

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

**A GLUTAMINA PROTEGE O FÍGADO NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA  
AGUDA GRAVE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TIOACETAMIDA**

ELIZÂNGELA GONÇALVES SCHEMITT

Porto Alegre

2018

**ELIZÂNGELA GONÇALVES SCHEMITT**

**A GLUTAMINA PROTEGE O FÍGADO NA INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA  
AGUDA GRAVE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TIOACETAMIDA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Norma Possa Marroni

Porto Alegre

2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Schemitt, Elizângela Gonçalves  
A GLUTAMINA PROTEGE O FÍGADO NA INSUFICIÊNCIA  
HEPÁTICA AGUDA GRAVE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR  
TIOACETAMIDA / Elizângela Gonçalves Schemitt. -- 2018.  
149 f.  
Orientadora: Norma Anair Possa Marroni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2018.

1. Insuficiência Hepática Aguda Grave. 2. Modelo  
experimental. 3. Glutamina. 4. Estresse Oxidativo. 5.  
Morte Celular. I. Marroni, Norma Anair Possa, orient.  
II. Título.

**Dedicatória**

Aos meus filhos Alison e Amanda, o maior motivo de seguir em frente, com todo o meu amor. Ao meu marido Paulo, companheiro fundamental em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Minha imensurável gratidão à Profa. Dra. Norma Possa Marroni, orientadora que me guiou pelo caminho científico, com seu acolhimento, incentivo e exemplo, proporcionando-me ir além daquilo que outrora imaginei. Espero ter correspondido ao mínimo, as suas expectativas. De uma liderança ímpar, sabendo dosar “os diferentes pesos e medidas”. Querida “profe”, muito obrigada!

Agradeço ao Dr. Cláudio Marroni, por toda a sua disponibilidade, pelo profissionalismo e contribuição fundamental em todas as etapas desse trabalho! Certamente sem os seus conhecimentos e sem a sua exímia assessoria, não teríamos a qualidade esperada.

Meu agradecimento aos atuais colegas do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes da ULBRA e a todos aqueles que fizeram parte do grupo de pesquisa enquanto eu realizava essa etapa na construção do conhecimento. Aos professores colaboradores do grupo, agradeço pela convivência profissional e pelos ensinamentos transmitidos.

Algumas pessoas transcendem o convívio profissional e passam a ter um significado especial em nossas vidas. Minha querida amiga Josieli esteve sempre ao meu lado. Parece que nossa afinidade foi mútua desde o início. Juntas, enfrentamos algumas adversidades e nos mantemos firmes no nosso propósito e mantendo nossa essência fundamental. Sem a sua presença e sem poder dividir alegrias e tristezas ou contar com seu apoio, certamente seria muito mais difícil. Muito obrigada! À Renata meu agradecimento por todo o carinho a mim dispensado. Sem dúvida, sua ajuda em todos os momentos foi essencial. Obrigada por ser uma excelente ouvinte, nossa amizade, não tenho dúvidas será para sempre, és uma pessoa incrível, de uma lealdade sem igual, agradeço pelos momentos de descontração e pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho. À Francielli meu agradecimento por nos proporcionar alegres e bons momentos. Obrigada pelos “complexos e intelectuais” diálogos referentes ao nosso gosto peculiar por séries “exóticas”, nos quais só nós entendíamos!! Meninas vocês foram grandes parceiras, de trabalho e de amenidades, tão essenciais para que as dificuldades se tornassem mais leves! Obrigada por tudo!

Aos amigos leais que a vida me apresentou, meu agradecimento especial. Obrigada àquelas amigas “de sempre” que incentivam, que entendem e que gostam da pessoa que sou, gratuitamente. A vocês eu dedico a mais singela, porém a mais verdadeira amizade. Obrigada por estarem comigo!

Aos familiares de longe que sempre torcem por mim, especialmente meu avô Antônio e minha saudosa avó Edith (*in memoriam*) que nos deixou durante esta etapa da minha vida e que me ensinou entre tantas outras coisas, o valor da família, a dedicação e como não deixar de lutar, mesmo que todas as dificuldades tentem te impedir de fazer o que tem que ser feito. Vovó, eu sempre te amarei!

Agradeço ao meu irmão Suélio, cunhada Milene e sobrinha Lavinya, por serem constantes na minha vida! À minha “afilhada-filha-irmã” Karoline, amiga, companheira e discípula, tenho orgulho da mulher e profissional que se tornou, obrigada pelo apoio e amor! Minha gratidão ao meu pai Henrique, por sempre acreditar em mim e por fazer tudo que está ao seu alcance para ajudar. E à minha mãe Elisabet, pelo apoio, pela preocupação e pelo amor incondicional e extraordinário. Meu amor pela nossa família é imensurável e sempre precisarei de vocês em minha vida!

Ao meu marido, companheiro inseparável, cúmplice, incentivador, conhecedor de mim. Obrigada por todo o sacrifício, pela luta diária, por assumir compromissos que não eram teus. Obrigada por acreditar no meu potencial, por sonhar junto comigo, por ser o melhor pai para os nossos filhos. Obrigada por mais essa etapa que enfrentamos juntos! Eu te amo, Paulo!

Aos meus filhos Alison e Amanda, o meu agradecimento especial. Obrigada por entenderem as minhas ausências, por compreenderem os momentos mais complicados, por me motivarem a cada dia. Tenham a certeza que todo o meu esforço tem um significado e um propósito. Vocês orquestram a minha intenção de querer melhorar como pessoa e como profissional! Vocês são meu motivo de orgulho, o melhor de mim, a minha melhor obra! Amo vocês, muito mais do que possam imaginar!

Agradeço aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal, da Unidade de Análises Moleculares e Proteínas, da Unidade de Patologia Experimental e da Secretaria do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de

clínicas de Porto Alegre, pelo profissionalismo e pela oportunidade de poder conduzir este trabalho. Agradeço ao FIPE/HCPA pelo aporte financeiro que possibilitou a realização do projeto de pesquisa.

Agradeço também, à equipe do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por proporcionarme condições de realizar os meus estudos. Meu agradecimento à Universidade Luterana do Brasil e por fim, à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

*Decida quem você é, decida o que  
você quer. Decida o que você está  
disposto a perder para obter o que  
deseja. E nunca mais olhe para trás.*

*(Autor desconhecido)*



## RESUMO

**Introdução:** A Insuficiência hepática aguda grave (IHAG), frequentemente chamada de hepatite fulminante, é uma síndrome clínica dependente de múltiplas etiologias, que ocorre em pacientes sem doença prévia, não habitual, grave e rápida, frequentemente fatal. A perda de hepatócitos, característica da IHAG, leva a uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica com falência multiorgânica. A resposta inflamatória está envolvida no estresse oxidativo e nitrosativo, que potencialmente reforça os efeitos citotóxicos podendo levar a uma perturbação no sistema de proteínas de choque térmico e desenvolvimento do estresse de retículo endoplasmático que contribuem para o processo de morte celular. 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. Ela é capaz de diminuir o estresse oxidativo e reduzir a liberação de citocinas inflamatórias. **Objetivo:** Avaliar os marcadores de estresse oxidativo e de retículo, proteínas de choque térmico, processo inflamatório e morte celular no fígado de ratos Wistar com IHAG, induzida por tioacetamida, na tentativa de elucidar a ação da glutamina nesse modelo experimental. **Métodos:** Foram utilizados 28 ratos machos Wistar (peso médio de 300 g), distribuídos em quatro grupos: controle (CO), controle mais glutamina (CO+G), tioacetamida (TAA) e tioacetamida mais glutamina (TAA+G). A IHAG foi induzida através de administração intraperitoneal de duas doses de tioacetamida (400 mg/Kg) em solução salina (0,9% NaCl), com intervalo de 8 horas. Os grupos tratados receberam glutamina 30 minutos após a última dose de TAA e 24 e 36 horas após o início do experimento na dose de 25 mg/kg em 1 mL de NaCl a 0,9% por via intraperitoneal. Após 48 horas, os animais foram anestesiados e o sangue foi então coletado do plexo retro-orbital para análises de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). Os animais foram eutanasiados por *overdose* anestésica e o fígado foi removido e dividido em seções para armazenamento e posteriores avaliações. Foi realizada análise histológica através de coloração de Hematoxilina e Eosina. O homogeneizado do tecido foi utilizado para análise de lipoperoxidação (TBARS), atividade enzimática (CAT, GPx e GST), níveis de GSH, avaliação dos metabólitos do óxido nítrico (nitritos/nitratos), quantificação de proteína total, níveis de proteínas carboniladas, avaliação de citocinas inflamatórias por análise multiplex (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ,

IL6 e IL10) e análises moleculares por Western Blot das proteínas Nrf2, Keap1, NQO1, SOD, TLR4, NF- $\kappa$ B, COX, iNOS, HSF1, HSP27, HSP70, HSP90, ATF6, GRP78, CHOP, PI3K, Akt, FOXO3a, Bcl-2, Bax, Caspase 3, mTOR, Beclin1 e LC3 $\alpha/\beta$ . **Resultados:** A glutamina diminuiu as enzimas de integridade hepática, aumentou os níveis de proteína total, diminuiu a concentração de proteínas carboniladas, diminuiu a lipoperoxidação e os níveis de óxido nítrico. Foi eficaz na preservação do parênquima hepático reduzindo o infiltrado inflamatório, a balonização e a necrose. Observou-se que a glutamina ativou a via do Nrf2, modulou as enzimas antioxidantes e diminuiu a enzima detoxificadora GST. Além disso atenuou o processo inflamatório evidenciado pela diminuição dos níveis das citocinas e expressão dos demais mediadores inflamatórios. Foi evidenciado ainda, que a glutamina reduziu o dano celular por modular as proteínas de choque térmico, inibiu o estresse de retículo endoplasmático e promoveu sobrevivência celular evidenciado na redução dos parâmetros de morte celular. **Conclusão:** Sugere-se que a glutamina desempenhou um papel restaurador no fígado de animais submetidos ao modelo de IHAG induzida por tioacetamida, possivelmente pelo sua ação antioxidante e anti-inflamatória, demonstrado pelas avaliações realizadas neste estudo.

**Palavras-Chave:** hepatotoxicidade, glutamina, estresse oxidativo, processo inflamatório, proteínas de choque térmico, estresse de retículo endoplasmático, morte celular.

## ABSTRACT

**Introduction:** Severe acute hepatic insufficiency (IHF), often called fulminant hepatitis, is a clinical syndrome that is independent of multiple etiologies, presenting with no disease, severe and rapid, often fatal, therapy. The loss of hepatocytes, characteristic of IHAG, leads to a systemic inflammatory response syndrome with multiorgan failure. The inflammatory response is involved in oxidative and nitrosative stress, which potentially enhances the cytotoxic effects, leading to a disturbance in the thermal shock protein system and the development of endoplasmic reticulum stress that contribute to the process of cell death. The glutamine acts as an energy substrate for most cells and is also an important precursor for nucleotides, glutamate and in particular for a synthesis of glutathione. It is able to decrease oxidative wear and reduce the release of inflammatory cytokines. **Objective:** To evaluate the markers of oxidative and reticulum stress, heat shock proteins, inflammatory process and cell death in the liver of Wistar rats with IHAG, induced by thioacetamide, in an attempt to elucidate the action of glutamine in this experimental model. **Methods:** Twenty-eight male Wistar rats (average weight of 300 g) were divided into four groups: control (CO), control plus glutamine (CO+G), thioacetamide (TAA) and thioacetamide plus glutamine (TAA+G). The IHAG was induced by intraperitoneal solution of two doses of thioacetamide (400 mg/kg) in saline solution (0.9% NaCl), with an interval of 8 hours. The treated groups received glutamine 30 minutes after the last dose of TAA and 24 and 36 hours after the start of the experiment at a dose of 25 mg/kg in 1 mL of 0.9% NaCl intraperitoneally. After 48 hours, the animals were anesthetized and blood was then collected from the retro-orbital plexus for analysis of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (FA). The animals were euthanized by anesthetic overdose and the liver was removed and divided into sections for storage and subsequent evaluations. A histological analysis was performed through the staining of Hematoxylin and Eosin. The tissue homogenate was used for the analysis of lipoperoxidation (TBARS), enzymatic activity (CAT, GPx and GST), GSH levels, evaluation of nitric oxide (nitrite/nitrate) metabolites, quantification of total protein, levels of carbonylated proteins, evaluation of inflammatory cytokines by multiplex analysis (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 and IL10) and molecular analyzes by Western Blot of proteins Nrf2, Keap1, NQO1,

SOD, TLR4, NF- $\kappa$ B, COX, iNOS, HSF1, HSP27, HSP70, HSP90, ATF6, GRP78, CHOP, PI3K, Akt, FOXO3a, Bcl-2, Bax, Caspase 3, mTOR, Beclin1 e LC3 $\alpha/\beta$ .

**Results:** Glutamine decreased liver integrity enzymes, increased total protein levels, decreased carbonylated protein concentration, decreased lipoperoxidation and nitric oxide levels. It was effective in preserving the liver parenchyma by reducing inflammatory infiltrate, ballooning and necrosis. It was observed that glutamine activated the Nrf2 pathway, modulated the antioxidant enzymes and decreased the detoxification enzyme GST. It also attenuated the inflammatory process evidenced by the decrease in cytokine levels and the expression of other inflammatory mediators. It was further evidenced that glutamine reduced cell damage by modulating heat shock proteins, inhibited endoplasmic reticulum stress and promoted cell survival evidenced in the reduction of cell death parameters. **Conclusion:** It is suggested that glutamine played a protective role in the liver of animals submitted to the thioacetamide-induced IHAG model, possibly due to its antioxidant and anti-inflammatory action, as demonstrated by the evaluations carried out in this study.

**Keywords:** hepatotoxicity, glutamine, oxidative stress, inflammatory process, heat shock proteins, endoplasmic reticulum stress, death cell.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia utilizada para buscar referências bibliográficas.....	23
Figura 2. Esquema tridimensional da arquitetura do fígado normal. ....	24
Figura 3. Lóbulos hepáticos e Espaço Porta.....	25
Figura 4. Síntese da sequência de eventos que ocorrem na IHAG.....	28
Figura 5. Manifestações sistêmicas da IHAG.....	29
Figura 6. Redução do oxigênio molecular com formação de RL.....	31
Figura 7. Etapas envolvidas na reação de lipoperoxidação.. ....	34
Figura 8. Metabolismo do óxido nítrico.....	36
Figura 9. Via clássica de ativação do NF- $\kappa$ B.....	39
Figura 10. Ativação de proteínas de choque térmico. ....	41
Figura 11. Proteínas associadas ao estresse de RE.....	43
Figura 12. Mediadores de vias de sinalização.....	45
Figura 13. Tipos de morte celular.....	46
Figura 14. Visão geral das vias de apoptose.....	47
Figura 15. Organização geral da resposta autofágica.....	49
Figura 16. Processo autofágico.....	50
Figura 17. Vias de sinalização celular proposta para necrose .....	52
Figura 18. Vias de biotransformação de xenobióticos.....	54
Figura 19. Metabolismo da tioacetamida que leva à lesão tecidual. ....	56
Figura 20. Conjugação de GSH com um xenobiótico genérico .....	58
Figura 21. Estrutura química da molécula de glutamina .....	59
Figura 22. Marco conceitual esquemático do estudo .....	63
Figura 23. Ação da glutamina nas vias estudadas .....	135
Figura 24. Medicina translacional: da bancada laboratorial à clínica médica.....	136
Artigo I	
Figure 1. Effect of glutamine on liver injury.....	95
Figure 2. Assessment of lipid peroxidation (TBARS).....	96
Figure 3. Effect of glutamine in Nrf2 and Keap1.....	97
Figure 4. Effect of glutamine in NQO1 and SOD.....	98
Figure 5. Assessment of glutathione (GSH) levels.....	99

Figure 6. Effect of glutamine in TLR4 and NF- $\kappa$ B.....	100
Figure 7. Effect of glutamine in COX2 and iNOS.....	101
Figure 8. Effect of glutamine on levels of nitric oxide metabolites.....	102
Artigo II	
Figure. 1 Effects of SALF and glutamine on liver integrity.....	122
Figure. 2 Microphotographs of livers from the different experimental groups.....	123
Figure. 3 Effects glutamine on liver total protein (a) and carbonylated proteins.....	124
Figure. 4 Effects of SALF and glutamine on HSF-1.....	125
Figure. 5 Effects of SALF and glutamine on heat shock proteins.....	126
Figure. 6 Effects of SALF and glutamine on endoplasmic reticulum stress.....	127
Figure. 7 Effects of SALF and glutamine on apoptosis.....	128
Figure. 8 Effects of SALF and glutamine on autophagy.....	129
Figure. 9 Effects of SALF and glutamine on PI3K/Akt and FOXO3a pathways.....	130

