Fonte: (14)

Pode-se estabelecer a causa da IHAG em cerca de 60 a 80% dos casos, sendo a sua maioria por hepatotoxicidade a fármacos e diversas plantas utilizadas

em chás e homeopantias (Tabela 2). A Hepatotxicidade é a principal razão pela qual alguns medicamentos e ervas são retirados do mercado (13, 14, 16).

Tabela 2: Exemplos de ervas que podem causar IHAG e suas aplicações.

Nome popular	Função
Kava-Kava	Ansiedade
Escutelária	Ansiedade, rugas, protetor solar
Poejo	Arrepio, espasmos
Confrei	Asma, febre, acne, queimadura
Carvalho pequeno	Antipirético, antiséptico
Crista de galo ou erva de ferro	Asma, constipação, diurético
Licopódio	Cistite
Chaparral	Anti-reumático, anti-inflamatório

Fonte: Modificado (14)

2.3.2 Fisiopatologia

A IHAG ocorre quando a morte celular excede a capacidade de regeneração hepática. Apesar das múltiplas causas possíveis de morte celular, este processo segue normalmente dois padrões: necrose ou apoptose. A necrose envolve a depleção de adenosina trifosfato (ATP), que resulta em tumescência e lise celular, com liberação do conteúdo celular e inflamação secundária. A apoptose representa uma morte celular programada, dependente de ATP, e leva à reabsorção do citoplasma e núcleo, minimizando a resposta inflamatória (13).

A capacidade de metabolização de substâncias endógenas, como hormônios, bilirrubinas, vitaminas e mesmo medicamentos, encontra-se depletada, necessitando de extrema precaução na prescrição de fármacos para estes pacientes, principalmente àqueles dependentes de passagem e metabolização hepática ou potencialmente hepatotóxicos (16).

As alterações no metabolismo de hidratos de carbono manifestam-se pela hipoglicemia. Proteínas de meia-vida curta como as alfa-1 e alfa-2 globulinas diminuem rapidamente. Diversos fatores da coagulação sanguínea, sintetizados no fígado e de meia-vida curta, também estão diminuídos na IHAG, como o fator V,

alterando a atividade da protombriina. O mau funcionamento das células de Kupffer na IHAG permite o livre trânsito de micro-organismos e endotoxinas provenientes do intestino, que alcançam a circulação sanguínea, piorando as funções metabólicas e favorecendo a instalação de infecções e a liberação de citocinas com graves consequências circulatórias, agravando ainda mais a doença (16, 17)

2.3.3 Manifestações clínicas e Diagnóstico

Os primeiros sintomas da IHAG não são específicos – náusea, mal-estar, fadiga. O sintoma mais expressivo é a encefalopatia hepática (EH), que pode aparecer antes ou depois da icterícia. Em concomitância com o desenvolvimento de alterações neuropsíquicas próprias da EH, é comum a instalação de infecções, sépsis, má nutrição, hemorragias alterações hemodinâmicas, insuficiência renal, coagulopatia, insuficiência respiratória, alterações metabólicas, sendo possível caracterizar a síndrome de falência múltipla de órgãos. Além desses dados inespecíficos, o surgimento de edema cerebral é único na IHAG, sendo causa frequente do aumento de mortalidade (13, 15, 16).

O diagnóstico consiste na análise da história clínica e na realização de exames laboratoriais, bioquímicos, enzimáticos, hematológicos, que auxiliarão na avaliação das condições orgânicas e das eventuais complicações, e exames especializados, virais, toxicológicos, de imagens ou anatomo-patológicos, que possibilitarão o possível diagnóstico etiológico (13, 16).

2.3.4 Prognóstico e Terapêutica

Os fatores prognósticos da IHAG podem ser estáticos ou dinâmicos. Têm sido considerados como fatores prognósticos estáticos a idade do paciente e a etiologia da doença, sendo que tanto a hepatite A como aquela causada pela intoxicação com paracetamol são consideradas de melhor prognóstico, com taxas de mortalidade ao redor de 50%. Já os casos de etiologia provavelmente viral, classificados como não sendo do tipo A ou E, bem como outros medicamentos, costumam ter pior prognóstico (Tabela 3) (16).

Tabela 3: Fatores prognósticos na IHAG.

		Mau prognóstico
Fatores estáticos	Idade	< 10 ou > 40anos
	Etiologia	Hepatites (exceto tipo A)
		Drogas (exceto Paracetamol)
Fatores dinâmicos	Nível de bilirrubinas	> 18 mg/dL
	T. de protombrina	> 100 segundos
	Fator V	> 20%
	Grau de Encefalopatia Hepática	Grau IV
	Necrose hepatocelular	extensa
	Complicações	presentes

Fonte: adaptada (16)

A abordagem terapêutica inclui o tratamento da etiologia responsável pela IHAG e das suas complicações sistêmicas. Inicialmente, devem ser efetuadas medidas intensivas de suporte, com correção das alterações hemodinâmicas, da coagulação ou do equilíbrio hidro-eletrolítico, até se determinar a etiologia exata. É também necessário manter uma vigilância de possíveis infecções e manutenção da nutrição (14).

Apesar da significativa melhoria na terapia de cuidados intensivos, a IHAG apresenta elevada mortalidade, podendo chegar a mais de 80% dos casos. Em muitos pacientes, a insuficiência hepática é reversível, e terapias rápidas de suporte ao fígado podem ajudar na regeneração hepática, e os pacientes que sobrevivem podem recuperar totalmente a função do fígado e ter uma expectativa de vida normal (18). No entanto, existem muitos pacientes em que o único método capaz de salvar a sua vida é o transplante de fígado. Porém, sua aplicação clínica em grande escala é limitada pela falta de disponibilidade de doadores de órgãos (19).

Sendo assim, as atenções têm sido focadas na possibilidade de restaurar a massa e a função hepática através de terapias diversas, na tentativa de retardar ou impedir a progressão da doença (2, 16).

2.3.5 Modelos experimentais de IHAG

A pesquisa em modelos experimentais de IHAG tem uma função extremamente importante para o estudo da patogênese dessa doença. A eficácia dos modelos experimentais de insuficiência hepática pode auxiliar na avaliação da fisiopatogenia, no aspecto molecular e no uso de drogas indutoras da doença (5, 20, 21).

Os modelos animais de IHAG podem ser classificados em três categorias: cirúrgicos, químicos e modelos cirúrgico e químico combinados. Os modelos químicos (drogas hepatotóxicas) são amplamente utilizados no desenvolvimento de IHAG experimental. As drogas mais comumente utilizadas são paracetamol, galactosamina, tetracloreto de carbono, tioacetamida, entre outras (21).

Em estudo clássico, onde foram avaliadas as exigências de um modelo animal ideal de IHAG, os autores sugeriram critérios que um modelo deve satisfazer: reversibilidade, reprodutibilidade, morte decorrente da falência hepática, janela terapêutica, utilização de animais que possibilitem a utilização de terapias aplicáveis ao ser humano e a droga utilizada deve apresentar riscos mínimos para o pessoal envolvido no experimento (20).

2.4 XENOBIÓTICOS

Os seres vivos estão continuamente expostos a compostos químicos naturais e/ou não naturais, a eles estranhos. Estes compostos são denominados xenobióticos e podem interagir de maneira deletéria ao organismo (22).

A detoxificação enzimática de xenobióticos pode ser classificada em duas fases distintas. As enzimas de fase I, ou enzimas de ativação, representadas pela superfamília do citocromo P450, ativam o xenobiótico, tornando-o mais eletrofílico e desta forma mais reativo, normalmente com a introdução de um grupo funcional. Já as enzimas de fase II, ou de detoxificação, normalmente atuam com a conjugação dos metabólitos com um substrato endógeno, por enzimas transferases. Essa fase do metabolismo de xenobióticos compreende um importante passo para a

eliminação do xenobiótico do meio celular, podendo em alguns casos envolver a participação de transportadores. É o caso, por exemplo, dos transportadores dos conjugados de glutatona/xenobióticos. A seguir, estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e então excretados, impedindo seu acúmulo e, conseqüentemente, o surgimento de danos nas biomembranas e no material genético. (Figura 3) (22-26).

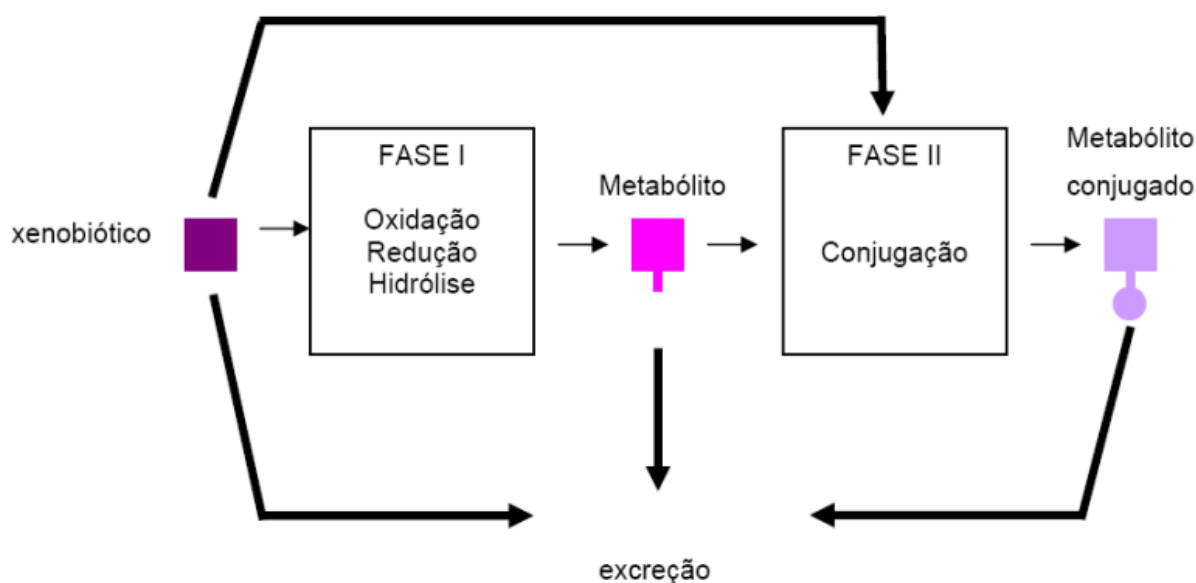


Figura 3: Vias de biotransformação de xenobióticos. Fonte: modificado (24).

No entanto, quando os produtos formados na fase I não sofrem inativação ou são ativados a substâncias mais reativas pelas enzimas da fase 2, estes intermediários reativos podem se ligar covalentemente a macromoléculas e causar diversas formas de dano ao organismo, pois poderão agir como agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos (Figura 4) (25, 27). Os substratos (eletrofílicos) mais comuns das glutatona transferases incluem: haletos de alquila, epóxidos, compostos α,β -insaturados (como quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila, nitro aromáticos, dimetilnitrosamina e tioacetamida (23).

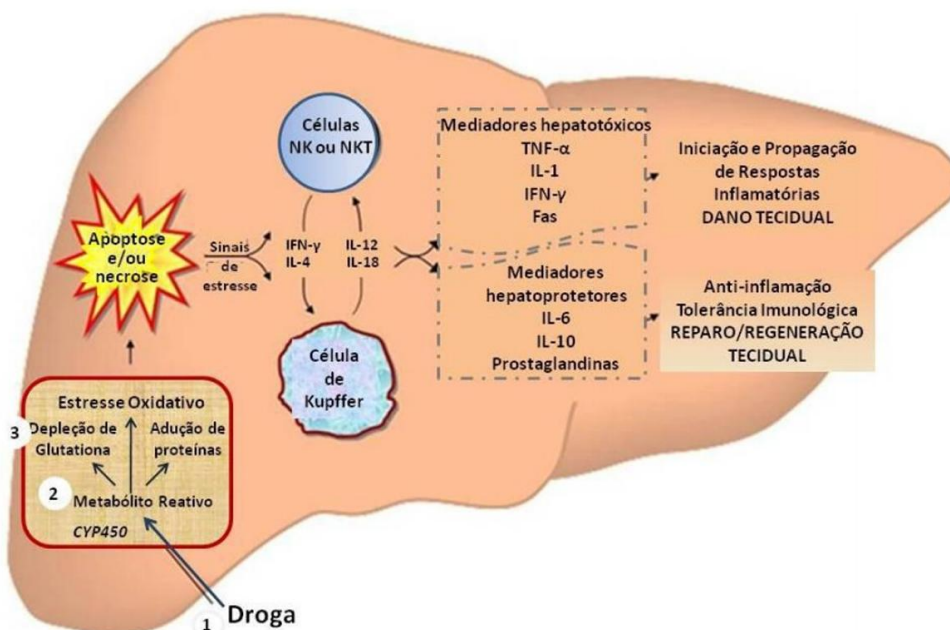


Figura 4: Modelo proposto para lesão hepática induzida por drogas. Fonte: (5)

2.4.1 Tioacetamida

A tioacetamida (TAA), C_2H_5NS , é um composto organo-sulfuroso obtido a partir da reação de acetamida com pentassulfeto de fósforo. É uma substância sólida, cristalina, incolor e hidrossolúvel. A TAA é fonte de ácido sulfídrico na síntese de compostos orgânicos e inorgânicos, utilizada nas indústrias de couro, papel e têxtil. É empregada como acelerador na vulcanização de borracha e estabilizador de combustíveis (28, 29). Outro uso conhecido da TAA era como fungicida nas lavouras de cítricos, no entanto, estudos demonstraram seus efeitos hepatotóxicos, cuja administração crônica levava à cirrose e à carcinoma hepatocelular (5, 29).

A TAA requer ativação metabólica para que seu efeito seja tóxico. Essa bioativação ocorre através do complexo microsomal citocromo P-450 que é um sistema enzimático formado por diversas enzimas, dentre as quais a CYP2E1 parece ser a mais implicada no metabolismo da TAA (30, 31). Após a administração, a TAA é rapidamente convertida em acetamida e tioacetamida-S-óxido (TASO) que é metabolizada, posteriormente, à tioacetamida-S-dióxido ($TASO_2$). O efeito citotóxico da droga é atribuído ao último metabólito, um composto instável,

altamente reativo, que se liga covalentemente a macromoléculas das células do fígado (29, 31, 32). Este composto é responsável por causar o dano hepático induzido pela TAA uma vez que é capaz de formar espécies reativas de oxigênio (ERO) e necrose (Figura 5) (5, 33).

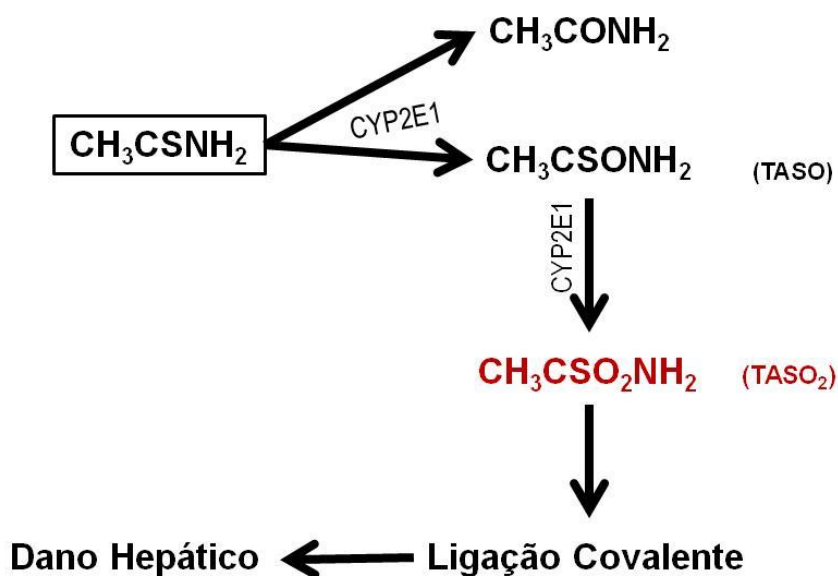


Figura 5: Metabolismo da tioacetamida. Fonte: modificado (34)

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ESTRESSE NITROSATIVO

2.5.1 Espécies Reativas de Oxigênio e Radicais Livres

No processo de oxidação do oxigênio (O_2), 95 a 98% recebem quatro elétrons de uma vez, formando ATP, liberando água e gás carbônico. Porém em 2 a 5% da redução monoelétrica o O_2 tem forte tendência em receber apenas um elétron de cada vez, formando durante as reações uma série de intermediários tóxicos e reativos, as ERO (Figura 6) (35). Essas espécies são geradas em todos os organismos aeróbicos, em condições metabólicas normais. Ocorre também a formação destes compostos em situações particulares, como pela exposição à radiação, produtos de células fagocitárias ativadas e drogas (36).