## LISTA DE TABELAS

Artigo I

Table 1. Effect of glutamine on transaminase levels.....103

Table 2. Effect of glutamine on enzyme activity.....104

Table 3. Effect of glutamine on levels of proinflammatory cytokines .....105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>µl</b>	Microlitro
<b>Akt</b>	Proteína quinase serina / treonina
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>AOX</b>	Antioxidante
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>ATG</b>	Genes relacionados com a autofagia
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>Bax</b>	Proteína X associada a Bcl2
<b>Bcl2</b>	Linfoma de células B2
<b>Beclin</b>	do inglês: <i>Coiled-coil, moesin-like BCL2 interacting protein</i>
<b>BT</b>	Bilirrubina total
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CHOP</b>	Proteína homóloga C/EBP
<b>CRE</b>	Creatinina
<b>Cu<sup>+</sup></b>	Cobre
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>EH</b>	Encefalopatia hepática
<b>EO</b>	Estresse oxidativo
<b>ERO</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>FA</b>	Fosfatase alcalina
<b>FOXO</b>	Proteínas da classe <i>forkhead O</i>
<b>Gln</b>	Glutamina
<b>GPx</b>	Glutaciona peroxidase
<b>GRP78</b>	Proteína regulada pela chaperona glicose 78 kDa
<b>GSH</b>	Glutaciona
<b>GST</b>	Glutaciona S-transferase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>HF</b>	Hepatite Fulminante
<b>HGF</b>	Fator de crescimento de hepatócitos
<b>HSF1</b>	Fator de transcrição de choque térmico 1
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>IF</b>	Infiltrado inflamatório



<b>IL</b>	Interleucina
<b>IHAG</b>	Insuficiência Hepática Aguda Grave
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzível
<b>RNI</b>	Relação normatizada internacional
<b>kDa</b>	Quilodalton
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>LC3</b>	Proteínas associadas a microtúbulos de cadeia leve
<b>LPO</b>	Lipoperoxidação
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mTOR</b>	Proteína alvo de rapamicina em mamíferos
<b>NF-κB</b>	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub></b>	Nitrito
<b>NO<sub>3</sub></b>	Nitrato
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Ânion superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxil
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>PI3K</b>	Proteína fosfatidilinositol quinase 3
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RL</b>	Radical livre
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TAA</b>	Tioacetamida
<b>TASO</b>	Tioacetamida-S-óxido
<b>TASO<sub>2</sub></b>	Tioacetamida-S-dióxido
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
<b>TLR4</b>	do inglês: <i>Toll-like Receptor 4</i>
<b>TNF-α</b>	Fator de Necrose Tumoral α
<b>UPR</b>	Resposta à proteína desdobrada

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	22
2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações .....	22
2.2 Estrutura e função do fígado .....	24
2.3 Insuficiência hepática aguda grave .....	26
2.3.1 Epidemiologia e Etiologia .....	27
2.3.2 Fisiopatologia .....	27
2.3.3 Manifestações clínicas e Diagnóstico .....	29
2.3.4 Terapêutica e prognóstico .....	30
2.4 Estresse oxidativo .....	31
2.5 Estresse nitrosativo .....	35
2.6 Processo inflamatório na IHAG .....	37
2.6.1 Receptor toll-like 4.....	37
2.6.2 Citocinas.....	37
2.6.3 Fator de transcrição nuclear Kappa B .....	38
2.7 Proteínas de choque térmico.....	39
2.8 Estresse de retículo endoplasmático.....	41
2.9 Mediadores de vias de sinalização.....	43
2.10 Mecanismos de morte celular na IHAG .....	45
2.10.1 Apoptose .....	46
2.10.2 Autofagia .....	48
2.10.3 Necrose .....	50
2.11 Modelos experimentais de IHAG .....	52
2.12 Xenobióticos .....	53
2.12.1 Tioacetamida.....	55
2.13 Antioxidantes.....	56
2.14 Glutamina .....	58
3 MARCO CONCEITUAL.....	62
4 JUSTIFICATIVA .....	64
5 OBJETIVOS .....	65
5.1 Objetivo Geral .....	65

5.2 Objetivos Específicos .....	65
5.2.1 Objetivos específicos do Artigo I .....	65
5.2.2 Objetivos específicos do Artigo II .....	66
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
7 ARTIGOS .....	76
7.1 Artigo 1 .....	76
7.2 Artigo 2 .....	108
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	133
8.1 Conclusões do artigo I .....	133
8.2 Conclusões do Artigo II .....	134
9 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	136
10 ANEXOS .....	137
10.1 Anexo A .....	138
10.2 Anexo B .....	139

## 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 (Berne *et al.*, 2004).

Por desempenhar um papel importante no metabolismo de drogas, o fígado é suscetível a um elevado grau de toxicidade. A hepatotoxicidade implica em 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 (Jaiprakash *et al.*, 2012).

Devido à baixa incidência de doença hepática induzida por drogas, seu potencial hepatotóxico, usualmente, pode não ser reconhecido durante os ensaios de pré-comercialização e só é detectado na fase de comercialização quando pode ter sido utilizada por muitos pacientes do que incluídas em ensaios clínicos (Lasser *et al.*, 2002; Temple e Himmel, 2002).

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 implicarão melhorias na assistência médica, na evolução farmacêutica e no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (Davi *et al.*, 2011).

Neste estudo foram avaliadas as alterações hepáticas decorrentes do modelo de Insuficiência Hepática Aguda Grave (IHAG) induzida por tioacetamida (TAA) em ratos e os efeitos do tratamento com a glutamina.

Essa tese está estruturada em seções. Após a introdução (primeira seção) será apresentada a revisão da literatura (segunda seção), em seguida, o marco

conceitual (terceira seção), a justificativa (quarta seção), os objetivos do estudo (quinta seção) e as referências bibliográficas (sexta seção) utilizadas na seção 1 e 2.

Na sétima seção, serão apresentados os artigos científicos:

Artigo I - **Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure** enviado para publicação na revista World Journal of Hepatology.

Artigo II - **Glutamine modulates heat shock proteins, endoplasmic reticulum stress and cell death in rats with thioacetamide-induced liver failure** enviado para publicação na revista Protoplama.

As considerações finais serão apresentadas na oitava seção, as perspectivas futuras estarão na nona seção e os anexos estarão na décima 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 15-0175, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – suporte financeiro 001.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

Ao revisar a literatura, procuramos explorar os principais aspectos envolvidos na IHAG, relacionando o envolvimento do estresse oxidativo, do processo inflamatório, das proteínas de choque térmico, além do estresse de retículo endoplasmático, dos processos de morte celular, especialmente a apoptose, a autofagia e a necrose, bem como o uso da glutamina como tratamento.

Para localizar as informações utilizou-se as bases de dados PubMed e SciELO. Por não haver um consenso entre os especialistas quanto a definição da IHAG, optou-se por utilizar o termo “Insuficiência Hepática Fulminante” para buscar informações nos bancos de dados, por ser este o mais amplamente utilizado na literatura internacional. Também foram utilizadas outras palavras-chave citadas ao longo do texto (Figura 1).

Além disso, foram consultados bancos de dados contendo dissertações e teses de universidades, outros materiais técnico-científicos e também livros-texto.

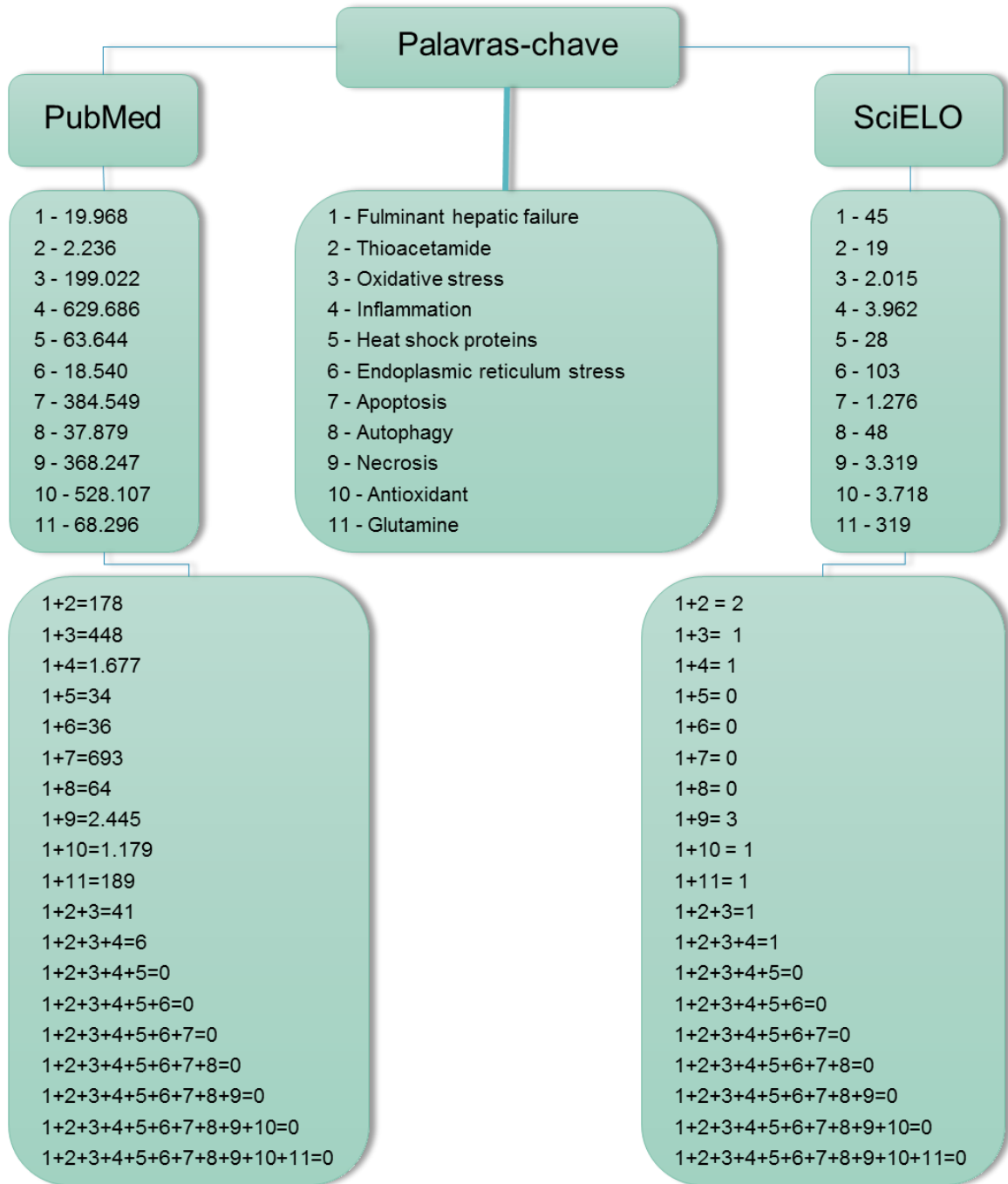


Figura 1. Estratégia utilizada para buscar referências bibliográficas. Fonte: autora.

## 2.2 Estrutura e função do fígado

O fígado é o maior órgão interno do organismo, pesando entre 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 (Coelho, 2012). Apresenta dois lobos (o direito com aproximadamente 6 vezes as dimensões do esquerdo) e oito segmentos. Cada segmento possui suprimento sanguíneo e canais biliares independentes (Gaboardi, 2011).

O fígado é um órgão vital, pois desempenha funções essenciais no organismo, com atividades de síntese e de excreção (Sherlock, 1997). Para realizar as suas funções, o fígado possui uma estrutura complexa (Figura 2), constituído por células hepáticas (hepatócitos), que se justapõem entre si, formando unidades morfológicas chamadas de lóbulos hepáticos (Carneiro, 1999).

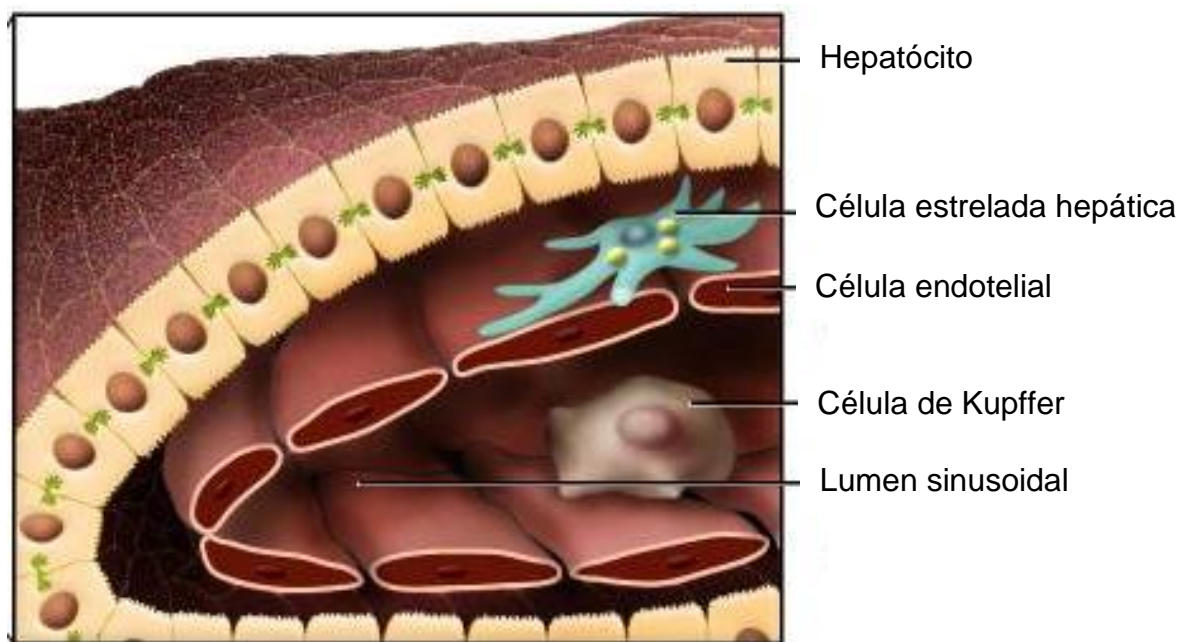


Figura 2. Esquema tridimensional da arquitetura do fígado normal. Fonte: adaptado de Bataller e Brenner, 2005.

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 veia porta. Na sua periferia há o espaço porta contendo o ducto biliar, ramos da veia porta e da artéria hepática (Gaboardi, 2011). No lóbulo, os hepatócitos dispõem-se em placas orientadas radialmente a partir de uma veia central, justapostas de forma ordenada por sinusoides hepáticos. Os sinusoides hepáticos representam uma rede vascular especial e é o local da convergência sanguínea entre a rede arterial hepática e o sistema porta do fígado. As células endoteliais sinusoidais são muito permeáveis e apresentam grandes fenestrações que favorecem as trocas metabólicas e na área periportal tem as células de Kupffer que ocupam o lúmen sinusoidal (Figura 3) (Gaboardi, 2011; Coelho, 2012).

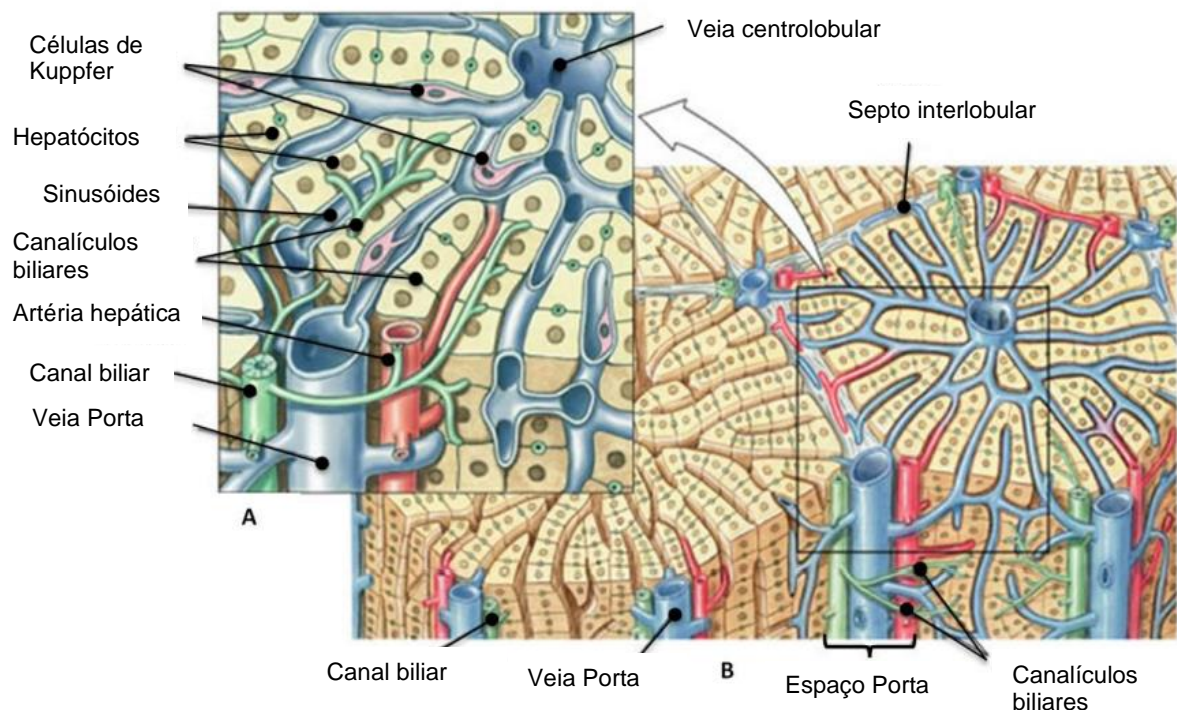


Figura 3. Lóbulos hepáticos e Espaço Porta. Fonte: Pearson Education, 2013.

As células de Kupffer, que são macrófagos especializados, são ativadas de várias formas, incluindo endotoxinas, sepse, choque, interferon- $\gamma$ , ácido araquidônico e fator de necrose tumoral (TNF). Como resultado dessa ativação ocorre produção de: citocinas, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, TNF $\alpha$ , interleucina (IL) 1, IL 6 e IL 10, interferon  $\alpha$  e  $\beta$ , fator transformador de crescimento e vários prostanóides (Gaboardi, 2011).

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 (Nunes, 2007).

### 2.3 Insuficiência hepática aguda grave

A Insuficiência hepática aguda grave (IHAG), frequentemente chamada de hepatite fulminante (HF), é uma síndrome clínica dependente de múltiplas etiologias, que pode ocorrer em pacientes sem doença prévia, grave e rápida, em dias ou poucas semanas, que decorre da perda súbita das funções hepatocitárias, associada à coagulopatia e encefalopatia hepática (EH) e frequentemente fatal. O transplante hepático é a terapia mais eficaz para esta situação, caracterizando uma emergência, nem sempre possível pela rápida progressão e ou escassez de órgãos, o que limita o seu uso (Singh *et al.*, 2014).

A conceituação original foi feita por Lucke e Mallory (1946), que definiram hepatite aguda fulminante “pelo aparecimento agudo de icterícia progressiva, redução volumétrica do fígado e coma hepático, com alargamento do tempo de protrombrina, hipertransaminasemia, além de aumentos nos valores sanguíneos de bilirrubina, nitrogênio e amônia”, com a falência hepática instalando-se em até oito semanas desde o início do quadro clínico (Mattos, 2010). 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 EH (Borges, 2010).

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 (Alberto *et al.*, 2009). No entanto, pacientes com

Hepatite Autoimune, Doença de Wilson, Hepatite B podem evoluir para IHAG, independentemente da presença de hepatopatia crônica (Larson, 2010).

### 2.3.1 Epidemiologia e Etiologia

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 autoimunes, entre outras causas (Strauss, 2011). Determinar a etiologia é essencial, uma vez que esta constitui o fator mais importante para a determinação do prognóstico (Alberto *et al.*, 2009).

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 (Mattos, 2010). Enquanto a IHAG induzida por drogas é mais comum na Europa e Estados Unidos da América, principalmente relacionada ao uso do paracetamol para suicídio. Estima-se cerca de 2.000 casos anuais de IHAG nos EUA, sendo que mais de 50% seria por drogas, das quais, 40% por paracetamol e 12% por reações idiosincráticas por fármacos (Alberto *et al.*, 2009; Borges, 2010).

Apesar dos avanços significativos nas técnicas de diagnóstico, os casos de etiologia indeterminada (criptogênico) variam entre 15 e 44% (Alberto *et al.*, 2009).

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 homeopias. A hepatotoxicidade é a principal razão pela qual alguns medicamentos e ervas são retirados do mercado (Alberto *et al.*, 2009; Borges, 2010; Strauss, 2011).

### 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 (Borges, 2010).

Na IHAG, a capacidade de metabolização de substâncias endógenas, como hormônios, bilirrubinas, vitaminas e de medicamentos, encontra-se depletada, razão pela qual há extrema precaução na prescrição de fármacos para estes pacientes, principalmente aqueles dependentes de passagem e metabolização hepática ou potencialmente hepatotóxicos (Strauss, 2011).

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 de coagulação sanguínea, sintetizados no fígado, e de meia-vida curta, também estão diminuídos na IHAG, como o fator V, alterando a atividade da protrombrina. 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 (Figura 3) (Shawcross *et al.*, 2004; Strauss, 2011).



Figura 4. Síntese da sequência de eventos que ocorrem na IHAG. Fonte: autora.

### 2.3.3 Manifestações clínicas e Diagnóstico

Os primeiros sintomas da IHAG são inespecíficos – náusea, mal-estar, fadiga. A icterícia é a manifestação importante sequencial e pode vir acompanhada pela EH, sintoma mais expressivo da IHAG, com toda sua gama de manifestações neuropsíquicas. O agravamento do quadro clínico de manifestações pelo aparecimento de alterações de coagulação, insuficiência renal aguda, alterações hemodinâmicas e metabólicas, insuficiência respiratória e deficiência nutricional, com a possibilidade de infecções bacterianas e/ou fúngicas e sepse caracteriza-se a síndrome de falência múltipla de órgãos (Figura 4). O surgimento de edema cerebral na IHAG, é causa frequente de mortalidade (Borges, 2010; Larson, 2010; Strauss, 2011; Paschoal Junior *et al.*, 2017).

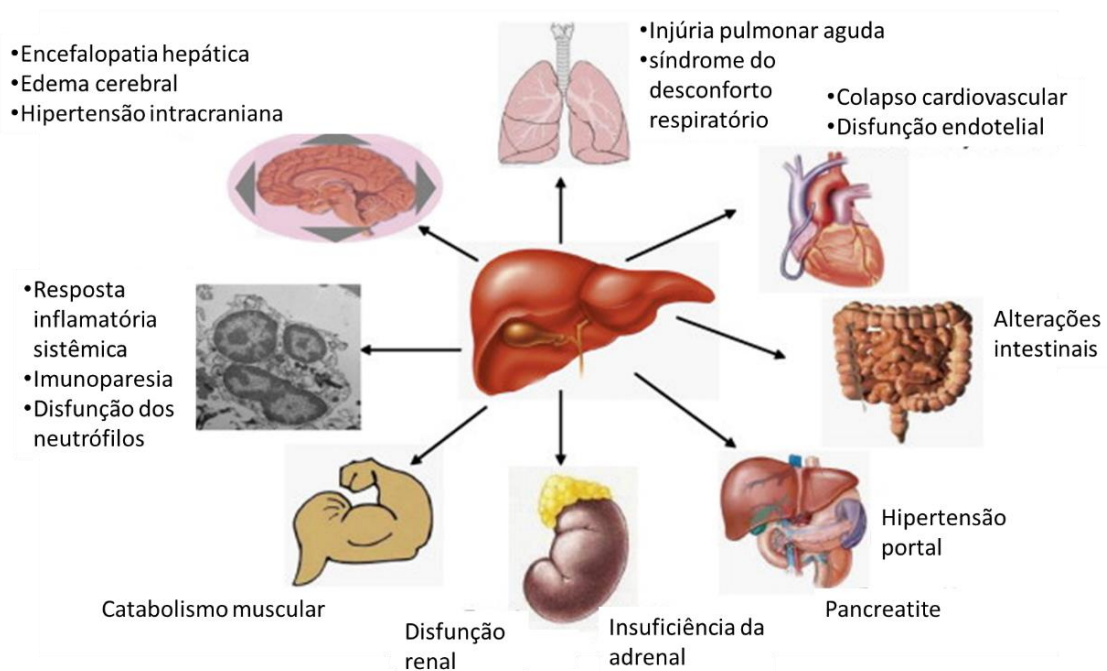


Figura 5. Manifestações sistêmicas da IHAG. Fonte: adaptado de Sharma, 2016.

O diagnóstico baseia-se 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 (Borges, 2010; Strauss, 2011).

### 2.3.4 Terapêutica e prognóstico

A abordagem terapêutica na IHAG, realizada em Unidade de Tratamento Intensivo, visa a monitorização hemodinâmica, correção dos desvios metabólicos e hidroeletrólítico, correção da coagulopatia, recuperação das funções renal e pulmonar, tratamento precoce de infecções bacterianas e fúngicas, possíveis suplementação nutricional e tentativa de impedir ou diminuir o edema cerebral e a consequente hipertensão endocraniana (Alberto *et al.*, 2009; Cardoso *et al.*, 2017).

Os fatores prognósticos de IHAG relacionam-se com a idade do paciente e a etiologia da doença. Os pacientes mais jovens e mais velhos têm pior prognóstico (<10 anos e >40 anos). A etiologia por vírus de Hepatite A ou E podem ter melhor prognóstico que aquelas com vírus de Hepatite B. A intoxicação por paracetamol, com possibilidade de tratamento precoce com N-acetilcisteína, pode resultar, atualmente, em mortalidade muito reduzida (Strauss, 2011).

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 (Chu *et al.*, 2005). 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 (Lee *et al.*, 2005).

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 (Strauss, 2011; Jaiprakash *et al.*, 2012).

Pesquisas científicas recentes indicam a relação do estresse oxidativo com alterações de substratos energéticos e no aumento da ativação de enzimas geradoras de espécies reativas de oxigênio (ERO) que promovem dano hepático além do papel das citocinas pró-inflamatórias e vasodilatadoras na fisiopatologia da doença (Bonomini *et al.*, 2015; Roul e Recchia, 2015; Vasallo e Gastaminza, 2015).

## 2.4 Estresse oxidativo

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 espécies reativas de oxigênio (ERO) (Figura 5) (Halliwell e Gutteridge, 2007; Halliwell, 2013). 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 (Halliwell, 1990; Oliveira, 2013).

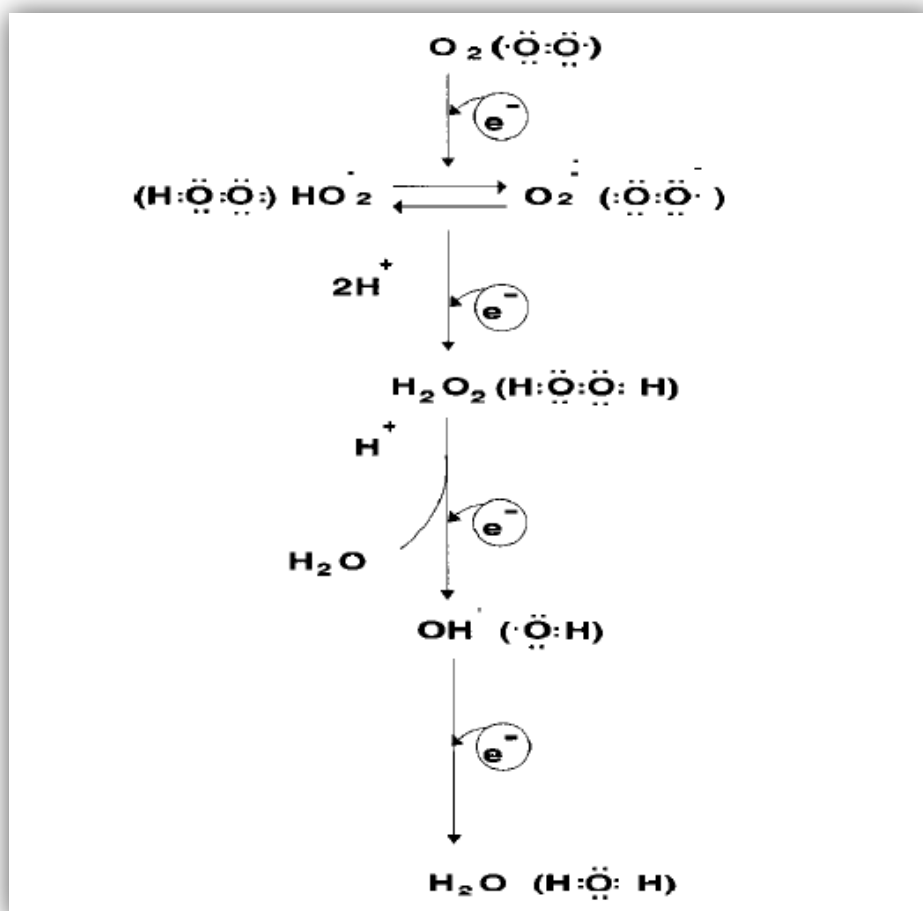
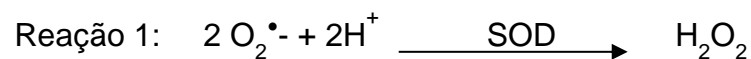


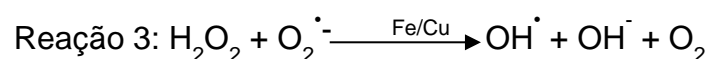
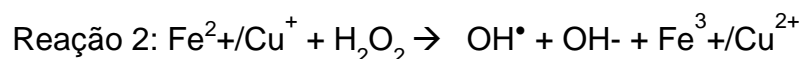
Figura 6. Redução do oxigênio molecular com formação de RL. Fonte: adaptado de Cohen, 1989.

Os intermediários da redução monovalente do  $O_2$  são o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). Dentre estes intermediários, o  $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$  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 (Hartmann, 2012; Halliwell, 2013; Schneider e Oliveira, 2014).

A adição de um elétron a uma molécula de  $O_2$  no estado fundamental gera a formação do radical  $O_2^{\cdot-}$ . 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) (Schneider e Oliveira, 2004).



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  $OH^{\cdot}$  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) (Halliwell, 1990; Schneider e Oliveira, 2004).





O  $\text{OH}^{\bullet}$  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 (Halliwell, 1990; Mação, 2006).

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” (Del Maestro, 1980). Por serem muito reativas, assim que se formam, essas moléculas reagem principalmente com os lipídios de membrana ocasionando o fenômeno denominado lipoperoxidação (LPO) (Halliwell, 2013).

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 (Hershko, 1989). A LPO também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (Shan *et al.*, 1990). Assim como na formação das ERO, nem sempre os processos de LPO são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. 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 6) (Halliwell, 1990; Halliwell, 2013).

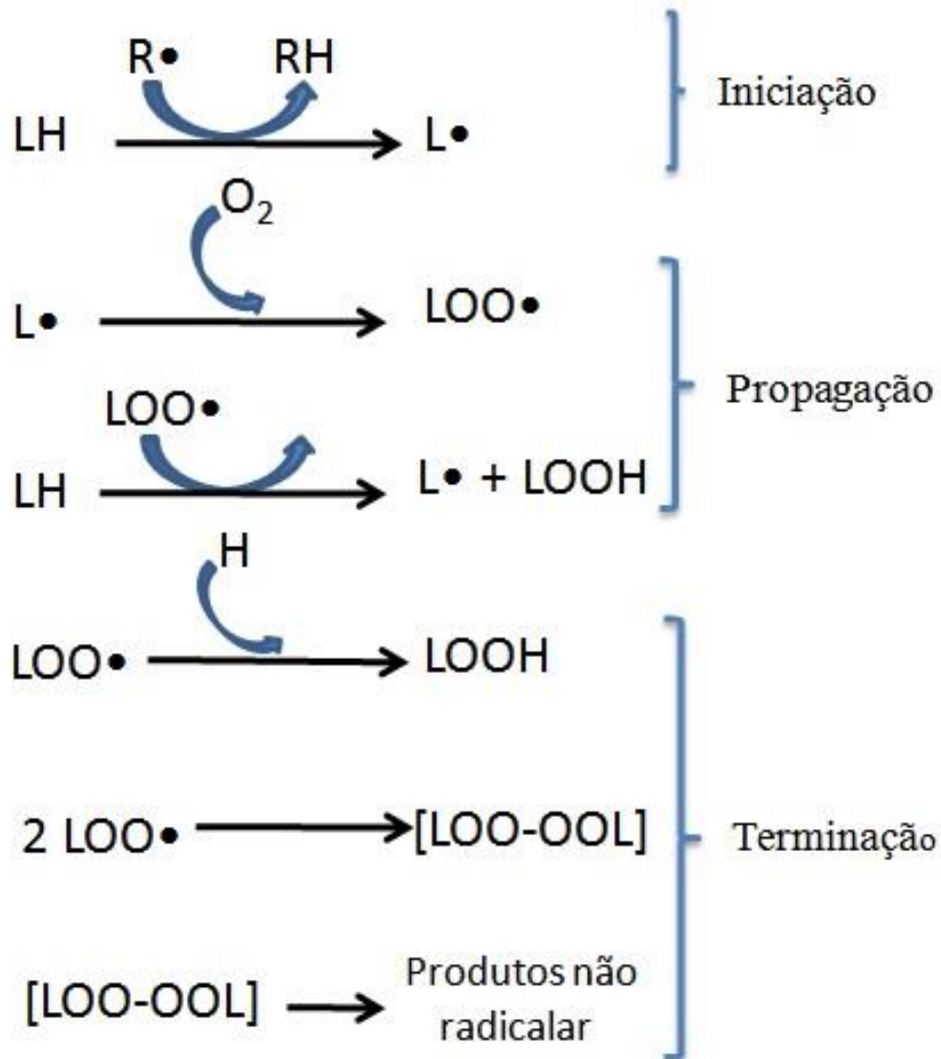


Figura 7. Etapas envolvidas na reação de lipoperoxidação. Fonte: Cunha, 2012.

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 (Cerretani *et al.*, 2011; Halliwell, 2013).

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) (Halliwell, 1990).

## 2.5 Estresse nitrosativo

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 reativas de nitrogênio (ERN) (Diesen e Kuo, 2010; Fang *et al.*, 1997).