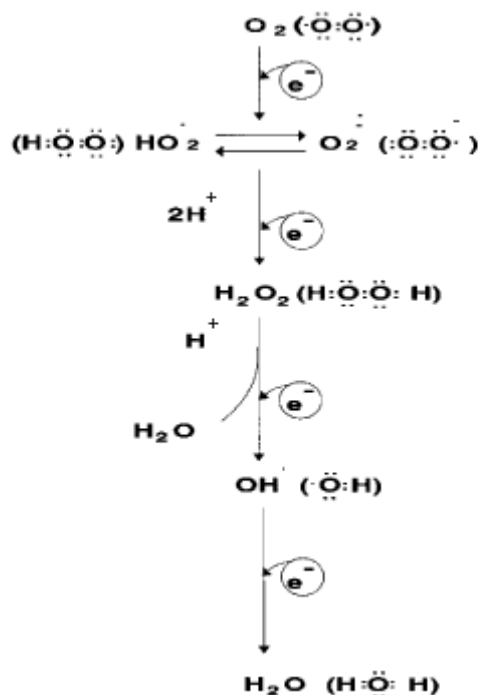
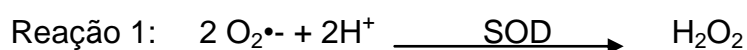


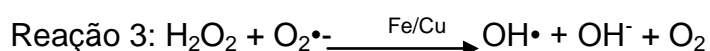
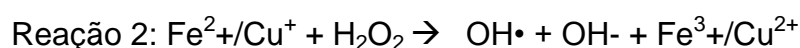
Figura 6: Redução do oxigênio molecular com formação de RL. Fonte: adaptado (37)

Os intermediários da redução monovalente do O_2 são o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). Dentre estes intermediários, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} são chamados de Radicais Livres (RL). Essas moléculas são geradas em condições fisiológicas ou patológicas e são danosas quando produzidas em excesso. O H_2O_2 não é um radical livre; no entanto, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido. Outra espécie reativa de interesse é o oxigênio *singlet*, uma forma de oxigênio spin-alterada (35, 37, 38).

A adição de um elétron a uma molécula de O_2 no estado fundamental gera a formação do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$. Ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma H_2O_2 através do processo chamado dismutação. Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) que é encontrada em quantidades elevadas nas células de mamíferos e que acelera a reação de 10^4 vezes a frequência para dismutação espontânea num pH fisiológico (reação 1) (37).



O H_2O_2 é uma molécula estável, e não é essencialmente tóxica para as células, mas com a adição de um elétron forma o $\text{OH}\cdot$ que pode ser formado através de duas reações: Fenton quando reage com íons ferro ou cobre (reação 2), e Haber-Weiss quando reage com íons de metais de transição (reação 3)(35, 37).



O $\text{OH}\cdot$ é o mais reativo, mais lesivo e, portanto, o RL mais instável que reage com uma grande variedade de compostos orgânicos. Apresenta meia-vida extremamente curta, não se distancia do seu sítio de formação, é altamente fugaz e apresenta-se em baixas concentrações nos tecidos (35, 39).

RL é definido como “qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo”(40). Por serem muito reativas, assim que se formam, essas moléculas reagem principalmente com os lipídios de membrana ocasionando o fenômeno denominado lipoperoxidação (LPO) (35).

Em decorrência da LPO, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (41). A LPO também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (42). Assim como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (43). No entanto, o excesso de tais produtos pode ser lesivo. A LPO é uma reação que ocorre em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação (Figura 7) (35, 36).

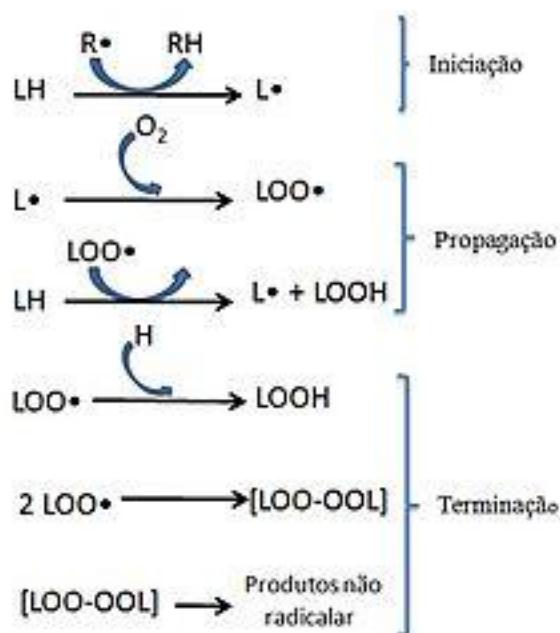


Figura 7: Etapas envolvidas na reação de lipoperoxidação. Fonte: modificado (35)

Na iniciação, o RL, geralmente o $OH\cdot$, ataca uma molécula orgânica, abstraindo um átomo de hidrogênio de um grupamento químico (metileno pertencente a um ácido graxo poli-insaturado da membrana), promovendo um rearranjo molecular. Na propagação os radicais formados são capazes de abstrair hidrogênio de outra molécula lipídica, formando um hidroperóxido. Na etapa de terminação, dois radicais formam um tetróxido instável que se decompõe originando o oxigênio singlet e carbonilas excitadas que retornam ao seu estado fundamental emitindo luz visível (35, 36, 44).

Em circunstâncias nas quais a produção de RL está muito acima da capacidade dos sistemas de defesa antioxidante do organismo removê-los ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes estabelecendo, assim um quadro de estresse oxidativo (EO) (37).

2.5.1 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula inorgânica que participa de muitos processos fisiológicos e patológicos, sendo um sinalizador ou fator de relaxamento derivado do endotélio. O NO pode ser dividido de acordo com o mecanismo de ação

da molécula com sua célula-alvo. Esse mecanismo pode ocorrer de duas formas: quando interage diretamente com a molécula do sistema-alvo e quando existem intermediários que podem reagir com o NO, podendo levar à formação de espécies ativas de nitrogênio, como o peroxinitrito (ONOO^-) (45, 46).

O NO é sintetizado em diferentes tecidos por meio da conversão da L-arginina em L-citrulina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Podem ocorrer formas constitutivas que são responsáveis pela produção de óxido nítrico neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), que são essenciais para a integridade vascular, neurotransmissão, nos processos de defesa do organismo e na manutenção de tecidos (45, 47). Além disso, existe a forma induzível (iNOS), gerada por macrófagos e outras células ativadas por citocinas. Cada uma das formas possui capacidade de gerar NO por meio de mecanismos regulatórios complementares e distintos (48). A principal via metabólica do NO envolve sua oxidação rápida a óxidos de nitrogênio superiores: nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (Figura 8) (45).

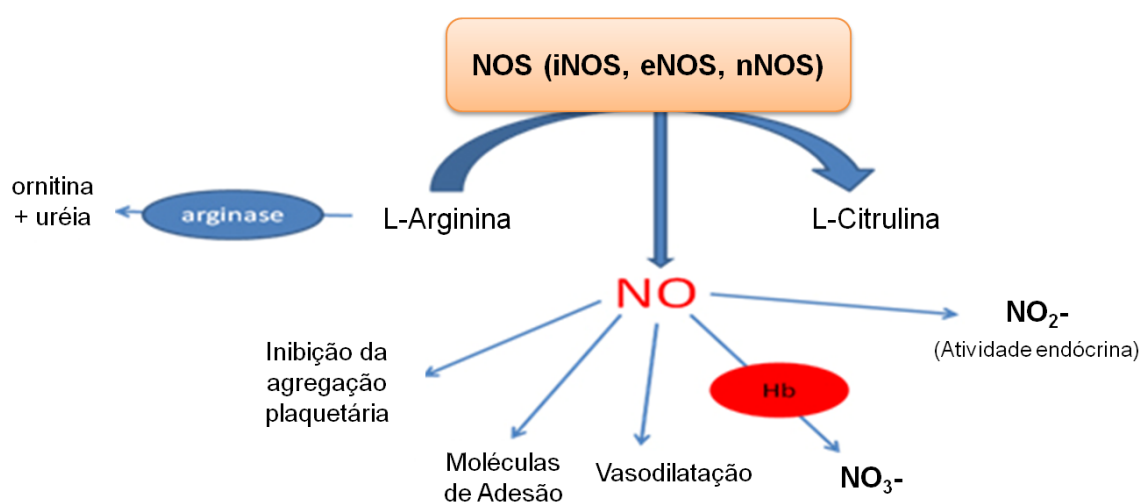


Figura 8: Metabolismo do NO. Fonte: modificado (45)

A produção descontrolada de NO pode levar a uma resposta maciça tóxica, implicada em uma série de processos destrutivos teciduais na inflamação aguda ou crônica. Além disso, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode reagir diretamente com o NO gerando peroxinitrito. Este pode levar à formação de um oxidante bastante lesivo (peroxinitrito), com características semelhantes ao radical hidroxil (reação 4) (37).



Atualmente, estudos sugerem que o metabolismo oxidativo anormal pode ter uma grande importância na fisiopatologia de diversas doenças. Os efeitos prejudiciais decorrentes do EO podem ser pouco expressivos ou muito agressivos, incluindo peroxidação dos lipídios de membrana dano às biomoléculas, agressão às proteínas dos tecidos e membranas, às enzimas, carboidratos e dano ao ácido desorribonucléico (DNA) como interrupção do sinal de transdução e mutação podendo levar à morte celular (49).

Tanto as ERO quanto as espécies reativas de nitrogênio e outros Radicais Livres são intermediários críticos na fisiologia e fisiopatologia dos hepatócitos (45).

2.7 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A perda de hepatócitos, característica da IHAG, leva a uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica com falência multiorgânica e posteriormente morte do indivíduo. A resposta inflamatória está envolvida na vasodilatação, no estresse oxidativo e nitrosativo, que potencialmente reforça os efeitos citotóxicos e agrava a crise metabólica (13).

No fígado normal, a expressão de mediadores inflamatórios é baixa, estando, contudo, aumentada nos hepatócitos, colangiócitos, epitélio sinusoidal e células inflamatórias em várias doenças agudas e crônicas hepáticas, incluindo a IHAG. Dentre esses mediadores, o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) parece ser particularmente importante por levar à ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) (13, 44).

As moléculas NF- κ B são reguladoras gênicas envolvidos na maioria das respostas inflamatórias. Estas respostas fazem parte das reações à infecção ou à lesão e ajudam a proteger as células desses estresses (50). O NF- κ B pode ser ativado por uma variedade de sinais resultantes de fisiopatologia inflamatória. Esses estímulos podem ser intracelulares e/ou extracelulares, como: produtos bacterianos

(endotoxinas, peptidoglicanos), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas (TNF- α , interleucinas) e radicais livres (51, 52).

Dessa forma, o NF- κ B regula a expressão de agentes envolvidos em um grande número de processos celulares, como nas respostas inflamatórias e imunológicas, aumentando a taxa de transcrição de genes. A ativação do complexo NF- κ B, na presença de injúria, contribui com maior expressão gênica dos mediadores pró-inflamatórios (citocinas, enzimas, receptores imunológicos e moléculas de adesão) além de iniciar a transcrição de citocinas como TNF- α , IL-1b, IL-2 e IL-6 (Figura 9) (51, 53).

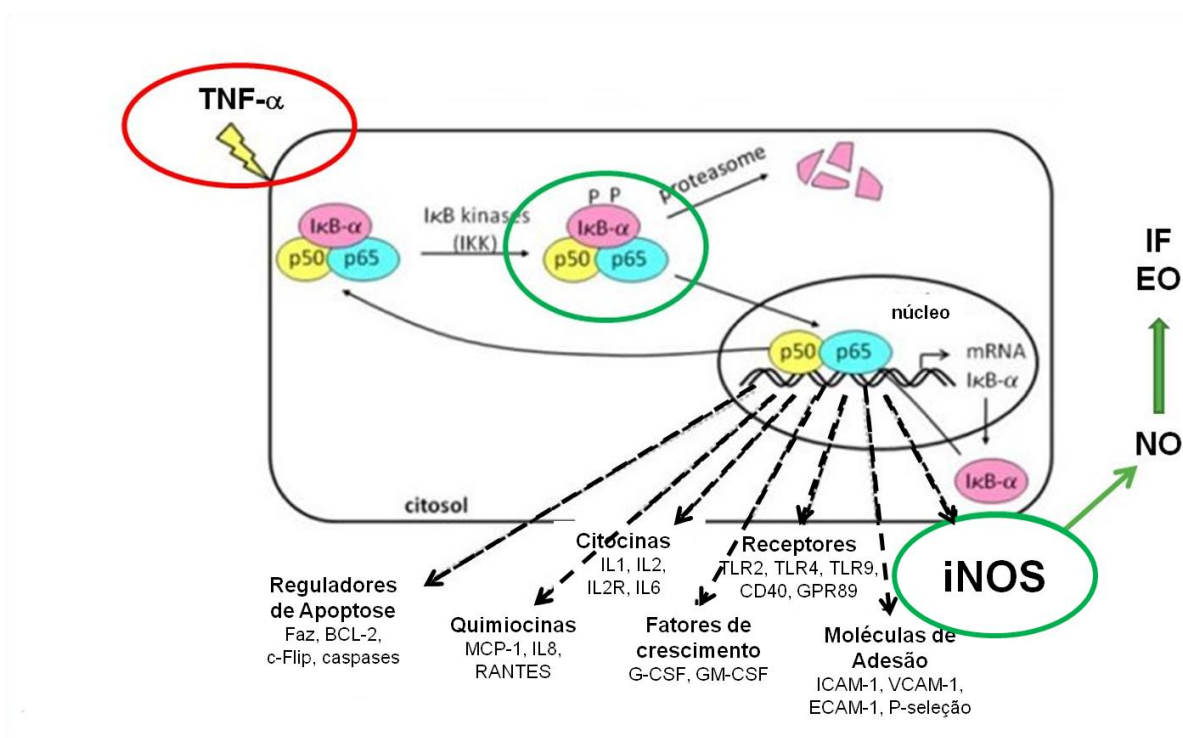


Figura 9: Via clássica de ativação do NF- κ B. Fonte: modificado (51)

2.8 ANTIOXIDANTES

O desequilíbrio no estado redox tem efeito potencialmente deletério sobre a biologia celular. Por isso, existem vários mecanismos antioxidantes envolvidos na

proteção das células e dos organismos por um eventual dano causado por quantidades excessivas dos mediadores altamente reativos (35). Antioxidante (AOX) é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato enzimático ou não enzimático (54).

As ERO produzidas pelo metabolismo celular são mantidas em baixas concentrações intracelulares pela ação do sistema de defesa antioxidante enzimático que inclui as enzimas: superóxido dismutase (SOD), enzima inativadora do ânion superóxido, glutathiona peroxidase (GPx), que é inativadora dos peróxidos lipídicos e do peróxido de hidrogênio e catalase (CAT), também inativadora do peróxido de hidrogênio. Estas enzimas trabalham com intensa cooperação entre si (Figura 10) (35, 36). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as ERRO (55).

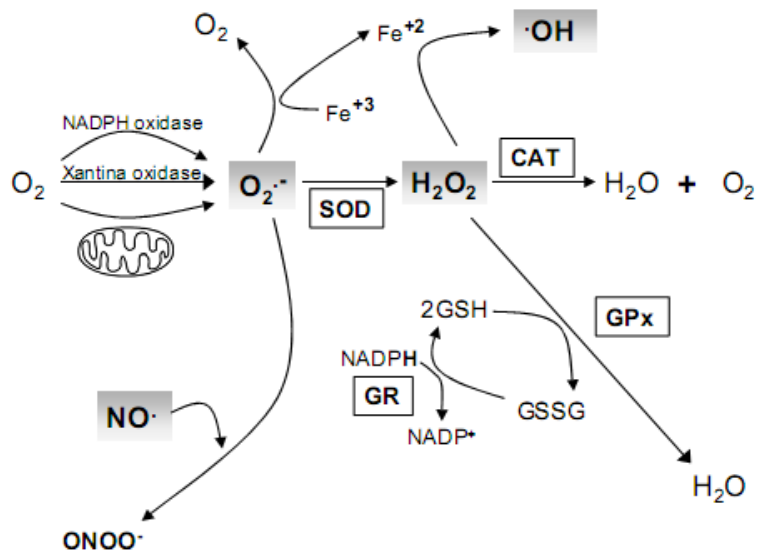


Figura 10: Ações das enzimas do sistema de defesa antioxidante. Fonte: (39)

As células apresentam ainda outras enzimas importantes para a ação antioxidante, como a família das glutathionas S-transferases (GSTs). As GSTs demonstram uma capacidade peroxidase contra os hidroperóxidos orgânicos e também estão associadas à biotransformação de herbicidas, inseticidas e xenobióticos. Estas enzimas catalisam a reação de conjugação da glutathiona em sua

forma reduzida (GSH) a estes compostos, aumentando a sua solubilidade e, assim, facilitando a sua excreção (Figura 11) (25, 26, 39, 43).