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 (Liaudet *et al.*, 2000; Diesen e Kuo, 2010). 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 (Alican e Kubes, 1996). A principal via metabólica do NO envolve sua oxidação rápida a óxidos de nitrogênio superiores: nitrito ( $\text{NO}_2$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3$ ) (Figura 7) (Diesen e Kuo, 2010).

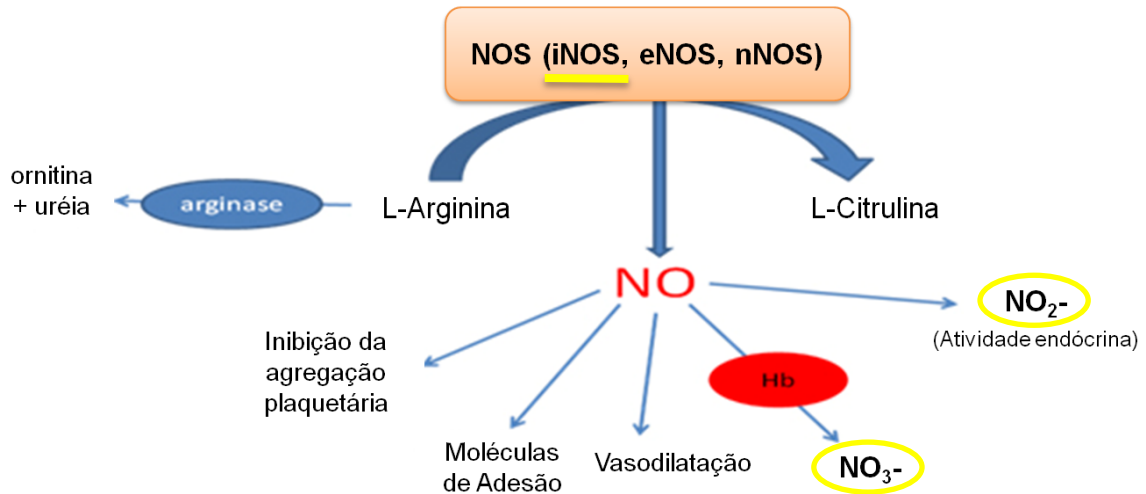


Figura 8. Metabolismo do óxido nítrico. Fonte: adaptado de Diesen e Kuo, 2010.

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  $O_2^{\bullet-}$  pode reagir diretamente com o NO levando à formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um oxidante bastante lesivo com características semelhantes ao  $OH^\bullet$  (reação 4) (Diesen e Kuo, 2010).



Atualmente, estudos sugerem que o metabolismo oxidativo e nitrosativo anormal pode ter uma grande importância na fisiopatologia de diversas doenças. Os efeitos prejudiciais decorrentes do EO e do EM podem ser pouco expressivos ou muito agressivos, incluindo peroxidação dos lipídios de membrana, danos 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 (Rodrigues, 2014).

Tanto as ERO quanto as ERN e outros RL são intermediários críticos na fisiologia e fisiopatologia dos hepatócitos (Diesen e Kuo, 2010).

## 2.6 Processo inflamatório na IHAG

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 (Borges, 2010).

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 (Borges, 2010; Cerretani *et al.*, 2011).

### 2.6.1 Receptor *toll-like 4*

O receptor *toll-like 4* (TLR4) é um membro da família de receptores de reconhecimento de padrões que desempenham papéis importantes na mediação das respostas inflamatórias associadas a patógenos e substâncias endógenas produzidas quando ocorre algum dano tecidual. A expressão desses receptores está diretamente envolvida na transdução de sinais bioquímicos que levam a ativação de genes envolvidos na produção de citocinas, de óxido nítrico e de outros parâmetros envolvidos nos processos inflamatórios. O TLR4 pode desencadear a resposta imune inata através da sinalização da proteína quinase ativada por mitógenos e da via de sinalização NF- $\kappa$ B, levando à ativação de citocinas pró-inflamatórias principalmente o TNF- $\alpha$  e as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (Elia *et al.*, 2015, Han e Li, 2018).

### 2.6.2 Citocinas

O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) está entre as principais citocinas envolvidas nos processos inflamatórios e possui alguns efeitos biológicos como a ativação de macrófagos e neutrófilos e aumento das moléculas de adesão envolvidas com o rolamento dos leucócitos, diferenciação celular e apoptose (Aggarwal, 2003). O TNF- $\alpha$  é induzido por uma série de estímulos que incluem

microrganismos, mediadores lipídicos, células tumorais e citocinas. O seu papel pró-inflamatório está associado à indução/produção de interleucinas (IL) e expressão de moléculas de adesão, assim como na ativação de fatores apoptóticos e regulação do sistema imune durante a inflamação aguda e crônica (Hu *et al.*, 2007, Hartmann, 2017).

A IL-1 é encontrada nas formas alfa (IL-1 $\alpha$ ) e beta (IL-1 $\beta$ ) e desempenha uma função central na regulação das respostas imunes e processos inflamatórios. A IL-1 $\beta$  promove a migração de leucócitos para locais de lesão ou infecção e sua produção normalmente é realizada por monócitos e macrófagos. A sua indução e consequente produção pode levar ao aumento da expressão de moléculas de adesão endotelial e estimulação da produção de interleucina-6 (IL-6), juntamente com o TNF- $\alpha$  (Ren e Torres, 2009; Rock *et al.*, 2010, Hartmann, 2017).

A IL-6 é uma citocina que desempenha um papel importante na homeostase do sistema imunológico e também no equilíbrio de vias pró e anti-inflamatórias em respostas ao estresse. A IL-6 pode ser produzida por diferentes células como monócitos, macrófagos e endoteliais e sua síntese e secreção pode ser induzida durante diferentes condições inflamatórias pela ativação dos receptores toll-like, LPS e pelo TNF- $\alpha$ . Essa citocina também tem sido considerada como marcador de quadros graves de inflamação em situações de trauma gastrointestinal (Ershler e Keller, 2000; Cerqueira *et al.*, 2005; Grootjans *et al.*, 2015, Hartmann, 2017).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida pelos leucócitos e por células não hematopoiéticas. Essa citocina desenvolve um papel regulatório controlando a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o TNF- $\alpha$ . Dessa forma, ela exerce funções chave na manutenção da homeostase do sistema imune e protege o organismo contra inflamação excessiva. A IL-10 exerce seus efeitos bloqueando os sinais dependentes de NF- $\kappa$ B inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Oliveira, 2017).

### 2.6.3 Fator de transcrição nuclear Kappa B

O fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) é um regulador gênico envolvido na maioria das respostas inflamatórias. Estas respostas fazem parte das reações à infecção ou à lesão e ajudam a proteger as células desses estresses (Dias *et al.*,

2005). O NF- $\kappa$ B pode ser ativado por uma variedade de sinais resultantes de fisiopatologia inflamatória. Esses estímulos podem ser intracelulares e/ou extracelulares, como: produtos bacterianos, vírus e componentes virais, protozoários, citocinas e RL (Zingarelli *et al.*, 2003; Fillmann *et al.*, 2007).

Dessa forma, o NF- $\kappa$ B regula a expressão de agentes envolvidos em um grande número de processos celulares, aumentando a taxa de transcrição de genes. A ativação do complexo NF- $\kappa$ 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- $\alpha$ , IL-1b, IL-2 e IL-6 (Figura 8) (Zingarelli *et al.*, 2003; Kwak *et al.*, 2010).

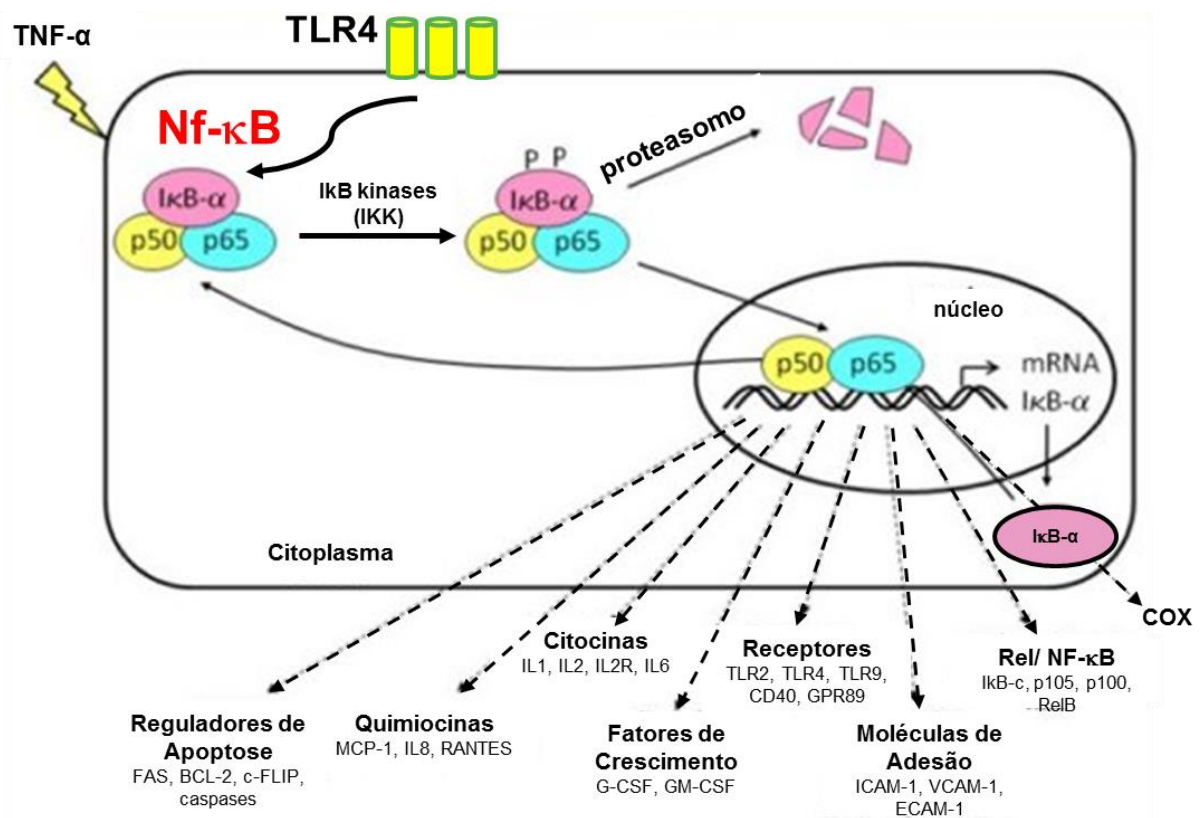


Figura 9. Via clássica de ativação do NF- $\kappa$ B. Fonte: adaptado de Zingarelli *et al.*, 2003.

## 2.7 Proteínas de choque térmico

Alterações funcionais e estruturais são reações biológicas observadas após evento estressante. A resposta do organismo irá depender tanto da intensidade

como da duração do estímulo estressor, ou seja, muitas vezes essa resposta é insuficiente para combater os danos sofridos, precisando de mecanismos de proteção ativados durante o estresse (Ritossa, 1962; Rodrigues, 2014). A família das proteínas de choque térmico (HSP do Inglês: *Heat Shock Proteins*) é considerada um grupo de moléculas altamente conservadas, presentes em diferentes espécies e tem como principal função promover o enovelamento correto de outras proteínas. As HSP são classificadas de acordo com seu peso molecular e são divididas em ATP-dependentes como as HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 e as ATP-independentes que incluem as HSP27 e HSP10. Tais proteínas, em condições fisiológicas, estão localizadas em locais distintos dentro da célula, como citoplasma, mitocôndria, RE e núcleo (Bozaykut *et al.*, 2014; Jee, 2016; Hartmann, 2017).

Embora as HSPs tenham recebido essa denominação por serem sintetizadas em condições de temperaturas acima de valor limiar, são proteínas expressas tanto em células eucariontes como procariontes em condições normais, e sua síntese é intensamente aumentada quando são expostas a vários estímulos nocivos, incluindo exercícios físicos, formação de ERO, infecções virais ou bacterianas, acumulação de metais pesados ou etanol, isquemia, inibidores da ciclo-oxigenase, entre outros igualmente eficazes (Ritossa, 1962; Locke *et al.*, 1995; Neuer *et al.*, 2000; Rodrigues, 2014).

As HSPs estão localizadas na mitocôndria, no citoplasma, na superfície celular ou soro, porém, são predominantemente proteínas intracelulares e são conhecidas como chaperonas por possuírem importante função em adaptação ao estresse e proteção celular, atuando principalmente na síntese e degradação proteica, além de regular processos celulares fundamentais, tais como formação, segregação, degradação e conformação de proteínas, e ressolubilização de agregados proteicos (Bozaykut *et al.*, 2014; Rodrigues, 2014; Jee, 2016; Hartmann, 2017).

A classificação das HSPs depende do peso molecular e apresentam localização e função específica nas células. As famílias mais referenciadas são as HSP27, HSP60, HSP70 e HSP90 kDa (Bozaykut *et al.*, 2014).

O fator de transcrição de choque térmico 1 (HSF1) é essencial na modulação da expressão de HSP. Sob condições não estressadas, o HSF1 encontra-se inativo no citoplasma associado com as HSPs (HSP90, HSP70) que se ligam ao HSF1



bloqueando sua atividade transcricional. Em resposta ao estresse, seja ambiental, como altas temperaturas, toxicidade de metais, ERO, análogos de aminoácidos, toxinas ou reações fisiopatológicas, como hipóxia ou isquemia, hipertrofia, envelhecimento, apoptose, inflamação, ou infecção bacteriana e outras lesões teciduais, as HSP dissociam-se do complexo que ativa o HSF1. Após a translocação nuclear, o HSF1 liga-se a sequências específicas no DNA, denominadas de elementos de choque térmico (HSE) para ativar a transcrição dos genes HSP, a fim de promover proteção celular para manter a homeostase e consequente sobrevivência da célula (Figura 9) (Bozaykut *et al.*, 2014; Hartmann, 2017; Chatterjee e Burns, 2017).

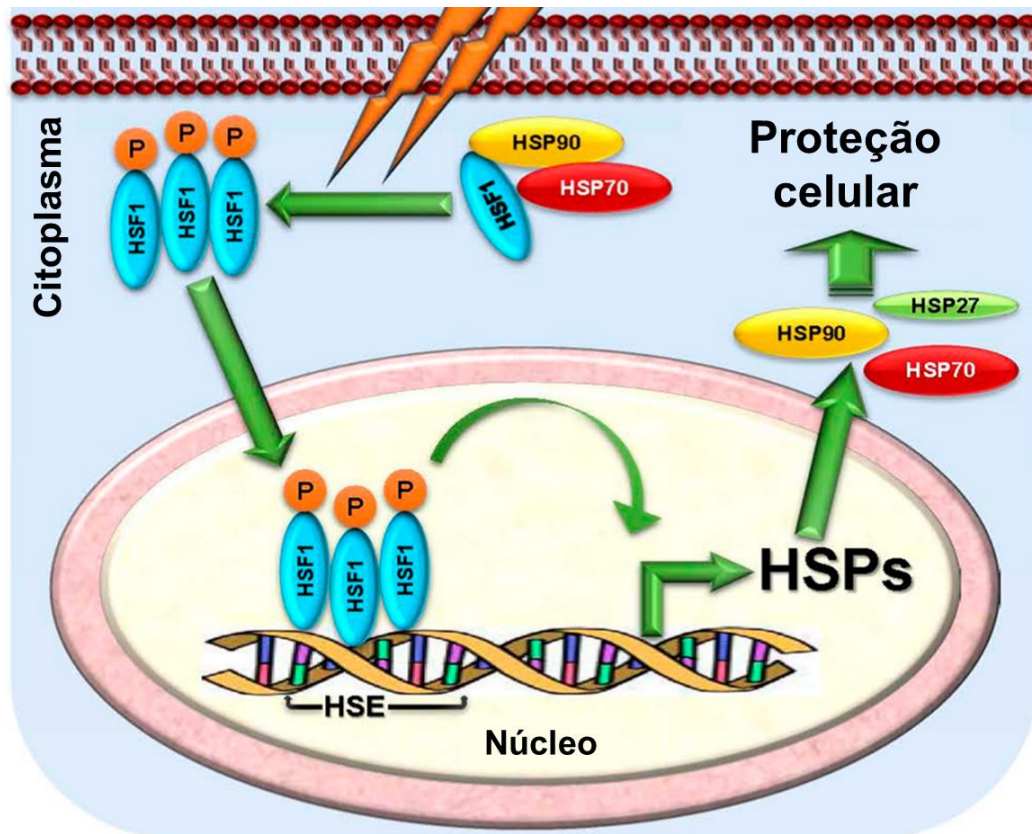


Figura 10. Ativação de proteínas de choque térmico. Fonte: adaptado de Chatterjee e Burns, 2017.

## 2.8 Estresse de retículo endoplasmático

O RE é a organela celular responsável pela síntese, dobramento e modificação de peptídeos e proteínas, ou seja, é essencial para função e

sobrevivência celular. Perturbações no metabolismo celular podem prejudicar a síntese proteica, causando o acúmulo de proteínas mal dobradas, o que caracteriza o estresse do RE e induz ativação da via de sinalização intracelular denominada UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*) (Schroder, 2008; Braakman e Hebert, 2013).