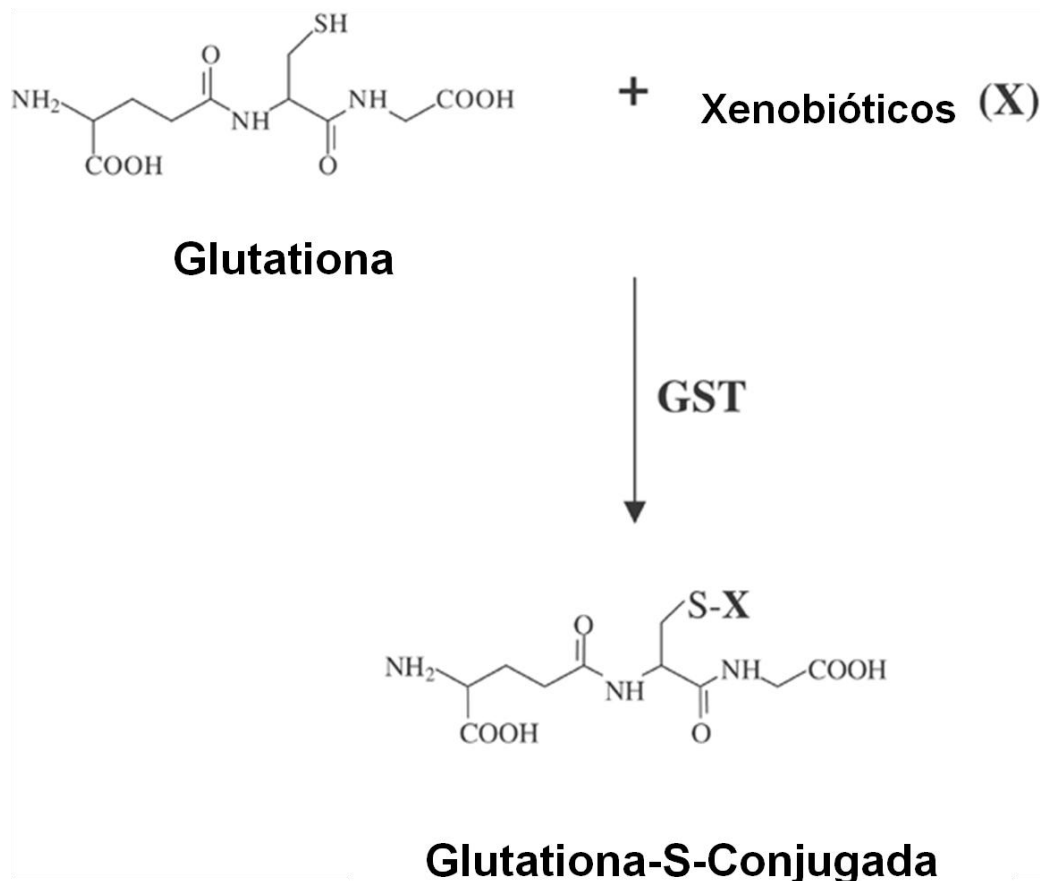


Figura 11: Conjugação de GSH com um xenobiótico genérico. Fonte: modificado (25)

Dessa forma o sistema de defesa primário constitui-se por substâncias que impedem a geração de ERO, ou sequestram-nas de forma a impedir sua interação com alvos celulares (39).

Já o sistema antioxidante não enzimático inclui compostos sintetizados pelo organismo humano como bilirrubina, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina, coenzima Q, ácido úrico, e outros, ingeridos através da dieta regular ou via suplementação como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonóides), além da glutathione e da glutamina (37).

2.8.1 Glutamina

A glutamina (Figura 12) é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no corpo, tornando-se um importante combustível e precursor metabólico para as células imunes (52, 56, 57). Em humanos, representa cerca de 20% do total de aminoácidos livres no plasma. Não era considerado um aminoácido essencial porque é sintetizado pelo organismo. Contudo em algumas condições como trauma, septicemia e câncer e, eventualmente, no esforço físico extremo, a concentração intracelular e do plasma desse aminoácido diminui em até 50%. Assim, quando a demanda é maior que a produção estabelece-se um quadro de deficiência de glutamina e, por esta razão, este aminoácido foi recentemente reclassificado como essencial (57-59).

A glutamina atua como substrato energético para a maioria das células e também é um importante precursor para nucleotídeos, glutamato e, em particular, para a síntese de glutathione (58, 60). Está presente em diferentes tecidos, em que este aminoácido desempenha diferentes funções fisiológicas.

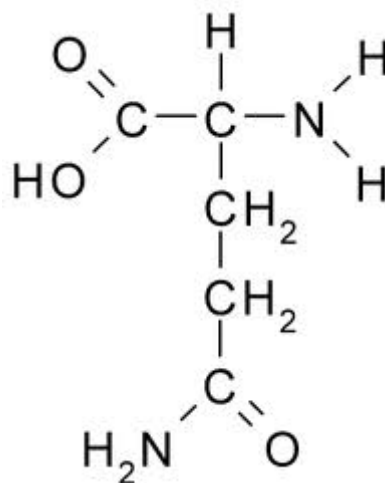


Figura 12: Estrutura química da molécula de glutamina. Fonte: adaptado (58)

O sistema da glutathione é um dos maiores mecanismos de redução do estresse oxidativo. A glutamina fornece a fonte de glutamato para este sistema em

muitos sítios, como fígado e músculo esquelético, e tem sido utilizada para preservar os níveis de glutamina total em modelos hepáticos e intestinais (23, 61).

A glutamina tem múltiplos efeitos na estrutura e função do trato gastrointestinal (TGI), além de efeitos na redução da morbidade e mortalidade em modelos animais com dano neste local. O TGI é um dos maiores sítios de utilização da glutamina, obtida a partir da circulação sistêmica, sendo consumida em mais da metade do território esplâncnico (aproximadamente 15g/dia). A glutamina ingerida pela dieta (aproximadamente 5g/dia) é menos importante que a glutamina circulante, especialmente em condições de doença, associadas com redução substancial na ingestão de alimento (59).

Mostrou-se em modelos experimentais e clínicos que em todas as situações com hipercatabolismo, ou seja, cirurgias, ferimentos, queimaduras, ocorre uma deficiência intracelular de glutamina, com uma aceleração muscular, e fluxo de glutamina no pulmão e dano epitelial no intestino (62).

A glutamina é considerada um nutriente importante, capaz de melhorar a isquemia e reperfusão hepática, a lesão hepática induzida pelo álcool, diminui o estresse oxidativo e reduz a liberação de citocinas inflamatórias (56). Outros estudos têm demonstrado que a glutamina é capaz de proteger em situações de isquemia-reperfusão hepática, de lesão hepática induzida por álcool, de colite ulcerativa e na gastropatia da hipertensão portal (52, 56, 63, 64).

3 MARCO TEÓRICO

Diversos estudos indicam que o estresse oxidativo está intimamente relacionado à lesão celular hepática decorrente da IHAG visto que a lipoperoxidação exerce um papel importante na fisiopatogenia da doença. O desequilíbrio no balanço redox decorrente da produção de ERO potencializa o dano hepático por promover o processo inflamatório e a necrose hepatocelular. Neste trabalho, abordamos as questões envolvidas no processo oxidativo e inflamatório decorrentes do modelo de IHAG induzida por tioacetamida (Figura 12).

O estresse oxidativo está envolvido com o agravamento da doença e a glutamina é capaz de reduzir o dano celular.

O dano tecidual, evidenciado pela perda da arquitetura hepática com presença de infiltrado inflamatório e necrose é atenuado com a administração da glutamina.

A presença de inflamação é evidenciada pela expressão de moléculas envolvidas no processo inflamatório. A glutamina pode diminuir a expressão dessas proteínas e com isso melhorar a inflamação.

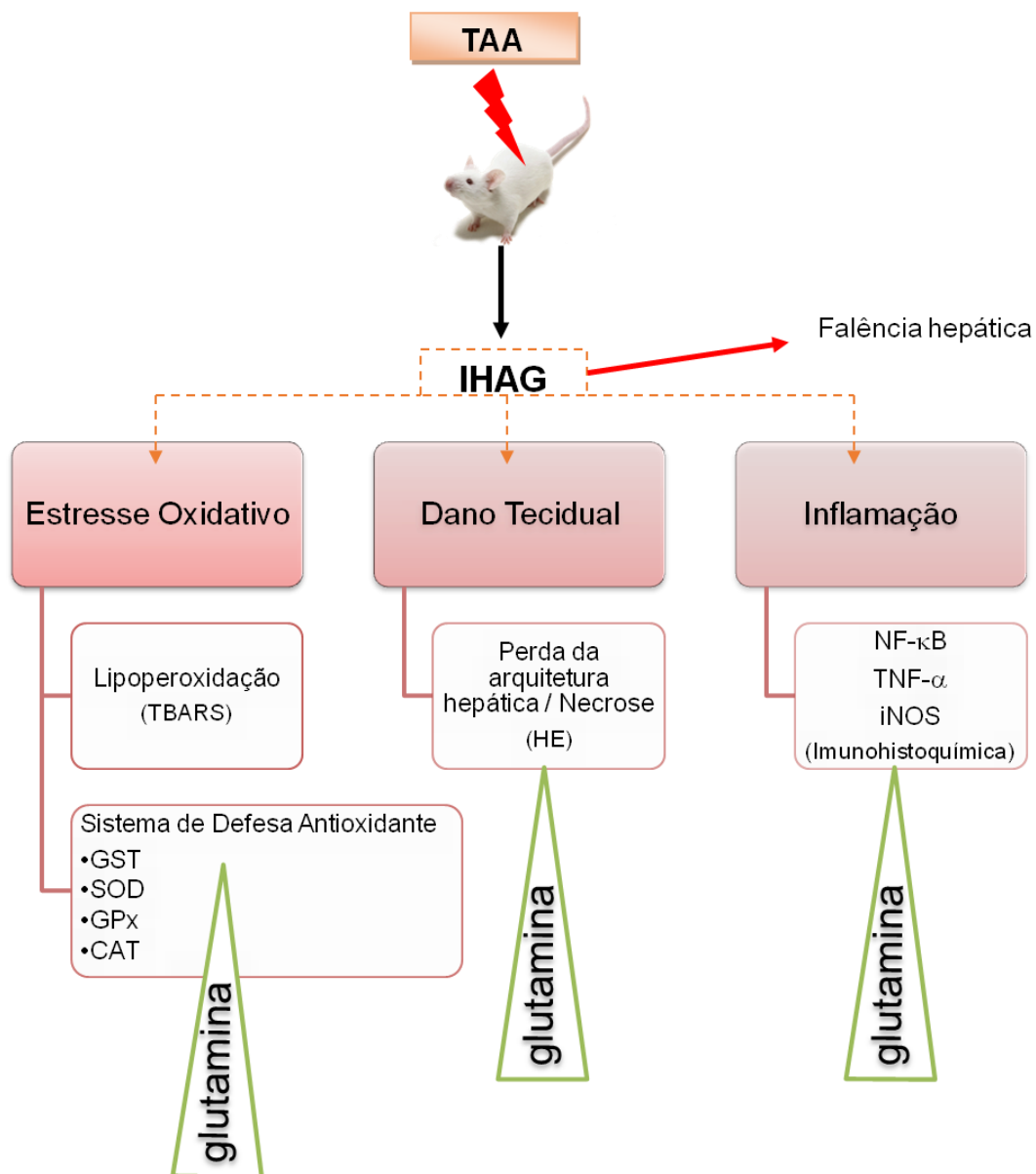


Figura 13: Marco teórico esquemático do estudo.

4 JUSTIFICATIVA

A IHAG leva à deficiência funcional do fígado, com alteração em seu metabolismo. A capacidade de metabolização de substâncias endógenas como hormônios, bilirrubinas, vitaminas e mesmo medicamentos encontra-se deteriorada, com depleção de enzimas de proteção de seu parênquima.

As taxas de mortalidade são elevadas, portanto os cuidados devem ser precoces, já que o único tratamento é o de suporte intensivo às complicações. Sendo o transplante hepático o único tratamento efetivo.

Sendo assim, ocorre uma importante busca por novos tratamentos que possam controlar ou eliminar a doença. O uso de drogas hepatotóxicas que desenvolvam a síndrome de IHAG é importante para o conhecimento das rotas fisiopatogênicas e fisiopatológicas envolvidas na síndrome. Além de permitir o conhecimento a eventual ação de substâncias eficazes com finalidade terapêutica.

Por este motivo, avaliamos a ação da Glutamina no modelo experimental de insuficiência hepática aguda grave.

O uso da Glutamina foi baseado no histórico do grupo de pesquisas, no qual foi desenvolvido o estudo. A glutamina é utilizada por seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios em diversos modelos experimentais, incluindo colite ulcerativa induzida por ácido acético, gastropatia da hipertensão portal induzida por ligadura de veia porta, isquemia e reperfusão intestinal, entre outros.

Este modelo, envolvendo a insuficiência hepática aguda grave induzida por tioacetamida e a ação da glutamina apresenta uma nova situação com potencial terapêutico.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da glutamina sobre o tecido hepático em ratos wistar com IHAG, induzida por tioacetamina, na tentativa de elucidar a ação terapêutica envolvida nesse modelo experimental.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sobrevivência dos animais submetidos à administração de TAA e tratados com glutamina, através da curva de Kaplan-Meier.

- Avaliar as alterações de integridade hepática nos animais submetidos a administração de TAA e tratados com glutamina através da análise das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina (FA), bem como as alterações bioquímicas sistêmicas de Bilirrubina Total (BT) e Creatinina (CRE).

- Verificar as características histológicas da IHAG no fígado dos animais submetidos à administração da TAA e tratados com glutamina.

- Quantificar a expressão imuno-histoquímica das proteínas NF- κ B, TNF- α e iNOS nos animais submetidos à administração de TAA e tratados com glutamina.

- Quantificar as proteínas totais no tecido hepático nos animais submetidos à administração de TAA e tratados com glutamina.

- Avaliar a LPO no tecido hepático através do TBARS nos animais submetidos à administração de TAA e tratados com glutamina.

- Determinar no tecido hepático a atividade das enzimas antioxidantes GST, SOD, CAT e GPx nos animais submetidos à administração de TAA e tratados com glutamina.

- Correlacionar o dano celular, verificado na análise de LPO com os índices de dano tecidual, observados na análise histológica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berne RML, M. N; Koeppen, B. M.; Stanton, B.A. Fisiologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.
2. Jaiprakash H, Narayana S, Mohanraj J. Drug-induced hepatotoxicity in a tertiary care hospital in rural South India. N Am J Med Sci. 2012 Feb;4(2):90-3.
3. Lasser KE, Allen PD, Woolhandler SJ, Himmelstein DU, Wolfe SM, Bor DH. Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. Jama. 2002 May 1;287(17):2215-20.
4. Temple RJ, Himmel MH. Safety of newly approved drugs: implications for prescribing. Jama. 2002 May 1;287(17):2273-5.
5. de David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ, et al. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. Toxicol Pathol. 2011 Oct;39(6):949-57.
6. Coelho JCU. Aparelho Digestivo - Clínica e Cirurgia 4ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2012.
7. Gaboardi M. Anatomia e Fisiologia do Fígado. Sociedade Brasileira de Hepatologia; 2011. p. 3.
8. Sherlock SD, J. . Diseases of the liver and biliary system. 10 ed. London: Blackwell Science Ltd; 1997.
9. Carneiro JJ, Carneiro L. Histologia Básica. 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 1999.
10. Nunes PP. Fisiologia Hepática. In: Moreira AL, editor: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto; 2007. p. 26.
11. Mattos AAD-C, E. B. Tratado de Hepatologia. 4 ed. São Paulo: Rubio; 2010.
12. Lucke B, Mallory T. The Fulminant Form of Epidemic Hepatitis. Am J Pathol. 1946 Sep;22(5):867-945.
13. Borges TPS. Insuficiência Hepática Aguda. [dissertação de mestrado]. Cidade do Porto, PT: Universidade do Porto; 2010.
14. Alberto SF, Pires SS, Figueiredo A, Deus JR. Acute liver failure. Acta Med Port. 2009 Nov-Dec;22(6):809-20.
15. Larson AM. Diagnosis and management of acute liver failure. Curr Opin Gastroenterol. 2010 May;26(3):214-21.
16. Strauss E. Falência Hepática Aguda. In: Hepatologia SBD, editor.: Sociedade Brasileira de Hepatologia; 2011. p. 8.

17. Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol.* 2004 Feb;40(2):247-54.
18. Chu CJ, Hsiao CC, Wang TF, Chan CY, Lee FY, Chang FY, et al. Prostacyclin inhibition by indomethacin aggravates hepatic damage and encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *World J Gastroenterol.* 2005 Jan 14;11(2):232-6.
19. Lee VS, Morgan GR, Lin JC, Nazzaro CA, Chang JS, Teperman LW, et al. Liver transplant donor candidates: associations between vascular and biliary anatomic variants. *Liver Transpl.* 2004 Aug;10(8):1049-54.
20. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci.* 1991 Jun;36(6):770-4.
21. Rodrigues D. Transplante de Hepatócitos no modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol em ratos. [tese de doutorado]. Porto Alegre, BR-RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
22. Board PG, Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2013 May;1830(5):3267-88.
23. Huber PA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova.* 2008;31(5):14.
24. Glesse N. Estudos dos polimorfismos dos genes de enzimas de metabolização/detoxificação na susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
25. Fedets OM. Structure and functions of glutathione transferases. *Ukr Biokhim Zh.* 2014 May-Jun;86(3):23-32.
26. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001 Nov 15;360(Pt 1):1-16.
27. Losi-Guembarovski RC, I. M. S. Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): ethnic distribution and relation with cancer. *Semina: Ci Biol Saúde.* 2001;22:7.
28. Wang T, Shankar K, Ronis MJ, Mehendale HM. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Aug;294(2):473-9.
29. Lima TC. Cirrose Hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas wistar. [dissertação de mestrado] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
30. Yogalakshmi B, Viswanathan P, Anuradha CV. Investigation of antioxidant, anti-inflammatory and DNA-protective properties of eugenol in thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicology.* 2010 Feb 9;268(3):204-12.

31. Hammes TO. Efeito da Taurina sobre a Esteatose Hepática induzida por tioacetamida em *Danio rerio*. [dissertação de mestrado] Porto Alegre, BR-RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
32. Chilakapati J, Shankar K, Korrapati MC, Hill RA, Mehendale HM. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab Dispos*. 2005 Dec;33(12):1877-85.
33. Porter WR, Neal RA. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 1978 Jul-Aug;6(4):379-88.
34. David C. A Quercetina protege o fígado na lesão hepática induzida por tioacetamida (TAA) e suas complicações. [tese de doutorado] Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011.
35. Marroni NP, Morgan-Martins, M. I. Porawski, M. Radicais Livres no Processo Saúde-Doença: da bancada à clínica. Curitiba: CRV Editora; 2012.
36. Oliveira CR. Estresse Oxidativo Induzido por Bifenilos Policlorados em ratos e tratados com Quercetina. [dissertação de mestrado]. Canoas: Universidade Luterana do Brasil; 2013.
37. Schneider CD, Oliveira, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*. 2004 Jul/Ago 2004;10(4):6.
38. Hartmann RM. O efeito antioxidante da *Boswellia serrata* no modelo experimental de colite induzida por ácido acético. [dissertação de mestrado]. Porto Alegre, BR-RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
39. Mação LB. Avaliação do estresse oxidativo na cardiopatia chagásica crônica após terapêutica antioxidante. [dissertação de mestrado]. Florianópolis, BR-SC: Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.
40. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1980;492:153-68.
41. Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol*. 1989 Oct;26(4):277-85.
42. Shan ZS, Sellmyer DJ, Jaswal SS, Wang YJ, Shen JX. Magnetism of rare-earth-transition-metal nanoscale multilayers. II. Theoretical analysis of magnetization and perpendicular magnetic anisotropy. *Phys Rev B Condens Matter*. 1990 Dec 1;42(16):10446-59.
43. Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun*. 1990;9(1):1-32.
44. Cerretani D, Bello S, Cantatore S, Fiaschi AI, Montefrancesco G, Neri M, et al. Acute administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induces oxidative stress, lipoperoxidation and TNF α -mediated apoptosis in rat liver. *Pharmacol Res*. 2011 Nov;64(5):517-27.

45. Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res.* 2010 Jul;162(1):95-109.
46. Fang S, Sharma RV, Bhalla RC. Endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits platelet-derived growth factor-BB stimulated focal adhesion kinase and paxillin phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Jul 30;236(3):706-11.
47. Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med.* 2000 Apr;28(4 Suppl):N37-52.
48. Alican I, Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol.* 1996 Feb;270(2 Pt 1):G225-37.
49. Rodrigues G. Ação da Sinvastatina no modelo experimental de Esteato-Hepatite Não Alcoólica. [tese de doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2014.
50. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr.* 2005 Oct;135(10):2299-304.
51. Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med.* 2003 Jan;31(1 Suppl):S105-11.
52. Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J, et al. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology.* 2007 Jul 17;236(3):217-26.
53. Kwak JH, Jung JK, Lee H. Nuclear factor-kappa B inhibitors; a patent review (2006-2010). *Expert Opin Ther Pat.* 2011 Dec;21(12):1897-910.
54. Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr.* 1991 Dec 15;69(21-23):965-8.
55. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception.* 2002 Apr;65(4):305-11.
56. Lin Z, Cai F, Lin N, Ye J, Zheng Q, Ding G. Effects of glutamine on oxidative stress and nuclear factor-kappaB expression in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med.* 2014 Feb;7(2):365-70.
57. Soares AD, Costa KA, Wanner SP, Santos RG, Fernandes SO, Martins FS, et al. Dietary glutamine prevents the loss of intestinal barrier function and attenuates the increase in core body temperature induced by acute heat exposure. *Br J Nutr.* 2014 Oct 17:1-10.

58. Babu R, Eaton S, Drake DP, Spitz L, Pierro A. Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. *J Pediatr Surg*. 2001 Feb;36(2):282-6.
59. Elia M, Lunn PG. The use of glutamine in the treatment of gastrointestinal disorders in man. *Nutrition*. 1997 Jul-Aug;13(7-8):743-7.
60. Boza JJ, Moennoz D, Jarret AR, Vuichoud J, Garcia-Rodenas C, Finot PA, et al. Neither glutamine nor arginine supplementation of diets increase glutamine body stores in healthy growing rats. *Clin Nutr*. 2000 Oct;19(5):319-25.
61. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg*. 1999 Aug;178(2):147-50.
62. Matilla B, Ortiz J, Gonzalez P, Garcia-Diez F, Jorquera F, Culebras JM, et al. Effects of parenteral nutrition supplemented with glutamine or glutamine dipeptides on liver antioxidant and detoxication systems in rats. *Nutrition*. 2000 Feb;16(2):125-8.
63. Sozen S, Topuz O, Uzun AS, Cetinkunar S, Das K. Prevention of bacterial translocation using glutamine and melatonin in small bowel ischemia and reperfusion in rats. *Ann Ital Chir*. 2012 Mar-Apr;83(2):143-8.
64. Marques C, Licks F, Zattoni I, Borges B, de Souza LE, Marroni CA, et al. Antioxidant properties of glutamine and its role in VEGF-Akt pathways in portal hypertension gastropathy. *World J Gastroenterol*. 2013 Jul 28;19(28):4464-74.

7 ARTIGO

Toxicology and Applied Pharmacology

Effect of glutamine on oxidative stress and inflammation in fulminant hepatic failure

Elizângela Gonçalves Schemitt ^{a,d,e}, Josieli Raskopf Colares ^{b,d,e}, Renata Minuzzo Hartmann ^{a,d,e}, Maria Isabel Morgan-Martins ^{d,e}, Cláudio Augusto Marroni ^f, Norma Possa Marroni ^{a,b,c,d,e}

^a Graduate School of Medical Sciences. Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b BioHealth Graduate Program, Lutheran University of Brazil, Canoas, Brazil

^c Graduate School of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory, HCPA, Porto Alegre, Brazil

^e Oxidative Stress and Antioxidants Laboratory, ULBRA, Canoas, Brazil

^f Graduate School of Hepatology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Brazil

Abstract

Fulminant hepatic failure (FHF) is a rare clinical syndrome, characterized by sudden and severe liver dysfunction. Thioacetamide (TAA) is a hepatotoxin whose administration can induce centrilobular necrosis in liver cells and increase the formation of reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation in rats. Glutamine is a precursor for glutathione synthesis. The objective of the study to assess the antioxidant effects of glutamine in a rat model of TAA-induced FHF. Male Wistar rats were divided into four groups according to treatment and time of assessment: control, glutamine (25 mg/kg), thioacetamide (400 mg/kg) and thioacetamide plus glutamine. Animals were assessed after 24, 36 and 48 hours. Blood samples were collected for the analysis of AST, ALT, AP, TB and CRE levels, and liver samples were used to evaluate lipid peroxidation (TBARS), antioxidant enzyme activity (SOD, GPx, CAT and GST). NF- κ B, TNF- α and iNOS levels were assessed by histology and immunohistochemistry. TBARS levels and the activity of SOD and GST were significantly lower in the glutamine group as compared to the TAA group. CAT activity was elevated in animals treated with glutamine as compared to the TAA groups. GPx activity was also lower in the glutamine-treated groups than in TAA-treated animals at 36 and 48 hours. Tissue damage and NF- κ B, TNF- α and iNOS expression were significantly lower in animals treated with glutamine.

Thioacetamide causes alterations in biochemical and histological parameters, and affects the inflammatory process. Glutamine was shown to have protective effects against liver damage in a rat model of TAA-induced FHF.

Keywords: hepatotoxicity; lipid peroxidation; free radicals; antioxidants; liver.

Abbreviations

ALT: Alanine aminotransferase

AST: Aspartate aminotransferase

TB: Total bilirubin

CAT: Catalase

CO: Control

CRE: Creatinine

DNA: Deoxyribonucleic acid

OS: Oxidative stress

ROS: Reactive oxygen species

AP: Alkaline phosphatase

G: Glutamine

GPx: Glutathione peroxidase

GSH: Glutathione

GST: Glutathione S-transferase

HE: Hematoxylin-eosin

FHF: Fulminant hepatic failure

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

NADPH: Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate

NF- κ B: Nuclear factor κ B

SOD: Superoxide dismutase

TAA: Thioacetamide

TBARS: Thiobarbituric acid-reactive substances

TNF- α : Tumor necrosis factor α

Introduction

Fulminant hepatic failure (FHF) is a rare clinical syndrome, characterized by severe and sudden liver dysfunction resulting in coagulopathy and encephalopathy in previously healthy individuals with no underlying liver disease. The condition can rapidly progress to coma and death by cerebral edema or multiple organ failure. FHF has a mortality rate of up to 85%, and, to date, can only be effectively treated by liver transplantation (Adukauskiene et al., 2008). FHF has been attributed to several etiologies, including hepatotoxic drugs, viral hepatitis and stroke. However, the mechanisms by which liver cells are destroyed, and the processes responsible for liver regeneration, are still unknown (Bantel and Schulze-Osthoff., 2012). Despite recent advances and technological improvements in intensive care medicine, the treatment of FHF remains among the most challenging issues in clinical practice (Demirel et al., 2012).

Experimental models of toxin-induced hepatotoxicity have contributed to the elucidation of the physiopathology of several hepatic diseases, and to the identification and evaluation of many hepatoprotective agents. In rats, thioacetamide (TAA) has been found to induce FHF or cirrhosis, depending on the dosage and duration of exposure (Shapiro et. al., 2006). TAA induces oxidative stress (OS) by increasing the formation of free radicals, which may cause extensive damage to proteins, lipids and deoxyribonucleic acid (DNA) molecules (de David et al., 2011). The hepatotoxic effects of TAA are caused by S-dioxide (thioacetamide S-dioxide), an unstable reactive metabolite which induces necrosis and the formation of reactive oxygen species (ROS) through covalent bonding to macromolecules in the liver (Adukauskiene et. al., 2008).

Hepatotoxicity triggers the activation of signaling molecules such as nitric oxide (NO), which have been implicated in the regulation of several physiological processes including vasodilation, inhibition of platelet aggregation, neurotransmission, neural plasticity and the modulation of inflammatory and immune responses (Kimet et al., 2013). NO is synthesized from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS), which exists in one of three isoforms, depending on the tissue analyzed: eNOS (endothelial NOS), nNOS (neuronal NOS) and iNOS (inducible NOS) (Hartmann et al., 2012). In most cells, iNOS expression is regulated by several cytokines, such as interleukins and tumor necrosis factors (TNF- α). TNF- α is a multifunctional cytokine which mediates acute phase responses in the liver, where it is regulated by nuclear factor κ B (NF- κ B), a transcription factor responsible for the induction of several genes involved in the expression of mediators and proinflammatory cytokines in response to several types of liver damage (Bautista et al., 2013; Kim et al., 2013).

The human body employs several defenses against ROS, including antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST), and non-enzymatic antioxidants such as glutathione (GSH), alpha-tocopherol (vitamin C), and flavonoids. The function of these enzymes is to maintain low levels of ROS so as to avoid the production of excess free radicals (Hartmann et al., 2013). Antioxidants have been found to have an important role in protecting the liver from TAA-induced damage (de David et al., 2011; Li et al., 2012; Wong et al., 2012; Singh and Mondal, 2014).

Glutamine is a free amino acid which accounts for approximately 60% of the amino acid content of the human body. Although this compound can be synthesized

by the body under physiological conditions, a relative lack of glutamine may be observed under pathological conditions, leading to alterations in energy metabolism. Glutamine is also an important nutrient, and has been found to be involved in the reduction of liver ischemia, reperfusion injury, and alcohol-induced liver damage, in the protection from oxidative stress and in the reduction of inflammatory cytokine expression (Lin et al., 2013). The glutathione system plays a major role in reducing oxidative stress. Glutamine provides glutamate to this system in several tissues, such as liver and skeletal muscle, and has been shown to preserve total glutathione levels in hepatic and gut models (Prem et al., 1999). Glutamine may also have a protective effect against ischemia-reperfusion damage, alcohol-induced liver damage, ulcerative colitis and stomach damage resulting from portal hypertension (Fillmann et al., 2007; Sozen et al., 2012; Lin et al., 2013; Marques et al., 2013).

Thioacetamide (TAA) is a hepatotoxin whose administration can induce centrilobular necrosis in liver cells (Diez-Fernandez et al., 1996; de David et al., 2011), and lead to increased ROS formation and lipid peroxidation in rats. The investigation of these phenomena may make important contributions to the development of treatment strategies for these conditions. In the present study, a rat model of thioacetamide-induced FHF was used to investigate the antioxidant effects of glutamine and its associated mechanisms.

Material and Method

Ethical considerations

The present study was approved by the Health Research Ethics Committee of the Graduate School (GPPG) of the Clinical Hospital of Porto Alegre (project number

12-0116). All procedures were performed according to federal law 11.794 (Brazil, 2008) and the European Council Directive regarding animal experimentation (Council Directive 86/609/EEC).

Animals

A total of 84 male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) with a mean weight of 250 g were kept in the Animal Experimentation Unit of the Clinical Hospital of Porto Alegre (UEA-HCPA) throughout the experiment, under 12 hour light/dark cycles at 20° to 25°C and *ad libitum* access to food and water.

Induction of Severe Acute Liver Failure

Animals received two intraperitoneal injections of 400 mg/kg TAA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), diluted in saline, at 8 hour intervals. This procedure was adapted from Rahman and Hodgson (2003)(, and David (2011) and Shapiro (2006).