A UPR é mediada a partir da ativação de três proteínas transmembranas do RE, conhecidas como *inositol-requiring enzyme-1* (IRE-1), *PKR-like ER-regulated kinase* (PERK) e o *activating transcription factor 6* (ATF6) e pela chaperona *glucose-regulated protein 78 kDa* (GRP78). Em condições normais, a GRP78 (ou BiP), se liga ao domínio amino-terminal de IRE1 e PERK e ao domínio carboxi-terminal do ATF6, mantendo-os inativos (Doroudgar *et al.*, 2009; Braakman e Hebert, 2013).

Durante a ativação da via da UPR, a GRP78 se dissocia das proteínas do RE, pois possui maior afinidade por proteínas não dobradas localizadas no lúmen do RE, permitindo que a IRE1 e PERK fiquem livres para serem ativadas. A dissociação da GRP78 com o ATF6 libera este para o complexo de Golgi onde sofre clivagem proteolítica. O fragmento gerado migra até o núcleo e induz a expressão de vários genes da via UPR como as proteínas GRP78 e CHOP (C/EBP homologous protein) que pode ativar a apoptose caso a célula seja exposta a um estresse crônico do RE (Figura 10) (Rosa, 2011; Basha *et al.*, 2012).

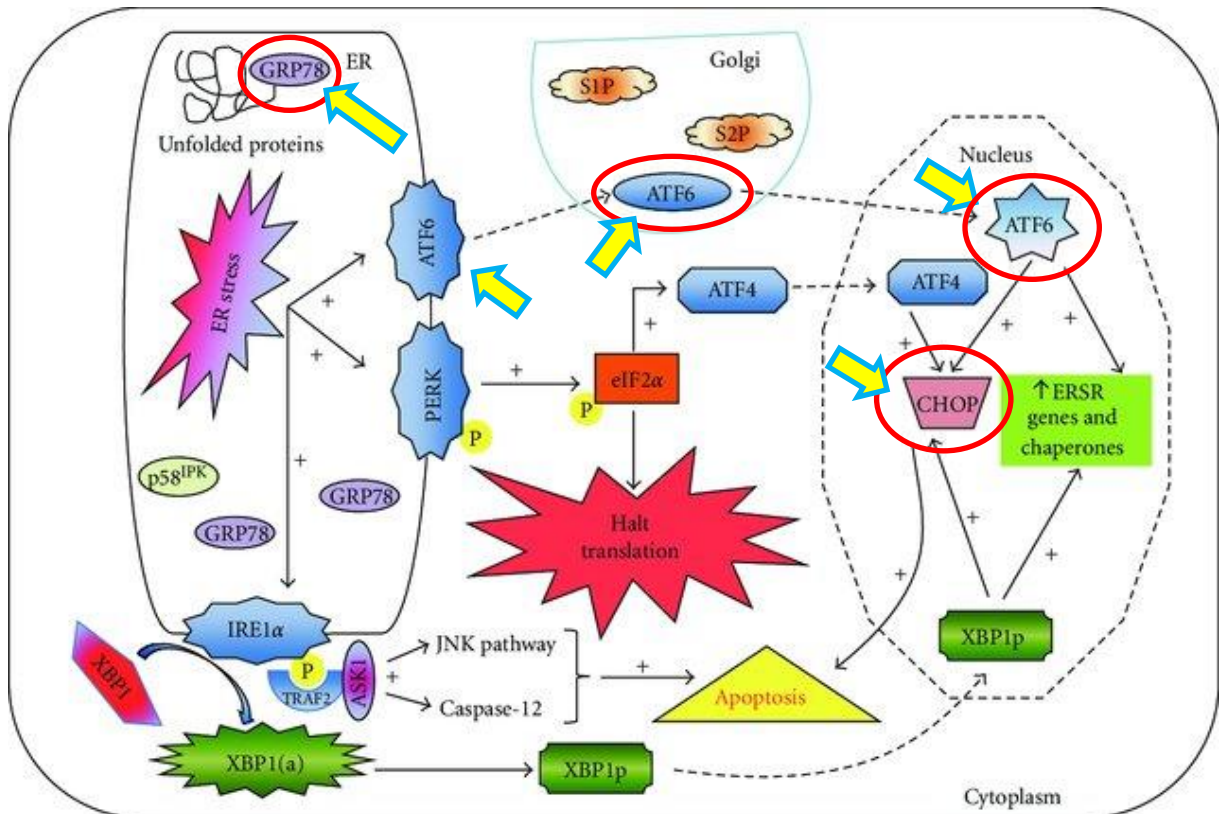


Figura 11. Proteínas associadas ao estresse de RE. Fonte: adaptado de Basha *et al.*, 2012.

A inibição do estresse de RE tem um papel importante na sobrevivência da IHAG relatado em modelos animais. Rao e colaboradores (2015) demonstraram que o aumento da CHOP promove dano no fígado de ratos com insuficiência hepática. Tuñón e colaboradores (2013) demonstraram que o estresse de RE estava aumentado na insuficiência hepática fulminante induzida pelo vírus da doença hemorrágica do coelho. Em outro estudo experimental, foi sugerido que existe uma ligação potencial entre estresse ER e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) na regeneração hepática da insuficiência hepática aguda em ratos, onde foi relatado que a produção de HGF pode ser afetada pelo estresse de ER e a supressão do estresse de ER alivia a insuficiência hepática aguda mantendo a expressão de HGF (Liu *et al.*, 2017).

## 2.9 Mediadores de vias de sinalização

A fim de manter o equilíbrio entre o processamento e o carregamento de proteínas ocorre a ativação de vias de sinalização que são fundamentais para a sobrevivência da célula. A proteína quinase serina / treonina (Akt) é um alvo da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que funciona como uma molécula de sinalização para muitos genes alvo e um regulador preciso do ciclo celular (Kuanga *et al.*, 2018).

A via de sinalização PI3K/Akt é essencial na regulação do crescimento e proliferação celular, absorção de glicose e sobrevivência celular através de vários mecanismos. A PI3K promove uma cascata de sinalização que ativam moléculas relacionadas à sobrevivência celular e a Akt responde a múltiplos estímulos na célula (Li *et al.* 2017).

As proteínas da classe *forkhead* O (FOXO) formam uma família de fatores de transcrição, incluindo FOXO3a, que são fosforilados e regulados pela Akt, resultando em uma ampla gama de processos biológicos. Uma maneira pela qual Akt promove proliferação e sobrevivência celular é via FoxO3a, resultando no seu sequestro no citoplasma de genes envolvidos em diversos mecanismos de ação dentro da célula (Figura 11) (Fluteau *et al.* 2015; Kuanga *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm demonstrado que o crescimento e a sobrevivência celular estão relacionados com a ativação da via PI3K / Akt / FoxO3a (Skarra e Thackray, 2015; Park *et al.*, 2016; You *et al.*, 2016; Kuanga *et al.*, 2018).

Dessa forma, essas vias de sinalização são importantes reguladores de sinais de sobrevivência ou morte celular (Li *et al.* 2017).

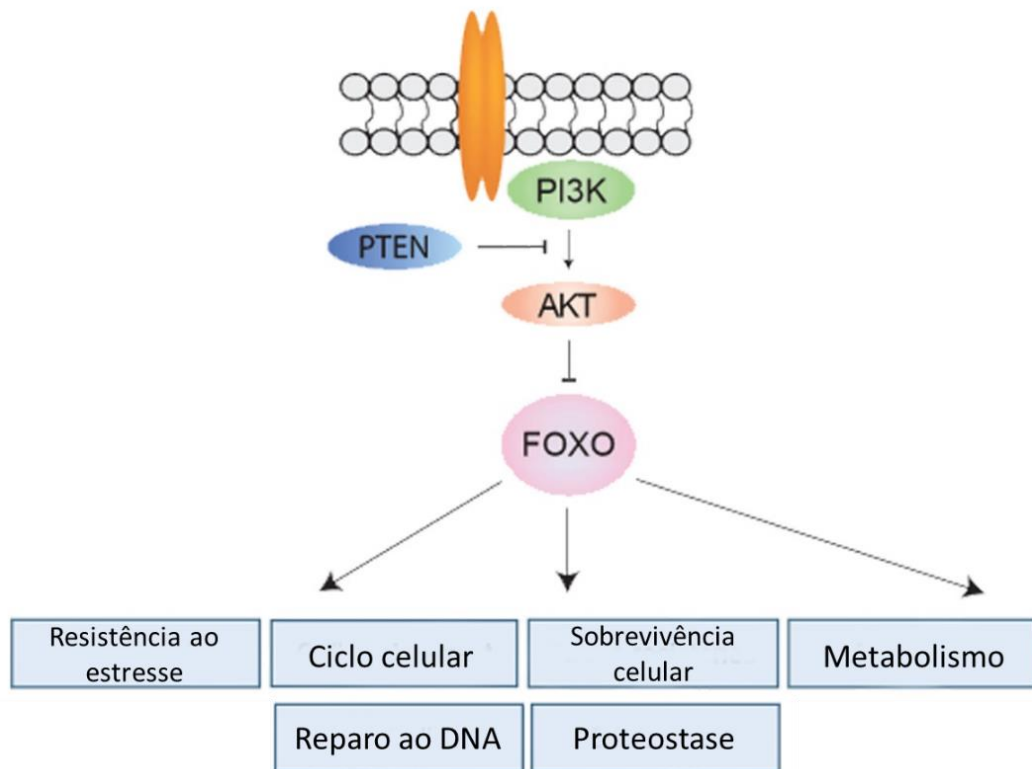


Figura 12. Mediadores de vias de sinalização. Fonte: Adaptado de Kim e Webb, 2017.

## 2.10 Mecanismos de morte celular na IHAG

A IHAG ocorre quando a morte celular excede a capacidade de regeneração hepática como resultado de danos avassaladores em consequência de eventos específicos de sinalização.

Em organismos multicelulares, a morte celular é um processo crítico e ativo que mantém a homeostase dos tecidos e elimina as células potencialmente nocivas. Em geral, existem três tipos de morte celular, definidos em grande parte pelo aparecimento da célula em colapso: apoptose (também conhecida como morte celular tipo I), morte celular autofágica (tipo II) e necrose (tipo III) (Figura 12) que podem ser executados através de vias de sinalização distintas, e às vezes sobrepostas, envolvidas em resposta a estímulos específicos (Galluzzi *et al.*, 2007; Parzych e Klionsky, 2014; Green e Llamby, 2015).

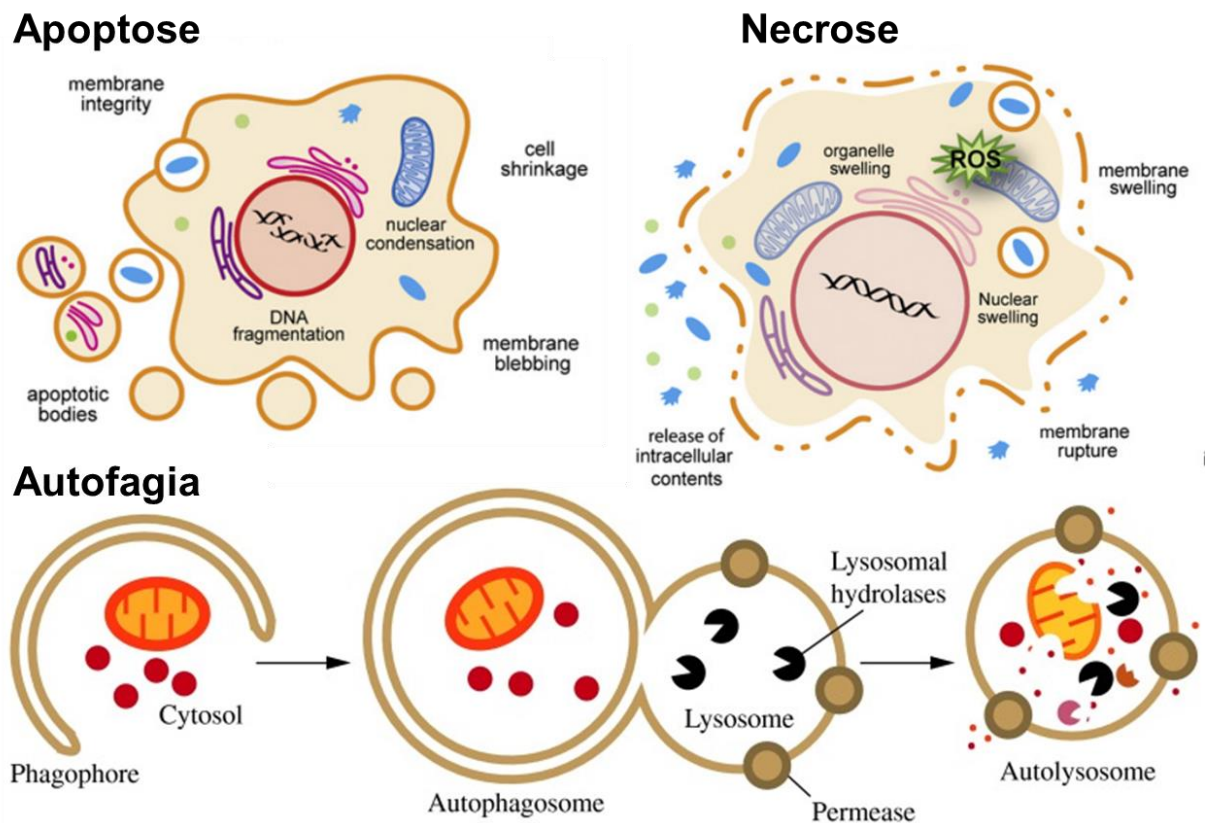


Figura 13. Tipos de morte celular. Fonte: adaptada de Parzych e Klionsky (2014) e Lamkanfi e Dixit, (2014).

### 2.10.1 Apoptose

A apoptose representa uma morte celular programada, dependente de ATP, e leva à reabsorção do citoplasma e núcleo, minimizando a resposta inflamatória. Pode ainda ser definida como morte celular acompanhada pela ativação de proteases de caspases. Duas vias principais de sinalização desencadeiam a morte celular apoptótica: a via mitocondrial (intrínseca) e a via do receptor de morte (extrínseca) que envolve uma interação clássica entre ligante e superfície celular. A via mitocondrial da apoptose, é desencadeada pela perda da integridade da membrana externa mitocondrial, que permite a liberação de fatores pró-apoptóticos da mitocôndria para o citosol. Este processo é controlado pela família de proteínas Bax/Bcl2 (Green e Llambi, 2015; Galluzzi *et al.* 2012).

As Bax (Proteína X associada a bcl-2) são proteína efetoras pró-apoptóticas que contribuem para a liberação do citocromo C mitocondrial intermembranar. Essas proteínas geralmente são inativas em condições normais, mas são ativadas em

resposta a eventos de estresse celular. A Bcl2 (Linfomas de células B2) são proteínas anti-apoptóticas, que se ligam e inibem as proteínas Bax. Dessa forma, o complexo de proteínas Bax/Bcl2 integra sinais pró e anti-apoptóticos em células saudáveis e estressadas e, portanto, constitui um dos principais nós de sinalização na decisão de vida ou morte celular (Green e Llambi, 2015).

A apoptose envolve a ativação de caspases, que orquestram todas as alterações morfológicas que caracterizam essa forma de morte celular. As caspases executoras, como a caspase 3, leva na maioria dos casos, à fase final da apoptose (Figura 13), que se caracteriza por condensação da cromatina, degradação do DNA, diminuição do volume citoplasmático, formação de vesículas na superfície e exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática (Glesse, 2011; Lamkanfi e Dixit, 2014; Green e Llambi, 2015).