Glutamine Administration

Powdered glutamine (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) was dissolved in saline and administered intraperitoneally at a dose of 25mg/kg body weight, according to the protocol outlined below. The dose of glutamine was determined based on previous studies of its protective effects in experimental models of gastrointestinal damage (Fillmann et al., 2007; Marques et al., 2013).

Experimental Protocol

Animals were randomly assigned to one of three groups according to the time of assessment: 24, 36 or 48 hours (28 rats/group). Each group was then further divided into four subgroups (n=7 / group): CO (control group), G (glutamine control group), TAA (thioacetamide group) and TAA+G (glutamine-treated thioacetamide group). Animals in the CO group received 2 intraperitoneal injections of 0.9% NaCl solution at 8 hour intervals. Thioacetamide was administered intraperitoneally in two doses of 400 mg/kg given 8 hours apart. Glutamine was administered at a dose of 25 mg/kg ip half an hour after the second dose of TAA. Animals in the 36 hour-group received an additional dose of glutamine 24 hours after the beginning of the experiment, while those evaluated after 48 hours received a third dose of glutamine 36 hours after the beginning of the experiment, as shown in Figure 1. At the end of each study period, rats were weighed and injected intraperitoneally with 95mg/kg ketamine chlorohydrate and 8 mg / kg body weight xylazine chlorohydrate. Blood samples were collected from the retro-orbital plexus to assess hepatic integrity, and livers were removed for subsequent analysis. At the end of each study period, animals were killed by exsanguination under deep anesthesia.

Animal Survival

Animal survival was assessed 24, 36 and 48 hours after the administration of the first dose of TAA using a Kaplan-Meier curve and Log-rank testing for between-group differences.

Liver integrity analysis

Liver integrity was determined based on aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP) levels in the blood. Total bilirubin (TB) and creatinine (CRE) levels were also evaluated. Plasma AST (340 nm), ALT (340nm), AP (405 nm), TB (546 nm) and CRE (510 nm) were determined by kinetic immunoassay using a Liquiform Labtest® commercial kit.

Histological and immunohistochemical analysis

Histological analyses were performed on liver samples preserved in 10% formaldehyde solution for 24h, which were then embedded in paraffin and cut in 3 μ m slices using a rotating microtome. Histological examinations were performed using hematoxylin-eosin staining. Slides were analyzed under a binocular Labophot NIKON microscope, at 100 X magnification. Slides were assigned scores ranging from 0 to 3, where 0=normal, 1= mild damage with little inflammatory infiltrate; 2=moderate damage and infiltrate and 3=intense damage and infiltrate with loss of hepatic architecture, as described by Shapiro et al. (2006).

NF- κ B, TNF- α and iNOS expression in liver tissue were determined by immunohistochemistry. Antigen epitopes were retrieved in citrate buffer at 100° C. VER SE OK Endogenous peroxidase activity was inhibited by incubation in methanol. Slides were incubated overnight at 4° C with monoclonal iNOS (Santa Cruz, 1: 200), TNF-a (Santa Cruz, 1:200) or NF- κ B antibody (Santa Cruz, 1:200), before being washed in buffer and incubated with a secondary antibody (rabbit anti-IgG, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 30 min at room temperature. Images were acquired and processed using a microscope equipped with a digital camera and the Image-Pro Plus® software. NF- κ B, TNF- α and iNOS expression were quantified by counting the number of positive pixels in the stained area using Adobe Photoshop CS3®. The level of expression was determined by multiplying the image density by the percentage of positively-stained (brown) nuclei.

Liver homogenate preparation

Livers were weighed and homogenized for 40 seconds in an Ultra-Turrax homogenizer (IKA-WERK) at 4° C in the presence of 1.15% KCl (9 ml per g of tissue) and phenyl-methyl -sulfonyl fluoride (PMSF) at a concentration of 100 mM in isopropanol (10 μ l per ml of KCl). The homogenate was then centrifuged for 10 min at 3000 rpm in a refrigerated centrifuge (SORVALL Super T21; Condensed Operating Kendro Laboratory Products, USA). The precipitate was discarded and the supernatant was recovered and frozen at -80 °C for subsequent biochemical analysis (Llesuy et al., 1985).

Protein

Protein concentrations were determined using the Bradford method (1976) with bovine albumin as a standard (SIGMA), followed by spectrophotometry at 595 nm. Results were expressed in mg/mL, and used to determine TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) and antioxidant enzyme levels.

Lipid peroxidation

The amount of aldehydes produced during lipid peroxidation was determined using TBARS as a marker. Samples were incubated at 100° C for 30 min with 500 mL 0.37% thiobarbituric acid and 15% trichloroacetic acid, and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes at 4 ° C. Absorbance was determined by spectrophotometry at 535 nm (Buege and Aust, 1976).

Antioxidant enzyme analysis

Glutathione S-transferase (GST) activity was estimated based on the formation of glutathione conjugates of CDNB with absorption maximum at 340 nm. One unit of the enzyme catalyzes the formation of 1 μmol GSH per minute at 30°C. Values were expressed as μmol/min/mg protein (Mannervik, 1981). Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by the inhibition of the reaction of superoxide-dependent adrenaline auto-oxidation in a spectrophotometer at 480 nm. Results were expressed as USOD/min/mg protein (Misra and Fridovich, 1972). Catalase (CAT) activity was calculated based on the decomposition of hydrogen peroxide in a spectrophotometer at 240 nm. The results of this procedure were

expressed as pmol/mg protein (Boveris and Chance, 1973). Glutathione peroxidase (GPx) activity was quantified based on NADPH consumption and reduced oxidized glutathione levels, in a spectrophotometer at 340 nm, for 3 min. Measurements were expressed as nmol/mg protein (Flohe and Gunzler, 1984).

Statistical analysis

Results were expressed as mean±standard error. Statistical analysis was performed using Graphpad Instat, v.3.0 or Prism v.6 for Windows. Survival curves were constructed using Kaplan-Meier estimates, and analyzed using Log-rank tests. Correlations were evaluated by Pearson coefficients, and the remaining data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t tests and multiple comparison Student-Newman-Keuls tests, with significance set at 5% ($P<0.05$).

Results

Survival rates

All animals treated with glutamine after receiving thioacetamide survived until the end of the experiment (48 hours). However, those who received TAA only had a mortality rate of 85.7% (Figure 2). In this group, no changes in mortality were observed after 24 or 36 hours.

Biochemical and liver integrity analyses

Exposure to TAA was associated with significant alterations in enzyme markers of liver damage (Table 1). Animals injected with TAA showed increased TB, CRE, and liver damage marker levels at all assessment times. However, the peritoneal administration of 25 mg/kg glutamine led to significant reductions in AST, ALT, AP, TB and CRE levels.

Histology

Histological slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) and analyzed at 100 X magnification. Alterations in liver tissue were assigned a score between 0 and 3. Necrosis and inflammatory infiltrate scores were significantly higher in the TAA group as compared to controls, and lower in glutamine- than in TAA-treated animals after 24, 36 and 48 hours (Figure 3A). In the absence of TAA, the liver parenchyma was preserved, hepatocyte strings were adequately arranged, nuclei were well-defined, and no inflammatory infiltrate was observed, as evidenced by the photomicrographs of the livers of control (Figure 3B) and glutamine control animals (Figure 3C). Figures 3C, 3D and 3F display photomicrographs of the liver of animals in the TAA group after 24, 36 and 48 hours, respectively. These images show extensive parenchymal damage, necrosis, and inflammatory infiltrate with polymorphonuclear cells. Figures 3G, 3H and 3I show the preservation of liver tissue and reduction in necrosis and inflammatory infiltrate after 24, 36 and 48 hours, respectively, in animals treated with glutamine.

NF- κ B, TNF- α and iNOS expression

NF- κ B (figure 4), TNF- α (figure 5) and iNOS (figure 6) levels did not differ between control and control + glutamine groups at any time of assessment. Animals exposed to TAA demonstrated lower staining for all proteins as compared to the control groups. Glutamine exposure led to significantly decreased protein expression in the TAA+G group.

Protein and Lipid peroxidation measurements

Figure 7A shows a significant reduction in total protein levels in all animals exposed to TAA, and an increase in these values following the administration of glutamine. In contrast, the TBARS content of liver cells indicated increased lipid peroxidation in the TAA group as compared to the remaining animals, and decreased peroxidation in the TAA+G group as compared to the TAA group at all assessment times (Figure 7B). The elevated TBARS levels in the TAA groups are suggestive of more severe liver damage. This finding was corroborated by the histological evidence of necrosis and inflammatory infiltrate shown in Figure 8. These results show a positive correlation between the markers studied.

Antioxidant enzymes

Figure 9 shows the results of antioxidant enzyme activity measurements. GST and SOD (9A, 9B) levels were significantly higher in the TAA group as compared to the remaining animals, and lower in TAA+G than TAA animals after 24, 36 and 48 hours. CAT (9C) activity was significantly lower in the TAA group as compared to the remaining animals and higher in the TAA+G than in the TAA group at all three

assessment times. GPx (9D) activity was significantly lower in TAA animals as compared to the other groups after 24 hours, but was found to increase in TAA animals and decrease in the TAA+G group after 36 and 48 hours.

Discussion

Although several studies have attempted to develop experimental models of this condition, the mechanisms involved in the physiopathogenesis of FHF have not been well established (Koblihova et al., 2014). Thioacetamide is a highly toxic compound which can cause various degrees of liver damage in experimental animals, ranging from necrosis and hepatocyte disarray to cirrhosis (Kim et al., 2000; Salama et al., 2013). In the present study, glutamine was found to attenuate oxidative stress and inflammation in TAA-induced FHF. TAA-administration led to severe liver damage and a high mortality rate after a 36-to 48-hour interval. In a study by Shapiro, *et al* (2006), a mortality rate of 60% was observed after rats were administered 300 mg/kg TAA.

Histological analysis showed extensive necrosis and inflammation in the liver tissue of animals exposed to TAA, which points to the toxicity of the substance. Similar results have been obtained by other authors (Shapiro et al., 2006; de David et al, 2011; Anbarasu et al., 2012; Salama et al., 2013). Animals treated with glutamine exhibited a reduction in the parameters studied, demonstrating the protective effects of this substance. These findings are in agreement with those obtained by authors who assessed the protective effects of glutamine against gastrointestinal damage (Fillmann et al., 2007; Sozen et al., 2012; Marques et al., 2013).

NF- κ B is an important transcription factor required for the expression of several genes, especially those related to inflammation, interleukins and adhesion molecules (Son et al., 2007). The TAA group showed increased expression of NF- κ B, TNF- α and iNOS. Similar findings were reported by Shapiro, et al. (2006) and Son, et al. (2007). Glutamine decreased the expression of these proteins in liver tissue. An association between glutamine treatment and decreased expression of NF-B and TNF-B was also reported by Lin et al. (2014).

TAA led to an increase in AST, ALT, AP, TB and CRE levels, suggesting the presence of liver damage. David et al. (2011) also reported an increase in AST, ALT and AP levels in models of TAA-induced liver damage. Glutamine led to a reduction in the levels of these enzymes, pointing to its protective role against hepatocellular damage. Wu et al. (2013) found that glutamine improved AST, ALT, AP, CRE and albumin levels in pigs exposed to the mycotoxin Deoxynivalenol.

TAA increased LPO by 69.7% after 24 hours, 162.07% after 36 hours and 124.24% after 48 hours. These results corroborate those obtained by Kucera et al. (2011) and de David et al. (2011) who also performed experimental studies involving TAA-induced liver damage. Glutamine, on the other hand, decreased LPO by 36.36% after 24 hours, 68.97% after 36 hours and 30.30% after 48 hours. The decrease in TBARS following glutamine administration was also associated with a decrease in necrosis and inflammation scores at all assessment points (Figure 8). These findings speak to the hepatoprotective role of glutamine was also reported by Marques et al. (2013).

GST is a detoxifying enzyme which metabolizes xenobiotic substances, inactivating toxic metabolites by conjugation with reduced glutathione, thus protecting

cells from exogenous and endogenous metabolites. In the present study, GST activity increased following the administration of TAA, but decreased following glutamine treatment. Similar findings were reported by Becker (2013), who noted an increase in anion superoxide production following physical exercise in rats. In the present study, SOD activity increased by 325.38%, 111.86% and 360.96% after 24, 36, and 48 hours, respectively, in the TAA group, possibly in an attempt to compensate for the liver damage caused by the substance. Similar results were reported by Oliveira et al. (2014), who studied the hepatotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB) in rats. SOD levels were lowest in glutamine-treated animals at all assessment times (88%, 43% and 66%), corroborating the findings obtained by Ren et al. (2014). Although CAT activity was consistently lower in TAA-treated animals, it increased following glutamine administration, as has been previously reported in the literature (Bona et al., 2012; Marcolin et al., 2013; Salama et al., 2013; Oliveira et al., 2014). GPx activity was lowest in the TAA group after the first 24 hours of the experiment, but exhibited an increase after 36 and 48 hours. In TAA+G animals, however, the measurements taken after 36 and 48 hours evidenced a decrease in GPx activity.

In animals injected with TAA, lipid peroxidation was caused by an increase in anion superoxide production, as evidenced by measures of SOD activity, which catalyzes the dismutation of superoxide into hydrogen peroxide and water. Although catalase degrades hydrogen peroxide, its activity was consistently low in TAA-treated animals, suggesting that, in this group, GPx may have been responsible for metabolizing ROS. Due to the toxic effects of TAA, GPx activity was still low at the 24-hour assessment, but increased at the 36 and 48-hour measurements, illustrating its hepatoprotective effects.

The present study confirmed the hepatotoxicity of TAA, as shown by its association with increased oxidative stress, elevated liver-associated enzymes, high levels of NF- κ B and inflammatory cytokines, necrosis and inflammation. Glutamine appears to decrease oxidative stress and affect the expression of inflammatory cytokines, making it a promising agent for reducing hepatocellular damage and treating liver toxicity.

Acknowledgements

We would like to thank the Research Incentive Fund of the Clinical Hospital of Porto Alegre (FIPE/HCPA - project number 12-0116), for the financial support, and the Coordination for the Improvement of Higher-Level Personnel (CAPES), the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS), the National Council of Research Development (CNPq), the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), the Experimental Hepatology and Gastroenterology Laboratory (HCPA/UFRGS) and the Lutheran University of Brazil (ULBRA).

Conflicts of Interest: None

References

Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. 1986. Off J Eur Communities (L358): 1-28

Adukauskiene D, Dockiene I, Naginiene R, Kevelaitis E, Pundzius J, Kupcinskas L. Acute liver failure in Lithuania. *Medicina (Kaunas)*. 2008; 44(7): 536-540 [DOI: 0807-06]

Anbarasu C, Rajkapoor B, Bhat K, Giridharan J, Amuthan AA, Satish K. Protective effect of *Pisonia aculeata* on thioacetamide induced hepatotoxicity in rats. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012; 2(7): 511-515 [PMID: 23569961 PMCID: 3609351 DOI: 10.1016/S2221-1691(12)60087-2apjtb-02-07-511]

Bantel H, Schulze-Osthoff K. Mechanisms of cell death in acute liver failure. *Front Physiol* 2012; 3: 79 [PMID: 22485095 PMCID: 3317271 DOI: 10.3389/fphys.2012.00079]

Bautista M, Del Rio MA, Benedi J, Sanchez-Reus MI, Morales-Gonzalez JA, Tellez-Lopez AM, Lopez-Orozco M. Effect of dichloromethylene diphosphonate on liver regeneration following thioacetamide-induced necrosis in rats. *World J Hepatol* 2013; 5(7): 379-386 [PMID: 23898371 PMCID: 3724966 DOI: 10.4254/wjh.v5.i7.379]

Becker CU. Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in skeletal muscle of rats with pulmonary hypertension. Graduate Program in Biological Sciences: Physiology. Porto Alegre: Federal University of the Rio Grande do Sul, 2013: 78.