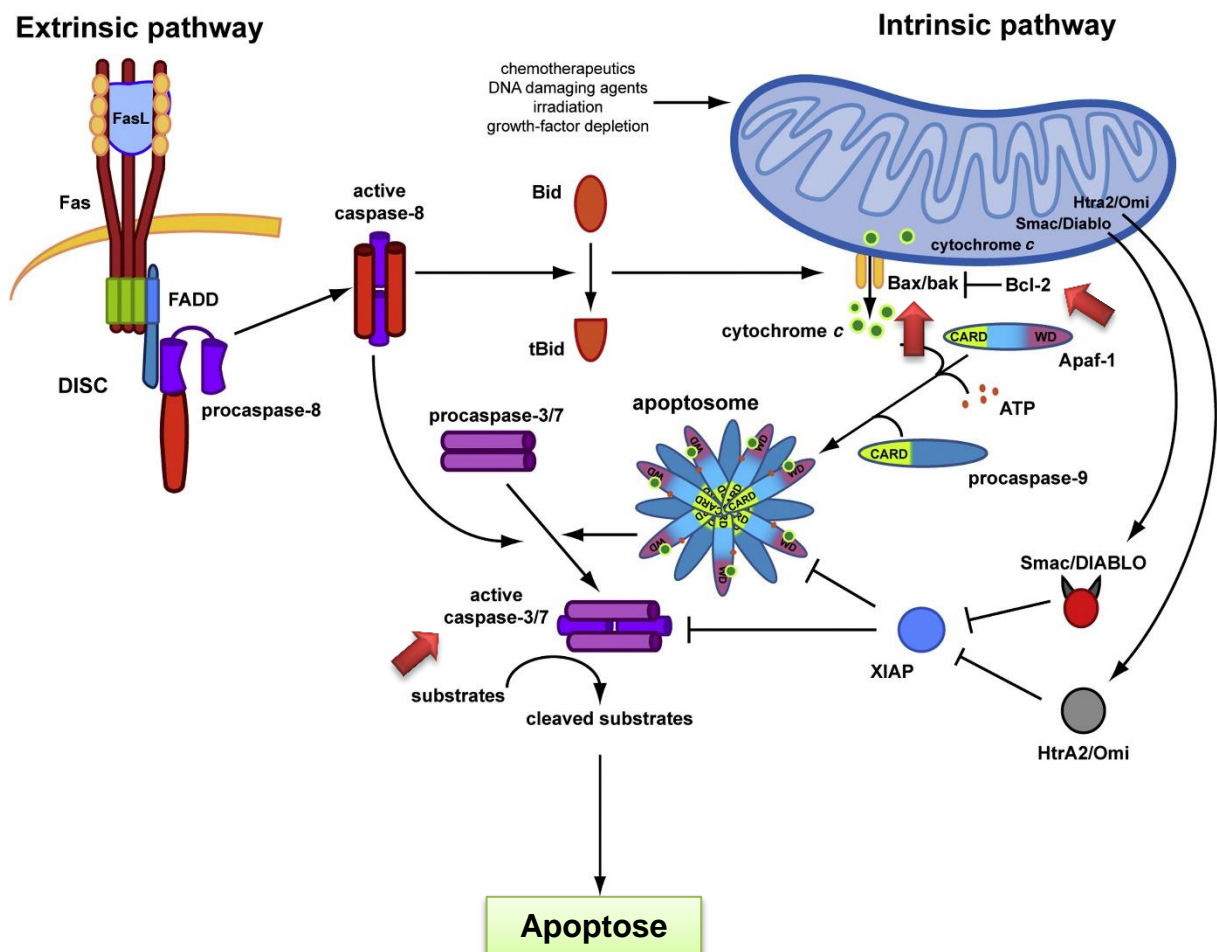


Figura 14. Visão geral das vias de apoptose. Fonte: adaptado de Lamkanfi e Dixit, 2014.

### 2.10.2 Autofagia

Autofagia é um processo celular fisiológico para degradação e reciclagem de componentes do citosol e organelas celulares danificadas, para manutenção da homeostase celular em condições adversas como privação de nutrientes, presença de patógenos e toxinas. Porém, quando o processo ultrapassa um determinado limiar pode levar ao processo de morte autofágica ou morte celular programada tipo II. Em células de mamíferos, existem três tipos principais de autofagia: microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por chaperonas. Embora cada um seja morfológicamente distinto, todos os três culminam na entrega de carga ao lisossomo para degradação e reciclagem. Dos três tipos, a macroautofagia (aqui denominada apenas autofagia) é a melhor estudada (Galluzzi *et al.*, 2007; Vallejo *et al.*, 2014; Parzych e Klionsky, 2014).

Esse processo catabólico envolvendo autodegradação de componentes celulares ocorre por meio da via lisossomal que atua como mecanismo de sobrevivência e pode participar na resposta do hospedeiro à infecção. O processo autofágico participa no estresse oxidativo e na remoção de proteínas e organelas danificadas pelo processo oxidativo. Desempenha um papel multifuncional na defesa do organismo, removendo patógenos e modulando respostas imunes inata e adaptativa. O mecanismo começa com o engolfamento de quantidades em massa de citoplasma por vesículas de dupla membrana, denominada autofagossomos, que se fundem com os lisossomos, formando um autolisossomo em que o constituinte é subsequentemente degradado (Figura 14) (Vallejo *et al.*, 2014; Galluzzi *et al.*, 2015; Cicchini).



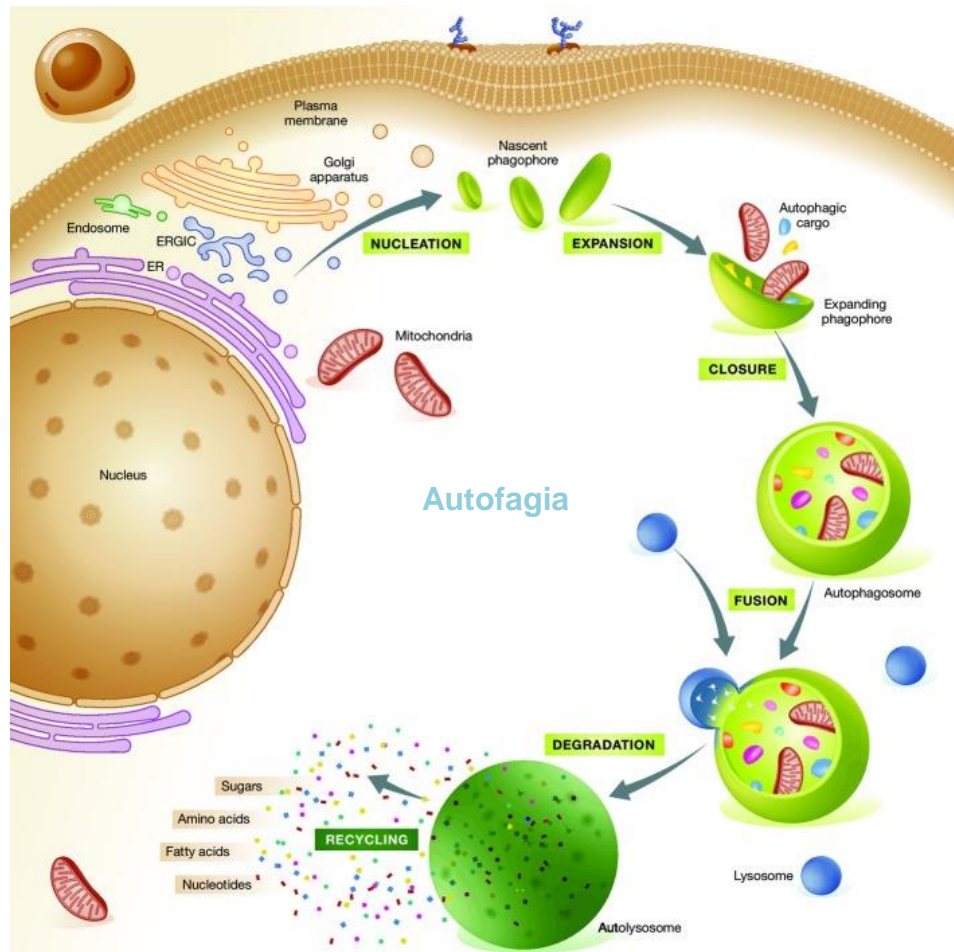


Figura 15. Organização geral da resposta autofágica. Fonte: Galluzzi *et al.*, 2015.

A nível molecular esse processo é rigorosamente regulado. O melhor repressor caracterizado de respostas autofágicas é a proteína alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR). A formação e maturação do autofagossomo é regulada pela função sequencial de múltiplas proteínas e genes relacionadas à autofagia (ATG) que recrutam e ativam o complexo de iniciação composto por Beclin-1 (*coiled-coil, moesin-like BCL2 interacting protein*). O alongamento e fechamento definitivo do autofagossomo é regulado por dois sistemas distintos, mas complementares de conjugação da proteína semelhante à ubiquitina: as vias de conjugação ATG5-12 e LC3 (Parzych e Klionsky, 2014). As proteínas marcadoras de autofagia LC3-I (proteína associada a microtúbulos de cadeia leve 3 - 1), sofre uma clivagem C-terminal quando um sinal pró-autofágico é percebido pela célula, sendo convertida, assim, à forma II (LC3-II). Esta, sofre modificações e passa a se localizar

especificamente na membrana de autofagossomos (Figura 15) (Galluzzi *et al.*, 2007; Cicchini *et al.*, 2015).

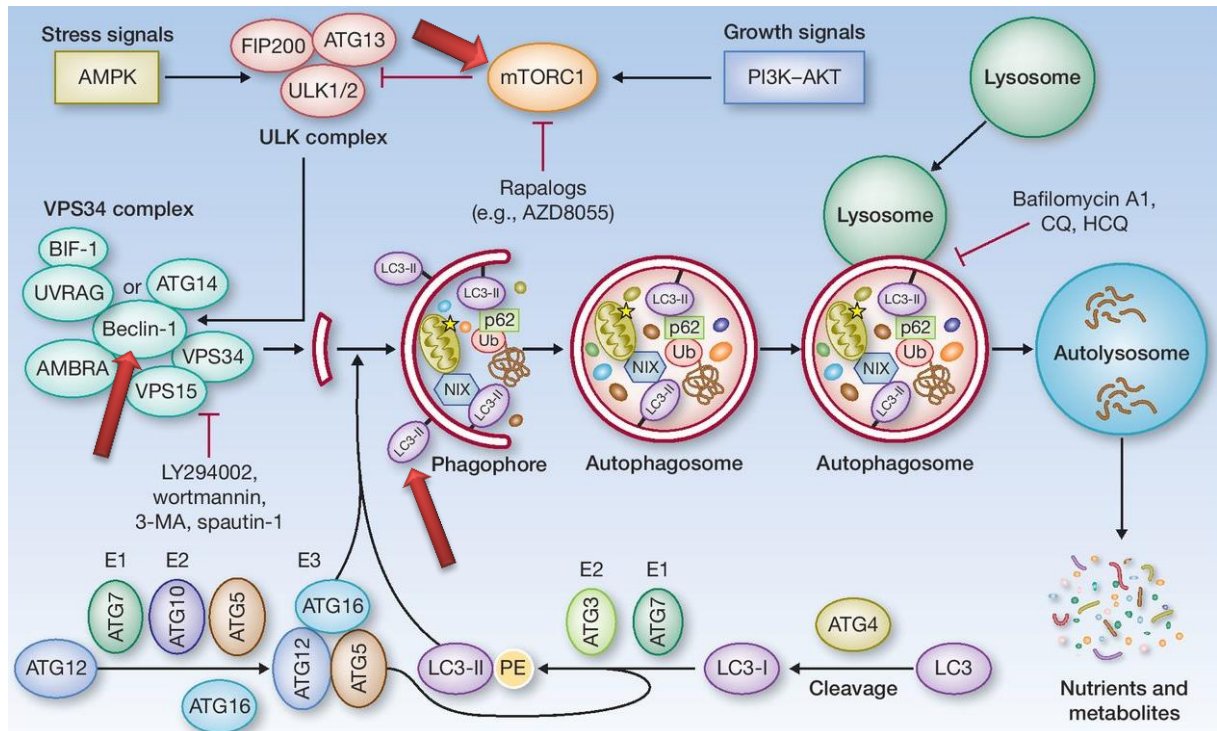


Figura 16. Processo autofágico. Fonte: adaptada de Cicchini *et al.*, 2015.

A formação do autofagossomo desempenha um importante papel na proliferação celular, na formação do estresse oxidativo e na auto-degradação de agregados proteicos. A interação entre a autofagia e morte celular programada é complexa, dados recentes sugerem a existência de uma relação cruzada entre vias autofágicas e apoptóticas (Galluzzi *et al.*, 2012; Cicchini *et al.*, 2015).

### 2.10.3 Necrose

O termo "necrose" deriva da palavra grega "nekros", que significa "corpo morto". Tradicionalmente, a necrose tem sido usada para se referir a áreas localizadas de tecido morto sem se referir a um mecanismo específico pelo qual ocorreu a morte celular. No entanto, o termo também descreve um modo de morte celular independente de caspase que pode ser observado sob condições de isquemia, hipóxia, neoplasia, infecção microbiana, inflamação e exposição a toxinas (Lamkanfi e Dixit, 2014).

A necrose envolve a depleção de ATP, que resulta em tumescência celular, associada a pequenas protrusões da membrana celular designadas vesículas, que resultam da perda do controle do volume celular e de perturbações do citoesqueleto. Posteriormente, ocorre a despolarização mitocondrial, ruptura dos lisossomos, fluxo iônico bidirecional, aceleração da formação de vesículas e da tumescência celular, que culmina com a ruptura da membrana plasmática, quebra dos gradientes elétricos e osmóticos membranares, liberação de enzimas citoplasmáticas e intermediários metabólicos (desidrogenase láctica, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e ferritina) e resposta inflamatória secundária. Consequentemente, a necrose é considerada um modo de morte celular inerentemente pró-inflamatório e patológico que resulta em extenso dano tecidual (Pobezinskaya *et al.*, 2008; Lamkanfi e Dixit, 2014).

A necrose tem sido considerada como um modo de morte celular exclusivamente acidental que não envolve sinalização celular. No entanto, a evidência acumulada indica uma base programada para necrose. Por exemplo, quando a ligação do receptor de morte falha em ativar as caspases para induzir a apoptose, a montagem do disco e a sinalização intracelular podem resultar em morte celular necrótica. Acredita-se que a ativação de substratos de quinase ainda não identificados induza necrose por meio do aumento da produção de ERO, ativação da calpaína, desestabilização lisossomal e liberação de catepsina (Figura 16) (Vandenabeele *et al.*, 2006; Pobezinskaya *et al.*, 2008; Lamkanfi e Dixit, 2014).

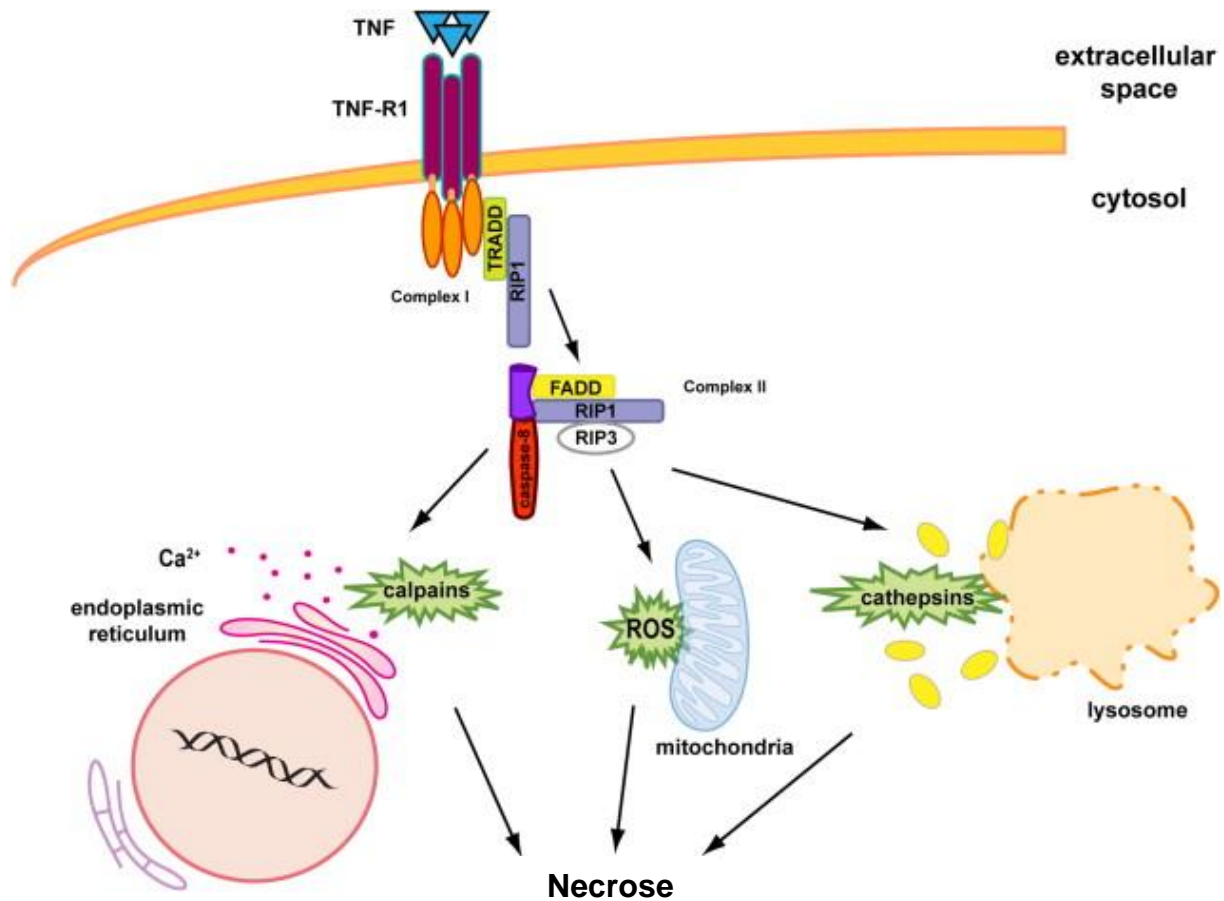


Figura 17. Vias de sinalização celular proposta para necrose. Fonte: Lamkanfi e Dixit, 2014.

## 2.11 Modelos experimentais de IHAG

A pesquisa em modelos experimentais de IHAG tem uma função extremamente importante para o estudo da fisiopatogenia da doença. A eficácia dos modelos experimentais de insuficiência hepática pode auxiliar na avaliação de diversos aspectos e marcadores moleculares, bem como o uso eficaz de drogas indutoras da doença (Terblanche e Hickman, 1991; Rodrigues, 2008; David *et al.*, 2011; Schemitt *et al.*, 2016; Miguel *et al.*, 2016; Salvi *et al.*, 2017).

Os modelos animais de IHAG são classificados em modelos cirúrgicos, modelos químicos e a combinação entre cirúrgico e químico. Os modelos químicos (drogas hepatotóxicas) são amplamente utilizados no desenvolvimento de IHAG experimental. As drogas mais comumente utilizadas são galactosamina, tetracloreto de carbono, paracetamol, tioacetamida, entre outras (Rodrigues, 2008).

Os critérios que um modelo experimental para o desenvolvimento da IHAG deve satisfazer, foram sugeridos em um estudo clássico, onde avaliou-se as exigências de um modelo animal ideal. Os autores sugeriram: 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 (Terblanche e Hickman, 1991).

## 2.12 Xenobióticos

Os seres vivos estão continuamente expostos a um grande número de compostos químicos naturais e/ou não naturais, potencialmente tóxicos tanto de origem endógena como exógena e estão dotados de sistemas enzimáticos que facilitam a eliminação destas substâncias. Estes compostos são denominados xenobióticos e podem interagir de maneira deletéria ao organismo. (Matos, 1999; Lima, 2008).

O metabolismo dos xenobióticos desenvolveu-se como uma forma de proteção contra as toxinas. A maioria dos fármacos e outros xenobióticos são metabolizados e transformados total ou parcialmente em outras substâncias. As enzimas encarregadas de realizar estas transformações se encontram principalmente no fígado. Essas enzimas são as mono-oxigenases de função mista, o citocromo C redutase e o citocromo P-450 (Matos, 1999; Wang *et al.*, 2000).

As enzimas do citocromo P-450 são os catalisadores mais importantes envolvidos na biotransformação de xenobióticos tais como fármacos, pesticidas, hepatocarcinógenos e produtos naturais. O citocromo P-450 também intervém no metabolismo oxidativo de substâncias endógenas como esteroides, vitaminas lipossolúveis, ácidos biliares, entre outros (Matos, 1999).

A detoxificação enzimática de xenobióticos pode ser classificada em duas fases distintas: reações de fase I e de fase II (Figura 17). As enzimas de fase I, ou enzimas de ativação, representadas pela superfamília do citocromo P450, convertem o xenobiótico, tornando-o mais eletrofílico que pode resultar em: inativação; conversão de um produto inativo ou outro ativo; conversão de um

produto ativo em outro também ativo cuja atividade terapêutica pode ser similar ou distinta ao fármaco original; conversão de um produto ativo em outro igualmente ativo, porém resultando em atividade tóxica. Já as enzimas de fase II, ou de detoxificação, normalmente atuam com a conjugação dos metabólitos com um substrato endógeno mediante a ação de enzimas transferases (Matos, 1999; Lima, 2008).

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. (Lima, 2008; Glesse, 2011).

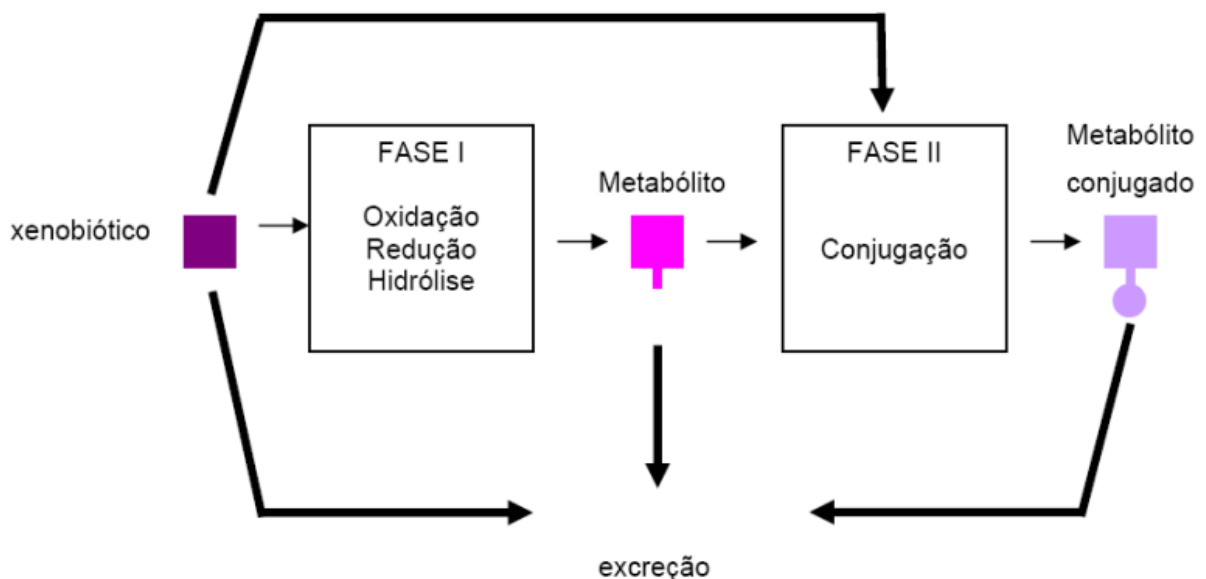


Figura 18. Vias de biotransformação de xenobióticos. Fonte: Glesse, 2011.

Quando os produtos formados na fase I não sofrem inativação ou são metabolizados em substâncias mais reativas pelas enzimas da fase II, 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 (Fedets, 2014; David *et al.*, 2014). Os substratos (eletrofílicos) mais comuns das glutatona transferases incluem: haletos de alquila, compostos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados (como quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas,

lactonas e ésteres), haletos de arila, nitro aromáticos, dimetilnitrosamina e tioacetamida (Losi-Guembarovski; 2001; Huber, 2008).

### 2.12.1 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 (Wang *et al.*, 2000; Lima, 2008). 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 (Lima, 2008; David *et al.*, 2011).

A TAA requer ativação metabólica para que seu efeito seja tóxico. Essa bioativação ocorre através do complexo microsomal citocromo P-450 formado por diversas enzimas, dentre as quais a CYP2E1 parece ser a mais implicada no metabolismo da TAA (Yogalakshmi *et al.*, 2010; Hames, 2011). 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 (Figura 18) (Lima, 2008; Hames, 2011). Este composto é responsável por causar o dano hepático induzido pela TAA uma vez que é capaz de formar ERO e necrose (Porter e Neal, 1978; Chilakapati *et al.*, 2005; David *et al.*, 2011; Schemitt *et al.*, 2016; Miguel *et al.*, 2016; Salvi *et al.*, 2017).

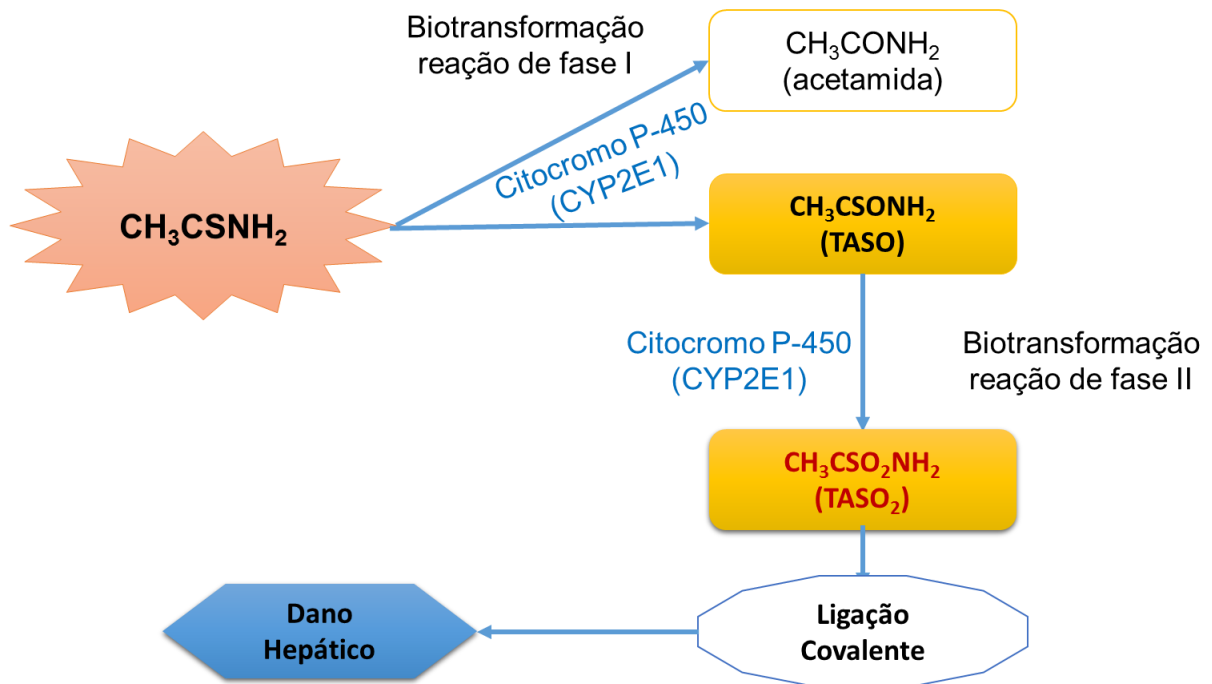


Figura 19. Metabolismo da tioacetamida que leva à lesão tecidual. Fonte: adaptado de Porter e Neal, 1978.

### 2.13 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 (Halliwell, 2013). 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 (Sies, 1991).



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, glutaciona 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 19). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as ERO (Halliwell, 2012).

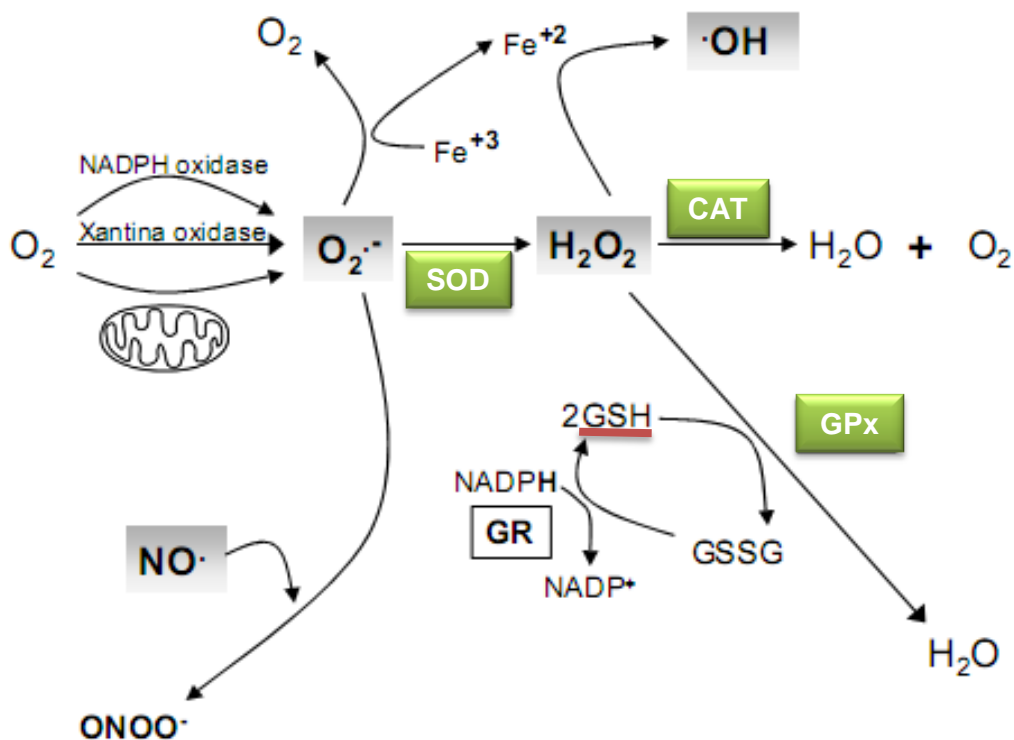


Figura 19. Ações das enzimas do sistema de defesa antioxidante. Fonte: adaptado de Halliwell, 1990.

As células apresentam ainda outras enzimas importantes para a ação antioxidante, como a família das enzimas detoxificadoras denominadas glutionas 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 glutaciona em sua forma reduzida (GSH) a estes compostos, aumentando a sua solubilidade e, assim, facilitando a sua excreção (Figura 20) (Losi-Guembarovski, 2001; Fedets, 2014).

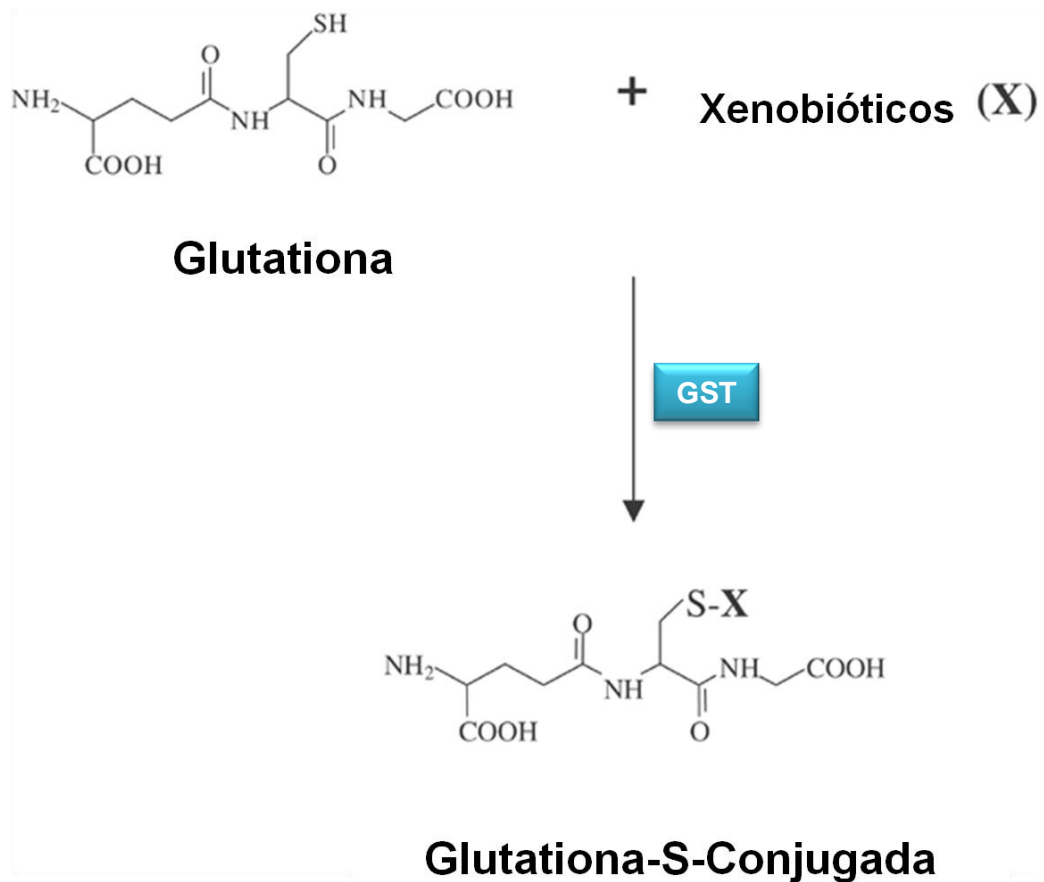


Figura 20. Conjugação de GSH com um xenobiótico genérico. Fonte: adaptado de Fedets, 2014

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 (Mação, 2006).

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),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno (precursor de vitamina A) e grupos fenóis de plantas (flavonoides), além da glutathiona e da glutamina (Halliwell, 2013).

## 2.14 Glutamina

A glutamina (Gln) (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Figura 21) é um L- $\alpha$ -aminoácido, com peso molecular de aproximadamente 146, kDa e pode ser sintetizada por todos os tecidos do organismo. É o aminoácido livre mais abundante no organismo, tornando-se um importante combustível e precursor metabólico para as células imunes. Em humanos, representa cerca de 20% do total de aminoácidos livres no plasma. Fazem parte de sua composição química: carbono (41,09%), oxigênio (32,84%), nitrogênio (19,17%) e hidrogênio (6,90%). A Gln é classificada de acordo com seu grupamento R como não carregada, mas é polar, o que significa uma característica mais hidrofílica, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases (Boza *et al.*, 2000; Curi *et al.*, 2005; Cruzat *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2014).



Figura 21.

da molécula de glutamina. Fonte: adaptado de Curi *et al.*, 2005.

Estrutura química

Não era considerada um aminoácido essencial porque é sintetizada 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 se estabelece um quadro de deficiência de Gln e, por esta razão, este aminoácido foi recentemente reclassificado como essencial (Curi *et al.*, 2005; Cruzat *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2014).