Bona S, Filippin LI, Di Naso FC, de David C, Valiatti B, Isoppo Schaun M, Xavier RM, Marroni NP. Effect of antioxidant treatment on fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *ISRN Gastroenterol* 2012; 2012: 762920 [PMID: 22577570 PMCID: 3335177 DOI: 10.5402/2012/762920]

Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134(3): 707-716 [PMID: 4749271 PMCID: 1177867]

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254 [PMID: 942051 DOI: S0003269776699996]

Brazil. Federal Law No. 11.794. Procedures for the scientific use of animals. Official Gazette. October 8, 2008.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52: 302-310 [PMID: 672633]

de David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ, Marroni NP. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicol Pathol* 2011; 39(6): 949-957 [PMID: 21885874 DOI: 10.1177/01926233114186800192623311418680]

Demirel U, Yalniz M, Aygun C, Orhan C, Tuzcu M, Sahin K, Ozercan IH, Bahcecioglu IH. Allopurinol ameliorates thioacetamide-induced acute liver failure by regulating cellular redox-sensitive transcription factors in rats. *Inflammation* 2012; 35(4): 1549-1557 [PMID: 22535497 DOI: 10.1007/s10753-012-9470-5]

Diez-Fernandez C, Sanz N, Cascales M. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme gene expression in acute hepatic injury induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 1996; 51(9): 1159-1163 [PMID: 8645338 DOI: 0006-2952(96)00030-5]

Fillmann H, Kretzmann NA, San-Miguel B, Llesuy S, Marroni N, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ. Glutamine inhibits over-expression of pro-inflammatory genes and down-regulates the nuclear factor kappaB pathway in an experimental model of colitis in the rat. *Toxicology* 2007; 236(3): 217-226 [PMID: 17543437 DOI: S0300-483X(07)00239-9]

Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; 105: 114-121 [PMID: 6727659]

Hartmann RM, Morgan Martins MI, Tieppo J, Fillmann HS, Marroni NP. Effect of *Boswellia serrata* on antioxidant status in an experimental model of colitis rats induced by acetic acid. *Dig Dis Sci* 2012; 57(8): 2038-2044 [PMID: 22451119 DOI: 10.1007/s10620-012-2134-3]

Kim KH, Bae JH, Cha SW, Han SS, Park KH, Jeong TC. Role of metabolic activation by cytochrome P450 in thioacetamide-induced suppression of antibody response in male BALB/c mice. *Toxicol Lett* 2000; 114(1-3): 225-235 [PMID: 10713488 DOI: S0378427400001685]

Kim YR, Lee NJ, Ban JO, Yoo HS, Lee YM, Yoon YP, Eum SY, Jeong HS, Yoon DY, Han SB, Hong JT. Curative Effects of Thiacremonone against Acetaminophen-Induced Acute Hepatic Failure via Inhibition of Proinflammatory Cytokines Production and Infiltration of Cytotoxic Immune Cells and Kupffer Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 974794 [PMID: 23935693 PMCID: 3725907 DOI: 10.1155/2013/974794]

Koblihova E, Mrazova I, Vernerova Z, Ryska M. Acute liver failure induced by thioacetamide: selection of optimal dosage in Wistar and Lewis rats. *Physiol Res* 2014 [PMID: 24702498 DOI: 932690]

Li J, Li S, He B, Mi Y, Cao H, Zhang C, Li L. Ameliorative effect of grape seed proanthocyanidin extract on thioacetamide-induced mouse hepatic fibrosis. *Toxicol Lett* 2012; 213(3): 353-360 [PMID: 22863721 DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.07.019S0378-4274(12)01231-3]

Lin Z, Cai F, Lin N, Ye J, Zheng Q, Ding G. Effects of glutamine on oxidative stress and nuclear factor-kappaB expression in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med* 2014; 7(2): 365-370 [PMID: 24396406 PMCID: 3881322 DOI: 10.3892/etm.2013.1434etm-07-02-0365]

Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 1985; 71(3): 241-249 [PMID: 3861023]

Mannervik BG, C. . Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology* 1981; 77: 731-735

Marcolin E, Forgiarini LF, Rodrigues G, Tieppo J, Borghetti GS, Bassani VL, Picada JN, Marroni NP. Quercetin decreases liver damage in mice with non-alcoholic steatohepatitis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2013; 112(6): 385-391 [PMID: 23331460 DOI: 10.1111/bcpt.12049]

Marques C, Licks F, Zattoni I, Borges B, de Souza LE, Marroni CA, Marroni NP. Antioxidant properties of glutamine and its role in VEGF-Akt pathways in portal hypertension gastropathy. *World J Gastroenterol* 2013; 19(28): 4464-4474 [PMID: 23901221 PMCID: 3725370 DOI: 10.3748/wjg.v19.i28.4464]

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10): 3170-3175 [PMID: 4623845]

Oliveira, CR, Ceolin J, Oliveira RR, Schemitt EG, Colares JR, Freitas LB, Costabeber IH, Morgan-Martins MI, Silva J, Reyes JM, Marroni NP. Effects of quercetin on polychlorinated biphenyls-induced liver injury in rats. *Nutr Hosp* 2014; 29(5): 1141-1148 [PMID: 24951996 DOI: 10.3305/nh.2014.29.5.7362]

Otto Kucera HL, Pavla Stankova, Miroslav Podhola, Tomas Rousar, Vojtech, Cervinkova MaZ. Is rat liver affected by non-alcoholic steatosis more susceptible to the acute toxic effect of thioacetamide? *Int J Exp Path* 2011; 92: 281-289

Porter WR, Neal RA. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1978; 6(4): 379-388 [PMID: 28917]

Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 1999; 178(2): 147-150 [PMID: 10487268 DOI: S0002-9610(99)00148-8]

Rahman TM, Hodgson HJ. The effects of early and late administration of inhibitors of inducible nitric oxide synthase in a thioacetamide-induced model of acute hepatic failure in the rat. *J Hepatol* 2003; 38(5): 583-590 [PMID: 12713868 DOI: S0168827803000503]

Ren W, Yin J, Wu M, Liu G, Yang G, Xion Y, Su D, Wu L, Li T, Chen S, Duan J, Yin Y, Wu G. Serum amino acids profile and the beneficial effects of L-arginine or L-glutamine supplementation in dextran sulfate sodium colitis. *PLoS One* 2014; 9(2): e88335 [PMID: 24505477 PMCID: 3914992 DOI: 10.1371/journal.pone.0088335 PONE-D-13-38632]

Salama SM, Abdulla MA, Alrashdi AS, Hadi AH. Mechanism of Hepatoprotective Effect of *Boesenbergia rotunda* in Thioacetamide-Induced Liver Damage in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013; 2013: 157456 [PMID: 23997791 PMCID: 3749608 DOI: 10.1155/2013/157456]

Shapiro H, Ashkenazi M, Weizman N, Shahmurov M, Aeed H, Bruck R. Curcumin ameliorates acute thioacetamide-induced hepatotoxicity. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(2): 358-366 [PMID: 16509859 DOI: JGH3984]

Singh S, Mondal P, Trigun SK. Acute liver failure in rats activates glutamine-glutamate cycle but declines antioxidant enzymes to induce oxidative stress in cerebral cortex and cerebellum. *PLoS One* 2014; 9(4): e95855 [PMID: 24755687 PMCID: 3995888 DOI: 10.1371/journal.pone.0095855 PONE-D-13-45436]

Son G, Iimuro Y, Seki E, Hirano T, Kaneda Y, Fujimoto J. Selective inactivation of NF-kappaB in the liver using NF-kappaB decoy suppresses CCl4-induced liver injury and fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293(3): G631-639 [PMID: 17640975 DOI: 00185.2007 [pii]10.1152/ajpgi.00185.2007]

Sozen S, Topuz O, Uzun AS, Cetinkunar S, Das K. Prevention of bacterial translocation using glutamine and melatonin in small bowel ischemia and reperfusion in rats. *Ann Ital Chir* 2012; 83(2): 143-148 [PMID: 22462335]

Wong WL, Abdulla MA, Chua KH, Kuppusamy UR, Tan YS, Sabaratnam V. Hepatoprotective Effects of *Panus giganteus* (Berk.) Corner against Thioacetamide-(TAA-) Induced Liver Injury in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 170303 [PMID: 22649470 PMCID: 3357533 DOI: 10.1155/2012/170303]

Wu L, Wang W, Yao K, Zhou T, Yin J, Li T, Yang L, He L, Yang X, Zhang H, Wang Q, Huang R, Yin Y. Effects of dietary arginine and glutamine on alleviating the impairment induced by deoxynivalenol stress and immune relevant cytokines in growing pigs. *PLoS One* 2013; 8(7): e69502 [PMID: 23922725 PMCID: 3726672 DOI: 10.1371/journal.pone.0069502 PONE-D-13-08499]

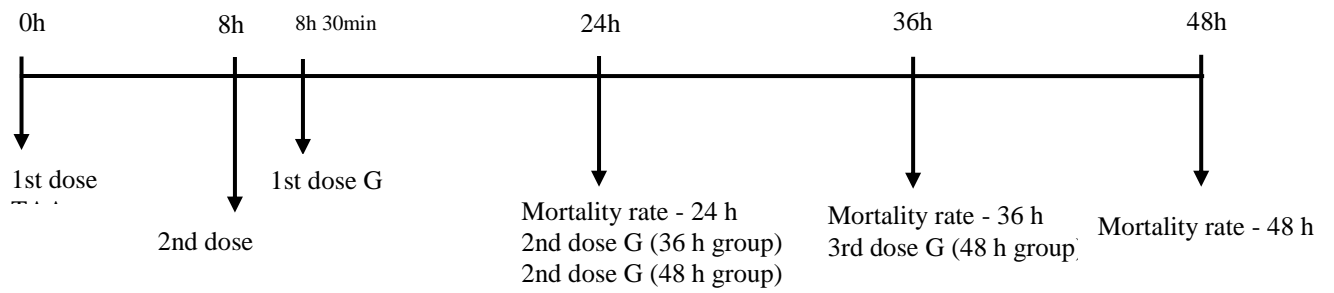


Figure 1: Study design.

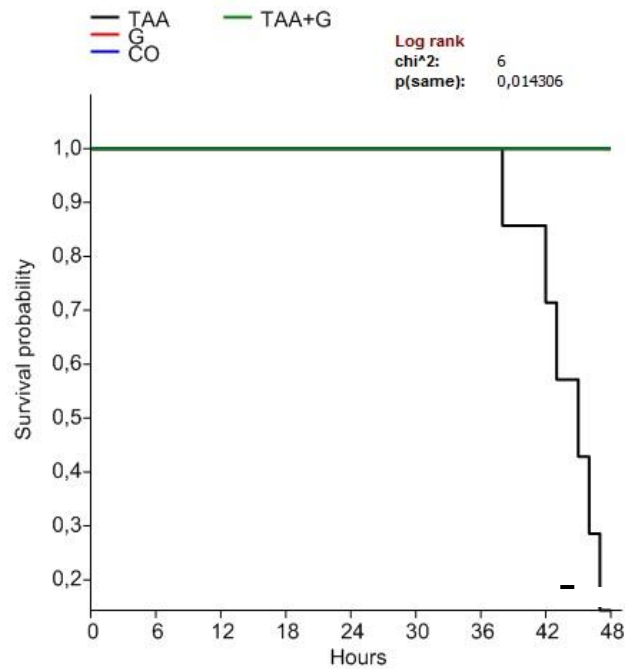


Figure 2: Kaplan-Meier survival curve for rats treated with 25 mg/kg (i.p.) glutamine (TAA+G) vs 400 mg/kg (i.p.) thioacetamide (TAA). The results for the CO and G groups were superimposed. $P < 0.01$

Table 1: Effect of glutamine on the enzymatic activity of aminotransferases, bilirubin and creatinine.

	AST (U/L)	ALT (U/L)	AP (U/L)	TB (mg/dL)	CRE (mg/dL)
24 hours					
CO	42.03±9.23	24.26±2.51	15.45±0.98	0.18±0.01	1.02±0.05
G	48.54±5.58	29.89±3.69	16.84±1.01	0.19±0.01	1.06±0.04
TAA	598.89±39.45 ^a	298.47±9.12 ^c	58.78±2.69 ^a	0.89±0.04 ^a	1.94±0.09 ^a
TAA+G	249.78±24.94 ^b	54.59±5.15 ^d	19.65±1.25 ^b	0.31±0.02 ^b	1.22±0.07 ^b
36 hours					
CO	44.05±6.56	26.54±1.94	19.15±0.85	0.22±0.12	1.11±0.07
G	45.24±4.49	27.63±2.45	19.22±0.96	0.21±0.11	1.25±0.09
TAA	675.12±34.26 ^a	314.21±8.14 ^a	66.75±3.15 ^c	0.88±0.09 ^c	1.89±0.07 ^a
TAA+G	312.15±21.89 ^b	66.84±7.84 ^b	23.55±2.06 ^d	0.41±0.06 ^d	1.41±0.06 ^b
48 hours					
CO	40.19±7.62	28.46±3.33	18.49±1.13	0.17±0.02	1.01±0.08
G	42.34±4.67	32.84±3.26	18.81±0.89	0.21±0.05	1.05±0.03
TAA	695.62±68.45 ^a	301.54±15.43 ^a	66.42±2.34 ^a	0.92±0.08 ^a	1.98±0.12 ^a
TAA+G	238.49±38.12 ^b	59.18±8.46 ^b	22.48±1.62 ^b	0.38±0.02 ^b	1.32±0.07 ^b

AST: Aspartate aminotransferase; ALT: Alanine aminotransferase; AP: Alkaline phosphatase; TB: Total bilirubin; CRE: Creatinine; CO: Control group; G: Glutamine group; TAA: Thioacetamide group; TAA+G: Glutamine-treated thioacetamide group. Data are expressed as mean±standard error. a=P<0.001 TAA vs control; b=P<0.001 TAA+G vs TAA; c=P<0.01 TAA vs control; d=P<0.01 TAA+G vs TAA.

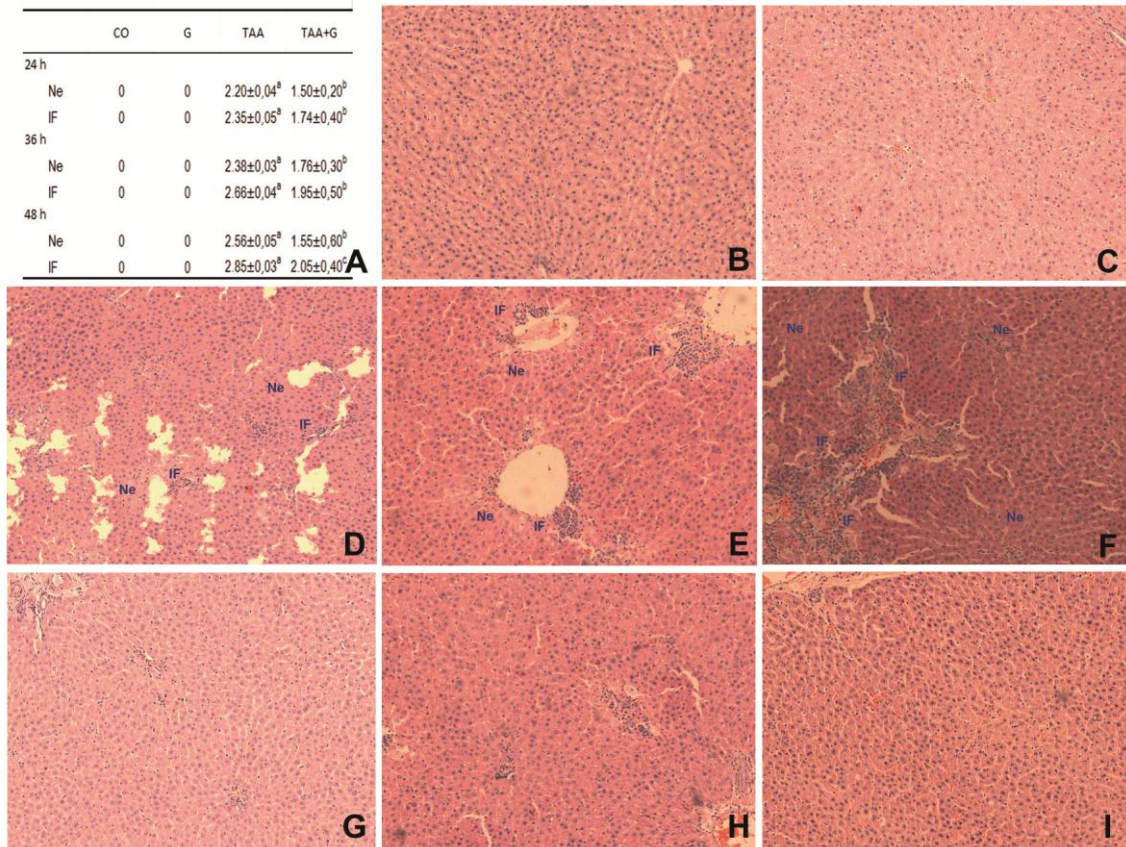


Figure 3: Effects of glutamine in a rat model of thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. Hematoxylin-eosin staining (HE). 100X magnification. Ne: necrosis; IF: inflammatory infiltrate. (A) Microscopic alterations in liver tissue. Data are expressed as mean±standard error. a=P<0.0001 TAA vs CO and G; b=P<0.001 TAA+G vs TAA; c=P<0.05. (B) Control group, (C) Glutamine control group, (D) TAA Group - 24 hours, (E) TAA Group - 36 hours, (F) TAA Group - 48 hours, (G) TAA+G Group - 24 hours, (H) TAA+G Group - 36 hours, (I) TAA+G Group - 48 hours, .

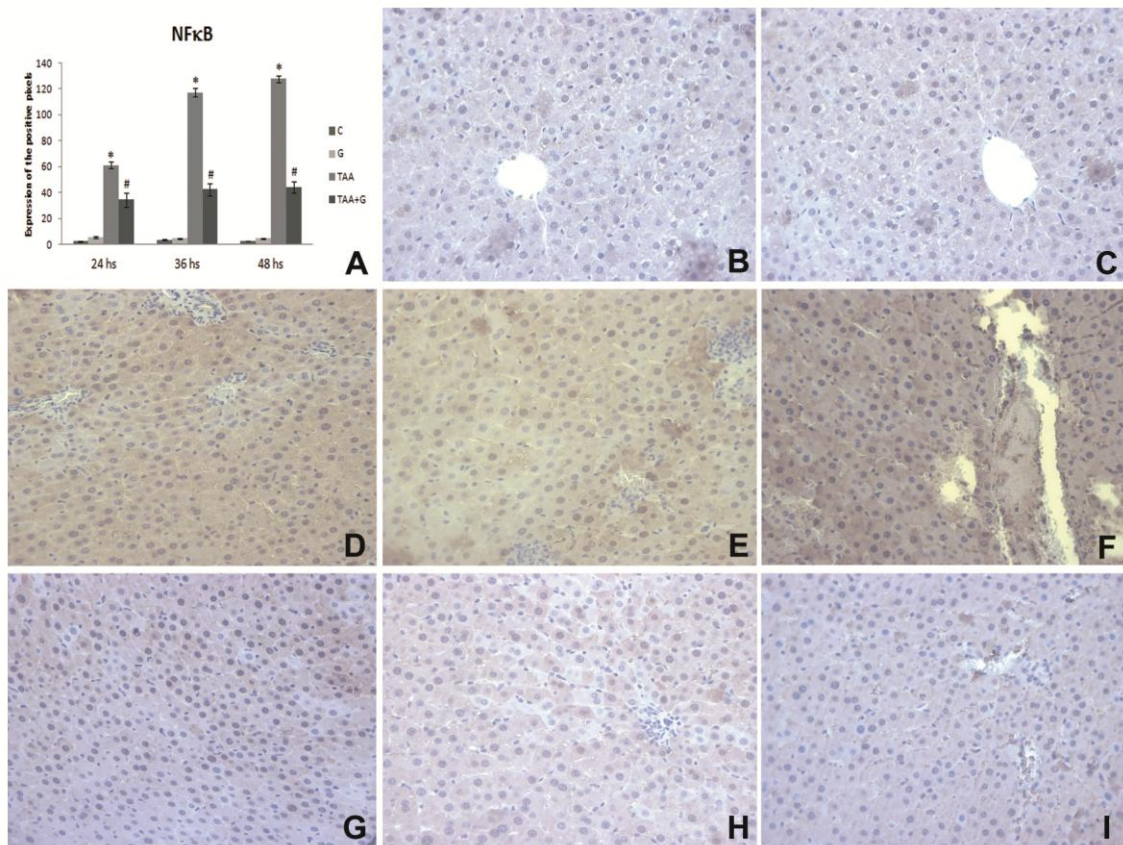


Figure 4: Reduction in liver $\text{NF-}\kappa\text{B}$ expression following glutamine administration in a rat model of thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. Digital image (photomicrograph, 400x). (A) Nuclear factor expression (B), Control group, (C) Glutamine control group, (D) TAA Group - 24 hours, (E) TAA Group - 36 hours, (F) TAA Group - 48 hours, (G) TAA+G Group - 24 hours, (H) TAA+G Group - 36 hours, (I) TAA+G Group - 48 hours, .

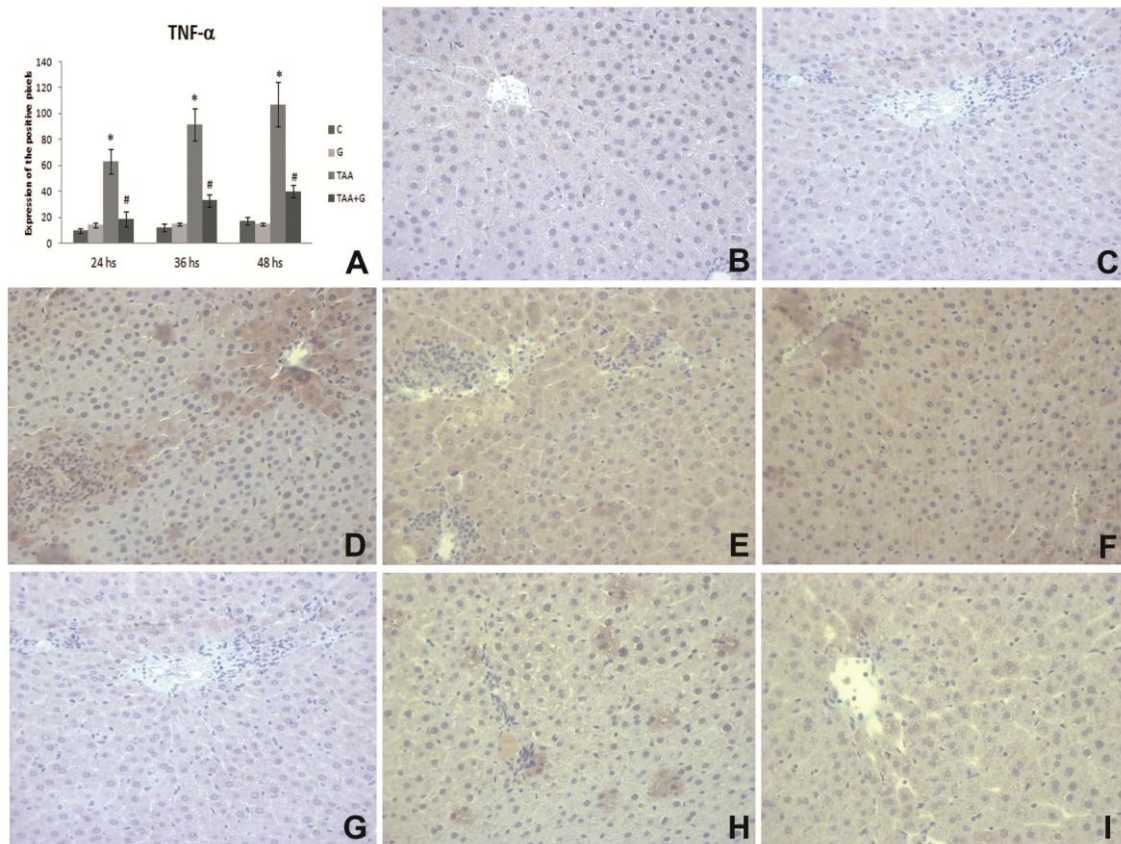


Figure 5: Reduction in liver **TNF- α** expression following glutamine administration in a rat model of thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. Digital image (photomicrograph, 400x). (A) Tumor necrosis factor expression (B), Control group, (C) Glutamine control group, (D) TAA Group - 24 hours, (E) TAA Group - 36 hours, (F) TAA Group - 48 hours, (G) TAA+G Group - 24 hours, (H) TAA+G Group - 36 hours, (I) TAA+G Group - 48 hours.

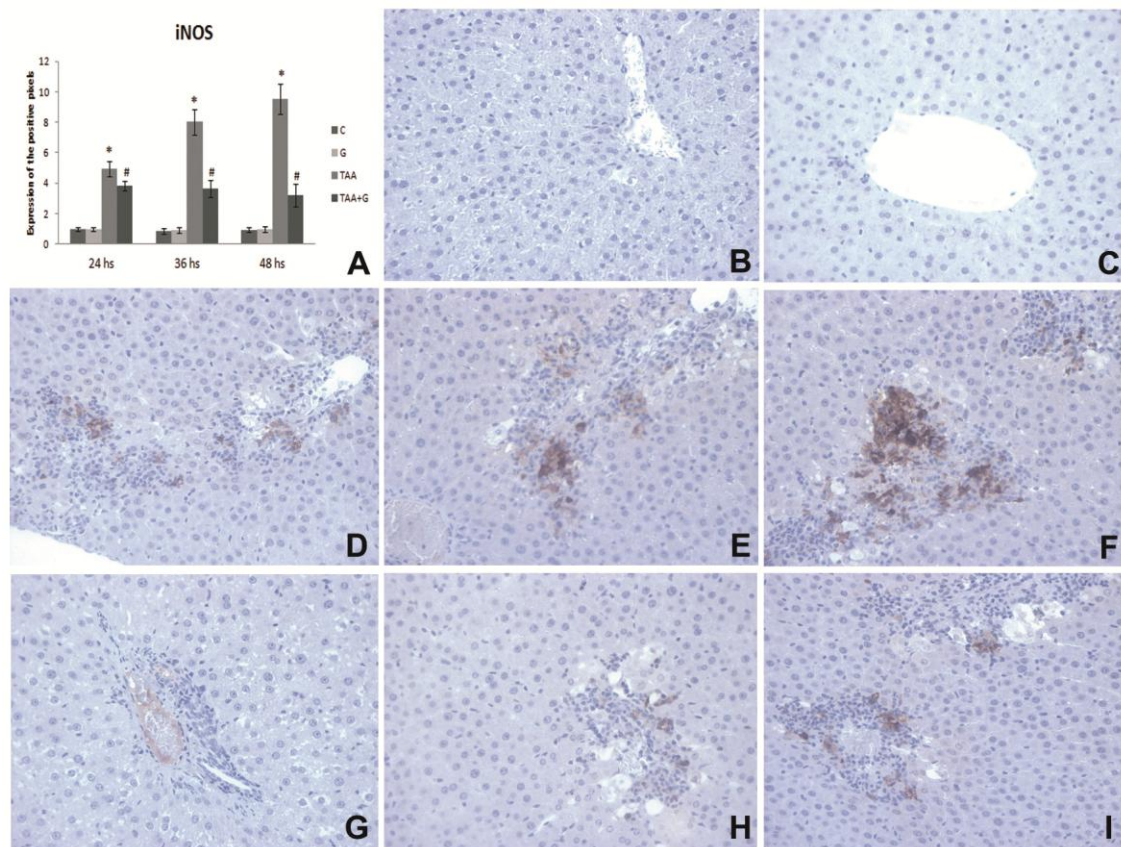


Figure 6: Reduction in liver **iNOS** expression following glutamine administration in a rat model of thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. Digital image (photomicrograph, 400x). (A) Protein expression (B), Control group, (C) Glutamine control group, (D) TAA Group - 24 hours, (E) TAA Group - 36 hours, (F) TAA Group - 48 hours, (G) TAA+G Group - 24 hours, (H) TAA+G Group - 36 hours, (I) TAA+G Group - 48 hours.

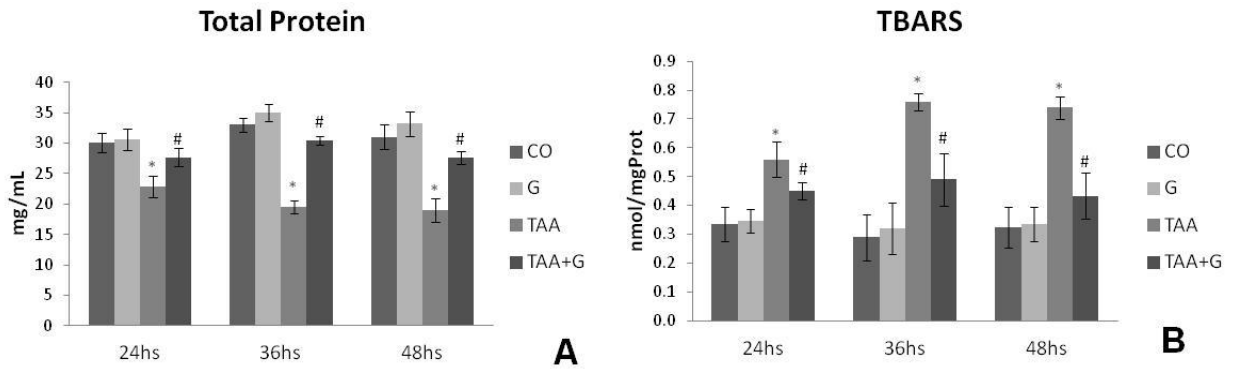


Figure 7: Effects of glutamine on (A) total protein and (B) lipid peroxidation levels as measured by TBARS in a rat model of thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. Data are expressed as mean \pm standard error. * significant differences were found between TAA animals and all other experimental groups ($P<0.001$). # significant difference identified between the TAA+G and TAA groups ($P<0.001$).

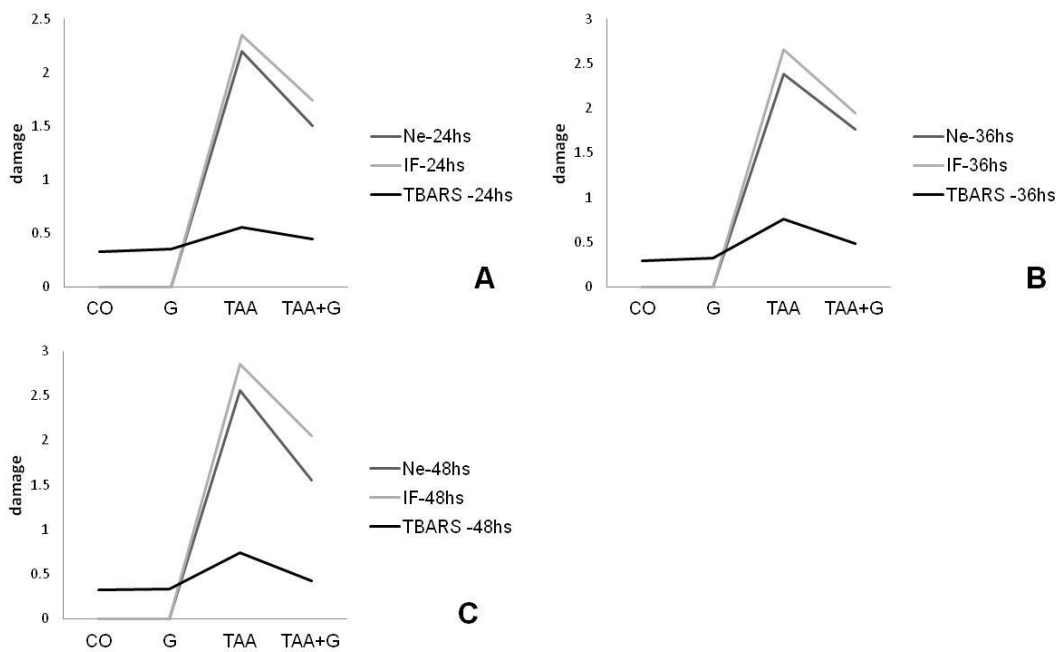


Figure 8: Correlation between TBARS and histological damage (necrosis and inflammatory infiltrate) after (A) 24, (B) 36 and (C) 48 hours. Ne: necrosis; IF: inflammatory infiltrate. $R=0.7082$, $P<0.05$.

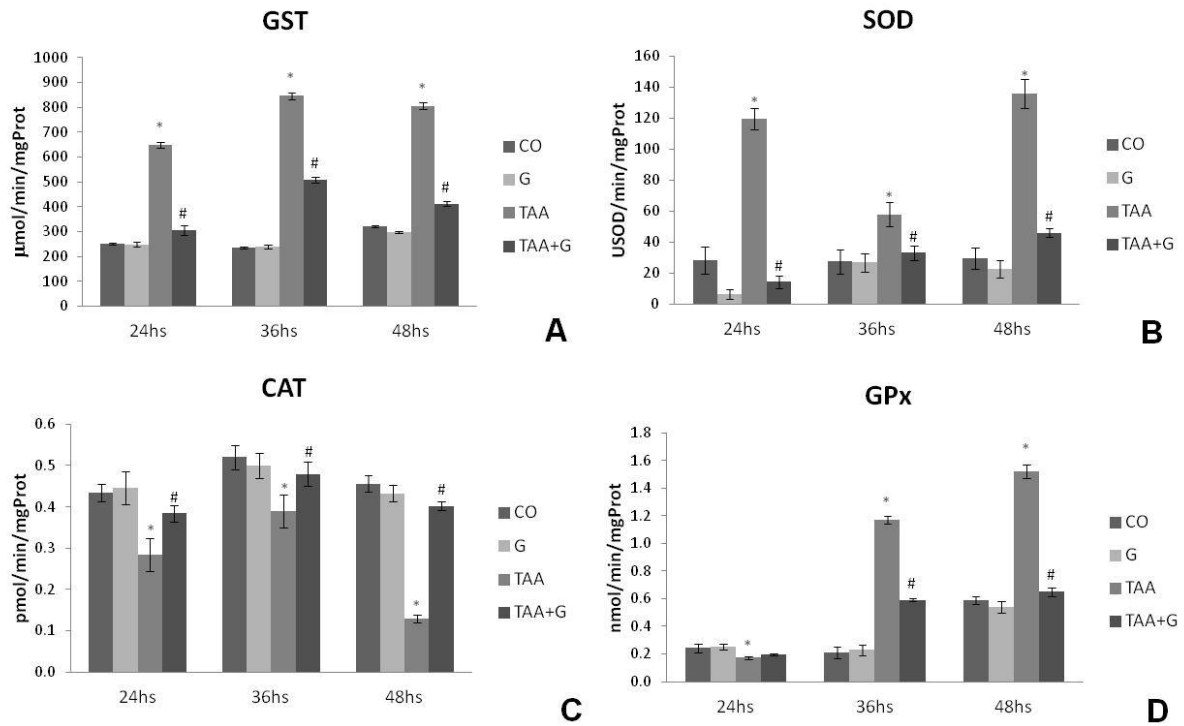


Figure 9: Effect of glutamine on antioxidant enzymes (A) GST, (B) SOD, (C) CAT and (D) GPx in a rat model of thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. Data are expressed as mean \pm standard error. * significant difference identified between the TAA and control groups ($P < 0.001$). # significant difference identified between the TAA+G and TAA groups ($P < 0.001$).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo experimental de IHAG induzido por tioacetamida mimetiza as lesões hepáticas da doença em humanos, conforme é encontrado na prática clínica.

O conhecimento dos mecanismos oxidativos e inflamatórios envolvidos na doença é de suma importância para a compreensão da fisiopatologia dessa síndrome. Tratamentos futuros, onde a glutamina poderá ser uma terapia de escolha.

8.1 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos no presente trabalho conclui-se que, no modelo experimental de insuficiência hepática aguda grave induzida por tioacetamida, a administração da glutamina:

- aumentou a sobrevivência dos animais;
- diminuiu os níveis séricos das enzimas que avaliam a integridade hepática AST, ALT, FA e BT, bem como da creatinina;
- reduziu o dano no parênquima hepático, diminuindo a necrose e o infiltrado inflamatório evidenciado na análise histológica;
- diminuiu a expressão das proteínas NF- κ B, TNF- α e iNOS no tecido hepático;
- aumentou as proteínas totais no fígado dos animais;
- diminuiu a lipoperoxidação;
- alterou a atividade das enzimas antioxidantes.
- diminuiu a correlação entre dano celular e tecidual.

Em decorrência dos resultados apresentados neste trabalho, confirmamos a eficácia do modelo experimental no desenvolvimento da IHAG e sugerimos que a glutamina, por diminuir o estresse oxidativo e interferir nas citocinas inflamatórias, parece ser promissora para minimizar as lesões hepatocelulares e pode representar uma potencial terapia para a toxicidade hepática.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora sendo uma condição rara, a IHAG ainda é um dos mais difíceis problemas de resolução na prática clínica. Os mecanismos intrínsecos envolvidos na fisiopatogenia da síndrome, bem como os processos de mediação a regeneração do fígado, são ainda desconhecidos.

Dando continuidade ao estudo, utilizando o modelo experimental de IHAG induzido por tioacetamida, avaliaremos os níveis plasmáticos de amônia e o desenvolvimento da encefalopatia hepática. Investigaremos ainda, diferentes marcadores inflamatórios e os mecanismos envolvidos nas rotas de apoptose e necrose, avaliando a ação da glutamina, por western blot e RT-PCR. Dessa forma poderemos estreitar o eixo bancada experimental e o leito hospitalar, desenvolvendo assim, uma pesquisa translacional.

ANEXOS

ANEXO A – Resultados para posterior publicação

ANEXO A1: Ação da glutamina nos níveis de óxido nítrico (nitritos e nitratos) nos tempos estudados (24, 36 e 48 horas).

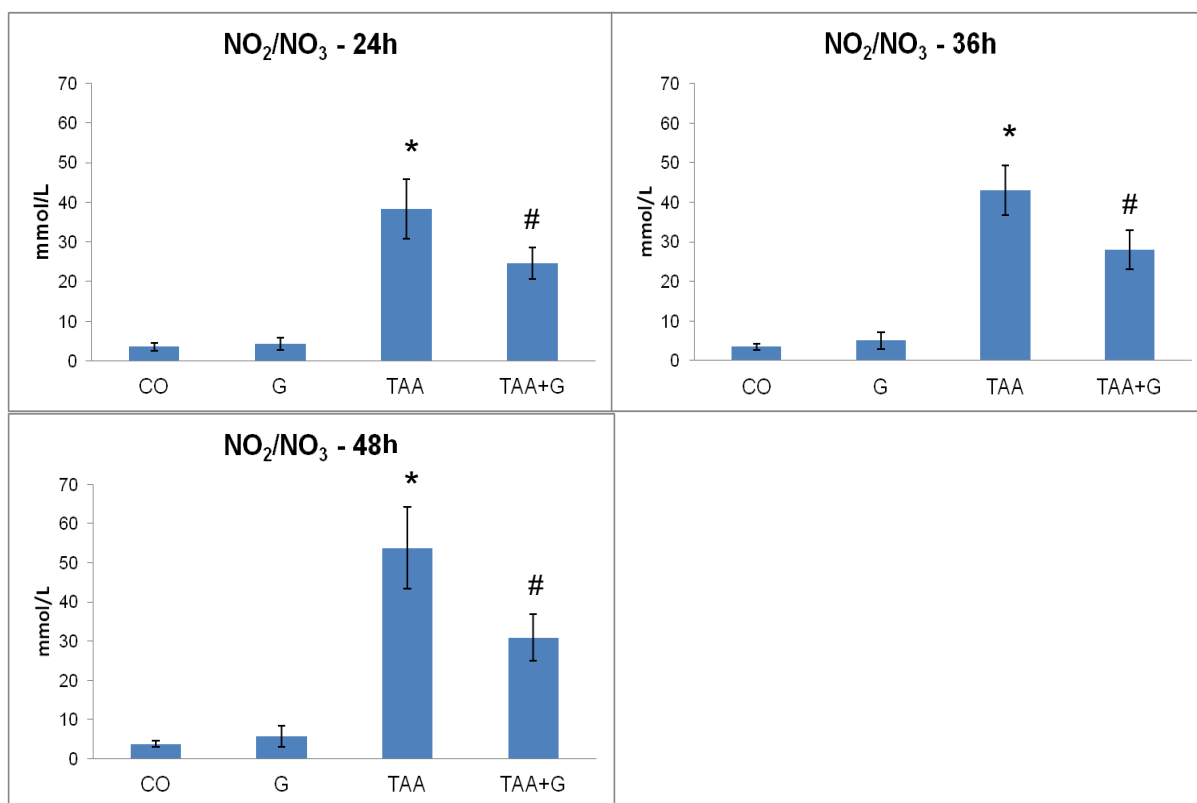


Figura 1: Os dados são expressos como média±erro padrão. * diferença significativa no grupo TAA em relação aos grupos CO e G. ($P < 0,001$). # diferença significativa no grupo TAA+G em relação ao grupos TAA ($P < 0,01$).

ANEXO B - Produção Científica durante a vigência do mestrado

PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA

2013 – 2015: Estudo em modelos experimentais das doenças gastrointestinais e hepáticas e avaliação do binômio estresse oxidativo e processos inflamatórios.

Situação: Em andamento

2012 – 2015: Indução da Insuficiência Hepática Aguda Grave em diferentes tempos e ação da Glutamina em ratos wistar.

Situação: Em andamento

2011 – 2013: Ação de diferentes fármacos sobre estresse oxidativo em modelos experimentais do trato gastrointestinal.

Situação: Concluído

2010 – 2013: Papel do estrogênio na hipertensão portal e sua relação com o estresse oxidativo.

Situação: Concluído

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

OLIVEIRA, C.R.; CEOLIN, J.; OLIVEIRA, R.R.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; BAUERMANN, L.F.; COSTABEBER, I.H.; MORGAN-MARTINS, M.I.; MAURIZ, J. L.; SILVA, J.; REYES, J.M.; MARRONI, N. P.. Effects of quercetin on polychlorinated biphenyls-induced liver injury in rats. *Nutrición Hospitalaria*, v. 29, p. 1141-1148, 2014.

MORGAN-MARTINS, M.I.; SILVA, V. S.; LICKS, F.; COLARES, J. R.; SCHEMITT, E. G.; FORGIARINI, L. F.; ROSA, D. P.; MARRONI, N. P.. *Ilex paraguariensis* st. Hill (yerba mate) improves the metabolic profile of and protects against oxidative stress in exercised and non-exercised rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, v. 4, p. 1303-1311, 2013.

Apresentação de Trabalhos em Congressos:

RODRIGUES, G. ; SCHEMITT, E. ; COLARES, J. R. ; SOARES, M.C. ; MORGAN-MARTINS, M.I. ; HARTMANN, R. M. ; MARRONI, C.A. ; MARRONI, N. P. . Action of glutamine in the liver of rats subjected to an experimental model of severe acute liver failure. In: 1st PanAmerican Congress of Physiological Sciences, 2014, Iguassu Falls. *Annals*. Iguassu Falls, 2014.

RODRIGUES, G. ; MOREIRA, A. J. ; BONA, S. ; SCHEMITT, E. G. ; MARRONI, C.A. ; MARRONI, N. P. . The use of simvastatin in preventing liver oxidative damage in

mice with non-alcoholic steatohepatitis. In: 1st PanAmerican Congress of Physiological Sciences, 2014, Iguassu Falls. Annals. Iguassu Falls, 2014.

MARRONI, N. P. ; HARTMANN, R. M. ; LICKS, F. ; SCHEMITT, E. G. ; COLARES, J. R. ; ZABOT, G. P. ; FILLMANN, H. S. . Evaluation of oxidative stress parameters in experimental model of intestinal ischemia and reperfusion. In: 1st PanAmerican Congress of Physiological Sciences, 2014, Iguassu Falls. Annals. Iguassu Falls, 2014.

SCHEMITT, E. G. ; COLARES, J. R. ; HARTMANN, R. M. ; MORGAN-MARTINS, M.I. ; MARRONI, C.A. ; MARRONI, N. P. . Ação da Glutamina na Insuficiência Hepática Aguda Grave Induzida por Tioacetamida em Ratos Wistar. In: 33ª Semana Científica do HCPA, 2013, Porto Alegre. 33ª Semana Científica do HCPA-Internacionalização em ciência - Anais. Porto Alegre: Revista HCPA, 2013.

COLARES, J. R. ; MORGAN-MARTINS, M.I. ; SCHEMITT, E. G. ; HARTMANN, R. M. ; FILLMANN, H. S. ; MARRONI, N. P. . O Uso da Lecitina diminui o dano oxidativo na mucosa intestinal de ratos submetidos ao modelo experimental de colite ulcerativa. In: 33ª Semana Científica do HCPA, 2013, Porto Alegre. 33ª Semana Científica do HCPA-Internacionalização em ciência - Anais. Porto Alegre: Revista HCPA, 2013.

SCHEMITT, E. G. ; OLIVEIRA, C.R. ; CEOLIN, J. ; OLIVEIRA, R.R. ; COLARES, J. R. ; BAUERMANN, L.F. ; COSTABEBER, I.H. ; MORGAN-MARTINS, M.I. ; MARRONI, N. P. . A ação da quercetina em ratos tratados com bifenilos policlorados (PCBs). In: 33ª Semana Científica do HCPA, 2013, Porto Alegre. 33ª Semana Científica do HCPA-Internacionalização em ciência - Anais. Porto Alegre: Revista HCPA, 2013.

RODRIGUES, G. ; SCHEMITT, E. G. ; COLARES, J. R. ; HARTMANN, R. M. ; MORGAN-MARTINS, M.I. ; MARRONI, C.A. ; MARRONI, N. P. . A glutamina reduz o estresse oxidativo hepático induzido pela tioacetamida. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto. SBFis 2013 - O futuro passa por aqui, 2013.

MARRONI, N. P. ; OLIVEIRA, C.R. ; SCHEMITT, E. G. ; COLARES, J. R. ; SILVA, J.; REYES, J.M. ; MORGAN-MARTINS, M.I. . A ação da quercetina em ratos tratados com bifenilos policlorados (PCBs). In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto. SBFis 2013 - O futuro passa por aqui. Ribeirão Preto: mci, 2013.

NUNES, M. L. ; SILVEIRA, K. C. S. ; PORAWSKI, M. ; NECTOUX, P. R. ; SCHEREINER, L. A. ; SOUZA, A. P. S. ; MARRONI, N. P. ; MORGAN-MARTINS, M.I. ; COLARES, J. R. ; SCHEMITT, E. G. . Estudo das alterações renais em modelo experimental de cirrose por ligadura de ducto biliar. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto. SBFis 2013 - O futuro passa por aqui. Ribeirão Preto: mci, 2013.

MARRONI, N. P. ; HARTMANN, R. M. ; LICKS, F. ; SCHEMITT, E. G. ; COLARES, J. R. ; ZABOT, G. P. ; FILLMANN, H. S. Avaliação do estresse oxidativo na isquemia

e reperusão intestinal: estudo experimental em ratos. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto. SBFis 2013 - O futuro passa por aqui. Ribeirão Preto: mci, 2013.

MORGAN-MARTINS, M.I. ; LICKS, F. ; SCHEMITT, E. G. ; MARQUES, C.M. ; HARTMANN, R. M. ; Fischer, C. A. ; Reyes, J.M. ; Marroni, C.A. ; Silva, J. ; MARRONI, N. P. . Ação protetora da N-acetilcisteína na gastropatia da hipertensão portal. In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto. SBFis 2013 - O futuro passa por aqui. Ribeirão Preto: mci, 2013.

MORGAN-MARTINS, M.I. ; Picada, J. N. ; SCHEMITT, E. G. ; COLARES, J. R. ; HARTMANN, R. M. ; LICKS, F. ; MARRONI, N. P. . A instabilidade genômica em ratas castradas e submetidas a ligadura parcial da veia porta (LPVP). In: XLVIII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2013, Ribeirão Preto. SBFis 2013 - O futuro passa por aqui. Ribeirão Preto: mci, 2013.

PRÊMIOS

2014 - Melhor Trabalho Científico, na categoria Gastroenterologia do VIII Simpósio sul-americano do Aparelho Digestivo, Sociedade Gaúcha de Gastroenterologia – O papel da glutamina no modelo de Isquemia e Reperusão Intestinal em ratos de autoria: Renata Minuzzo Hartmann, Francielli Licks, Elizângela Gonçalves Schemitt, Josieli Raskopf Colares, Maria Isabel Morgan-Martins, Gilmara Pandolfo Zobot, Henrique Sarubbi Fillmann, Norma Possa Marroni.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

SCHEMITT, E. G.; MARRONI, N. P. Curso: Manejo e Uso de Animais em Modelos Experimentais na Pesquisa Básica - Aspectos Fisiopatológicos. 2013. (Outro).

SCHEMITT, E.; MARRONI, N. P. . Workshop Internacional - Doenças Inflamatórias Gastrointestinais e Hepáticas. 2013. (Congresso).

PRODUÇÃO TÉCNICA

SCHEMITT, E. G.; MARRONI, N. P. Manejo e Uso de Animais em Modelos Experimentais na Pesquisa Básica - Aspectos Fisiopatológicos. 2013. (**Curso de curta duração ministrado/Extensão**).