A Gln 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 glutathiona. Está presente em diferentes tecidos, em que este aminoácido desempenha diferentes funções fisiológicas. (Curi *et al.*, 2005; Huber, 2008).

O sistema da glutathione é um dos maiores mecanismos de redução do estresse oxidativo. A Gln 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 glutathione total em modelos hepáticos e intestinais (Prem *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 2014).

A Gln 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 Gln ingerida pela dieta (aproximadamente 5g/dia) é menos importante que a circulante, especialmente em condições de doença, associadas com redução substancial na ingestão de alimento (2005; Lin *et al.*, 2014; Zuhl *et al.*, 2015).

Em situações com hipercatabolismo, ou seja, cirurgias, ferimentos, queimaduras, ocorre uma deficiência intracelular de Gln, com uma aceleração muscular, e fluxo de glutamina no pulmão e dano epitelial no intestino (Boza *et al.*, 2000; Zuhl *et al.*, 2015).

A Gln pode influenciar uma variedade de funções e vias de sinalização celular. A modulação da expressão de genes relacionados com a síntese e degradação de proteínas, a proliferação celular e a ativação de vias envolvidas com a apoptose celular estão entre os papéis exercidos pela Gln mais estudados (Curi *et al.*, 2005; Cruzat *et al.*, 2009; Medras *et al.*, 2018).

Sabe-se que a Gln modula a ativação de proteínas de estresse ou choque térmico que estão relacionadas com a resposta antiapoptótica celular. A ativação dessas proteínas corresponde a uma das principais vias de sinalização que contribuem para o aumento da capacidade da célula de sobreviver a alterações na sua homeostasia em decorrência da exposição a agentes estressores, como radiação ultravioleta (UV), calor, agentes infecciosos e ERO (Gabai e Sherman, 2002; Cruzat *et al.*, 2009; Zuhl *et al.*, 2015).

A Gln é capaz de diminuir o estresse oxidativo e reduzir a liberação de citocinas inflamatórias. Diversos estudos têm demonstrado que a glutamina é capaz de proteger em situações de isquemia-reperusão hepática, isquemia-reperusão

intestinal, lesão hepática induzida por álcool, diabetes, colite ulcerativa, insuficiência hepática e nas alterações decorrentes da hipertensão portal (Fillmann, 2007; Kretzmann *et al.*, 2008; Sozen *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Schemitt *et al.*, 2016; Hartmann *et al.*, 2017; Zobot *et al.*, 2017; Medras *et al.*, 2018).

### 3 MARCO CONCEITUAL

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 o processo de morte hepatocelular.

Neste trabalho, abordamos as questões envolvidas no processo oxidativo e inflamatório decorrentes do modelo de IHAG induzida por tioacetamida, bem como avaliamos as proteínas de choque térmico, o estresse de retículo endoplasmático, as vias de apoptose, autofagia e necrose, avaliando os efeitos da glutamina neste modelo experimental (Figura 22).

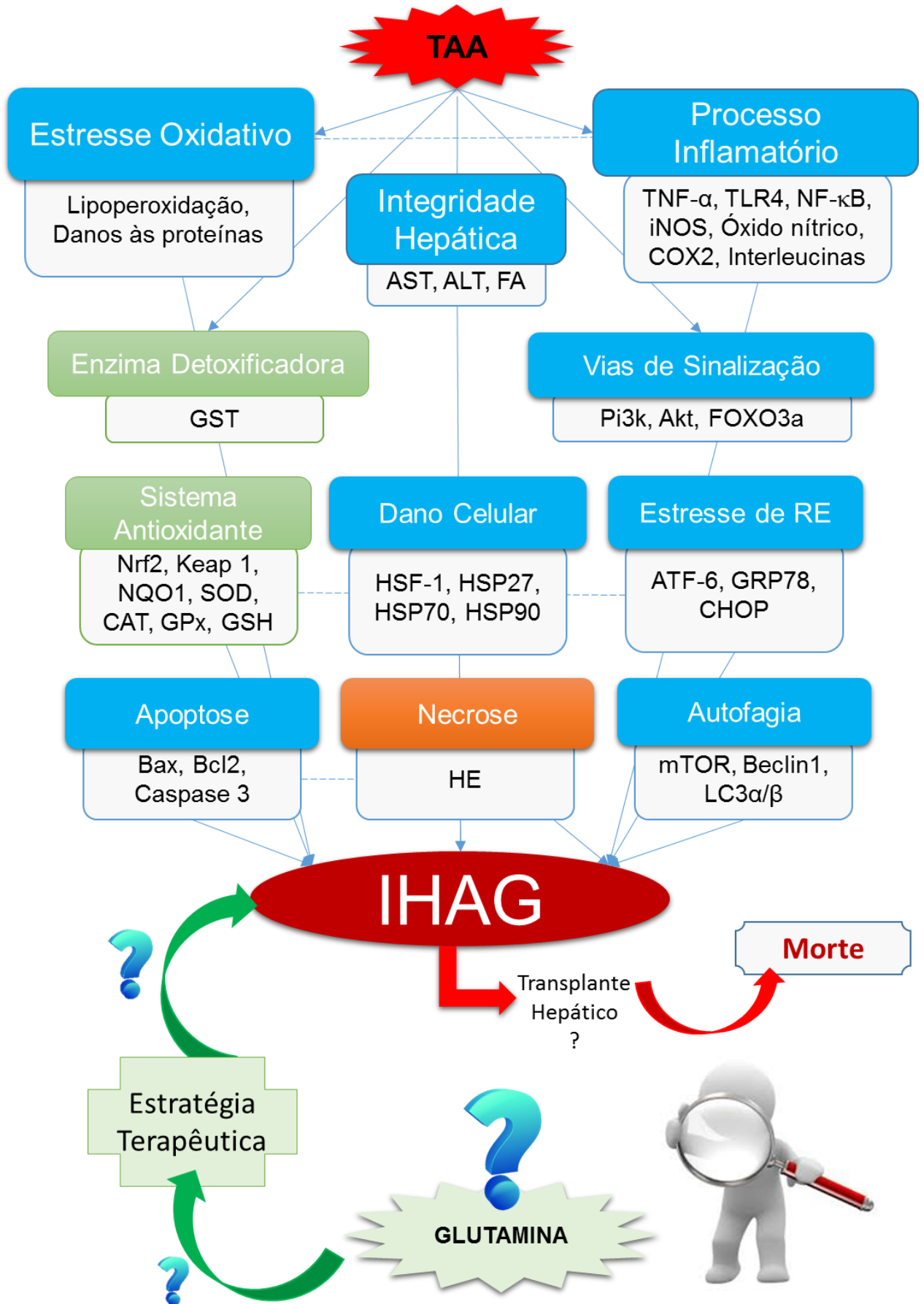


Figura 22. Marco conceitual esquemático do estudo. Fonte: autora.

#### 4 JUSTIFICATIVA

A IHAG é uma síndrome clínica de alta letalidade, sendo o transplante hepático um dos únicos tratamentos efetivos.

Em algumas situações de etiologia específica, intoxicação pelo paracetamol, a medicação N-acetilcisteína, usado precocemente, pode curar.

O uso de drogas hepatotóxicas, como a TAA, que desenvolvam a síndrome de IHAG é importante para o conhecimento das rotas fisiopatogênicas e fisiopatológicas envolvidas na síndrome, além de permitir o conhecimento e eventual ação de substâncias eficazes com finalidade terapêutica.

O uso da Glutamina foi baseado em investigações prévias do grupo de pesquisa. 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, por esse motivo, avaliamos a ação da glutamina no modelo experimental de insuficiência hepática aguda grave.

Esta pesquisa, envolvendo a insuficiência hepática aguda grave induzida por tioacetamida verifica a ação de glutamina como possível terapêutica.



## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da glutamina sobre os marcadores de estresse oxidativo e de retículo e morte celular no fígado de ratos wistar com IHAG, induzida por tioacetamida, na tentativa de elucidar a ação da glutamina nesse modelo experimental.

### 5.2 Objetivos Específicos

*5.2.1 Objetivos específicos do Artigo I: Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure* enviado para publicação na revista World Journal of Hapatology.

- Avaliar as provas 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) e Fosfatase Alcalina (FA),
- Verificar as características histopatológicas da IHAG no fígado dos animais através de coloração de hematoxilina e eosina.
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo, mediante avaliação da lipoperoxidação, da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, da atividade da enzima detoxificadora GST, a da expressão do fator nuclear Nrf2, seu inibidor KEAP1 e da proteína NQO1;
- Determinar os níveis de GSH no fígado dos animais;

- Avaliar o processo inflamatório através da análise das proteínas iNOS, TNF- $\alpha$ , Nf- $\kappa$ B, das citocinas IL1 $\beta$ , IL6 e IL10 e dos metabólitos do óxido nítrico – nitritos e nitratos.

*5.2.2 Objetivos específicos do Artigo II: Glutamine modulates heat shock proteins, endoplasmic reticulum stress and cell death in rats with thioacetamide-induced liver failure* enviado para publicação na revista Protoplasma.

- Avaliar as provas de integridade hepática através da análise das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST);
- Avaliar as alterações do parênquima hepático dos animais, por microscopia;
- Quantificar as proteínas totais e os níveis de proteínas carboniladas no fígado dos animais;
- Analisar o envolvimento das proteínas de choque térmico, no tecido hepático, através da avaliação da expressão de HSF-1, HSP27, HSP70 e HSP90.
- Avaliar o estresse de retículo endoplasmático, no tecido hepático, mediante análises da expressão de ATF6, GRP78 e CHOP;
- Avaliar a expressão de mediadores de vias de sinalização celular;
- Analisar no tecido hepático, o processo de morte celular, mediante a expressão das proteínas relacionadas à apoptose (Bax Bcl2 e caspase 3) e relacionadas à autofagia (mTOR, Beclin-1 e LC3 $\alpha/\beta$ ).

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745-56.

Alberto SF, Pires SS, Figueiredo A, Deus JR. Acute liver failure. *Acta Med Port*. 2009;22(6):809-20.

Alican I, Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol*. 1996;270(2 Pt 1):G225-37.

Basha B, Samuel SM, Triggle CR, Ding H. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: possible involvement of endoplasmic reticulum stress? *Exp Diabetes Res*. 2011;2012:481840.

Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115(4):1100.

Berne, RM; Levy MN, Stanton BA, Koeppen BM. *Fisiologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

Bona, S. Melatonina protege o fígado em um modelo experimental de cirrose. Tese (Doutorado em Medicina: Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 2014.

Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Aging Dis*. 2015;6(2):109-20.

Borges TPS. Insuficiência Hepática Aguda. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Universidade do Porto. Cidade do Porto, PT;2010.

Boza JJ, Moënnos D, Jarret AR, Vuichoud J, Garcia-Ròdenas C, Finot PA, Ballèvre O. Neither glutamine nor arginine supplementation of diets increase glutamine body stores in healthy growing rats. *Clin Nutr*. 2000;19(5):319-25.

Bozaykut P, Ozer NK, Karademir B. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free Radic Biol Med*. 2014;77:195-209.

Braakman I, Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(5):a013201.

Cardoso FS, Marcelino P, Bagulho L, Karvellas CJ. Acute liver failure: An up-to-date approach. *J Crit Care*. 2017;39:25-30.

Carneiro JJ, Carneiro L. *Histologia Básica*. 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 1999.

Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras*. 2005; 20(4):336-43.

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 $\alpha$ -mediated apoptosis in rat liver. *Pharmacol Res.* 2011;64(5):517-27.

Chatterjee S, Burns TF. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(9):pii:E1978.

Chilakapati J, Shankar K, Korrapati MC, Hill RA, Mehendale HM. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(12):1877-85.

Chu CJ, Hsiao CC, Wang TF, Chan CY, Lee FY, Chang FY, Chen YC, Huang HC, Wang SS, Lee SD. Prostacyclin inhibition by indomethacin aggravates hepatic damage and encephalopathy in rats with thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. *World J Gastroenterol.* 2005;11(2):232-6.

Cicchini M, Karantza V, Xia B. Molecular Pathways: Autophagy in Cancer-A Matter of Timing and Context. *Clin Cancer Res.* 2015;21(3):498-504.

Coelho JCU. *Aparelho Digestivo - Clínica e Cirurgia.* 4ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2012.

Cohen MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? *Ann Intern Med* 1989;111:918-31.

Cruzat VF; Petry ER; Tirapegui J. Glutamine: biochemical, metabolic, molecular aspects and supplementation. *Rev Bras Med Esporte.* 2009;15(5):392-7.

Cunha D. Representação das etapas da peroxidação lipídica. Disponível em: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Representa%C3%A7%C3%A3o\\_da\\_etapas\\_da\\_peroxida%C3%A7%C3%A3o\\_lip%C3%ADica.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Representa%C3%A7%C3%A3o_da_etapas_da_peroxida%C3%A7%C3%A3o_lip%C3%ADica.jpg). Acesso em 10/10/2018.

Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme P. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol.* 2005;204:392-401.

David C, Rodrigues G, Bona S, Meurer L, González-Gallego J, Tuñón MJ, Marroni NP. Role of quercetin in preventing thioacetamide-induced liver injury in rats. *Toxicol Pathol.* 2011;39(6):949-57.

David C. A Quercetina protege o fígado na lesão hepática induzida por tioacetamida (TAA) e suas complicações. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 2011.

Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1980;492:153-68.

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;135(10):2299-304.

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;162(1):95-109.

Elia PP, Tolentino YF, Bernardazzi C, de Souza HS. The role of innate immunity receptors in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:936193.

Ershler WB, Keller ET. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 2000;51:245-70.

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;236(3):706-11.

Fedets OM. Structure and functions of glutathione transferases. *Ukr Biokhim Zh.* 2014;86(3):23-32.

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;236(3):217-26.

Fluteau A, Ince PG, Minett T, Matthews FE, Brayne C, Garwood CJ, Ratcliffe LE, Morgan S, Heath PR, Shaw PJ, Wharton SB, Simpson JE; MRC. The nuclear retention of transcription factor FOXO3a correlates with a DNA damage response and increased glutamine synthetase expression by astrocytes suggesting a neuroprotective role in the ageing brain. *Neurosci Lett.* 2015;609:11-7.

Gabai VL, Sherman MY. Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol.* 2002;92:1743-8.

Gaboardi MTCO. Anatomia e Fisiologia do Fígado. In: *Hepatologia: Sociedade Brasileira de Hepatologia*; 2011:3p.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007;14:1237-43.

Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V, Kimmelman A, Kumar S, Levine B, Maiuri MC, Martin SJ, Penninger J, Piacentini M, Rubinsztein DC, Simon HU, Simonsen A, Thorburn AM, Velasco G, Ryan KM, Kroemer G. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* 2015;34(7):856-80.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107-20.

Glesse N. Estudos dos polimorfismos dos genes de enzimas de metabolização/detoxificação na susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 2011.

Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(12).pii:a006080.

Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JP, Matthijsen RA, de Bruïne AP, van Bijnen AA, van Dam RM, Dejong CH, Buurman WA. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. *Am J Pathol.* 2010;176(5):2283-91.

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 4th edn. New York: Oxford University Press Inc; 2007.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012;70(5):257-65.

Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Commun.* 1990;9(1):1-32.

Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol.* 2013;75(3):637-44.

Hammes TO. Efeito da Taurina sobre a Esteatose Hepática induzida por tioacetamida em *Danio rerio*. Dissertação (Mestrado em Ciências em Gastroenterologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 2011.

Han K, Li YP. Prognostic predictive value of TLR4 polymorphisms in Han Chinese population with hypertrophic cardiomyopathy. *Kaohsiung J Med Sci.* 2018;34(10):569-575.

Hartmann RM, Licks F, Schemitt EG, Colares JR, do Couto Soares M, Zabot GP, Fillmann HS, Marroni NP. Protective effect of glutamine on the main and adjacent organs damaged by ischemia-reperfusion in rats. *Protoplasma.* 2017;254(6):2155-2168.

Hartmann RM. O efeito antioxidante da *Boswellia serrata* no modelo experimental de colite induzida por ácido acético. Dissertação (Mestrado em Medicina: Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 2012.

Hartmann, RM. Glutamina protege dos danos no intestino e fígado em modelo de isquemia e reperfusão intestinal. 2017. Tese (Doutorado em Medicina: Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2017.

Hershko C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. *Semin Hematol.* 1989;26(4):277-85.

Hu S, Ciancio MJ, Lahav M, Fujiya M, Lichtenstein L, Anant S, Musch MW, Chang EB. Translational inhibition of colonic epithelial heat shock proteins by IFN-gamma and TNF-alpha in intestinal inflammation. *Gastroenterology.* 2007;133(6):1893-904.

Huber PA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*. 2008;31(5):14.

Jaiprakash H, Narayana S, Mohanraj J. Drug-induced hepatotoxicity in a tertiary care hospital in rural South India. *N Am J Med Sci*. 2012;4(2):90-3.

Jee H. Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review. *J Exerc Rehabil*. 2016;12(4):255-9.

Katherine R. Parzych and Daniel J. Klionsky. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(3): 460-473.

Kretzmann NA, Fillmann H, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni N, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ (2008) Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(11):1504-13.

Kuang WH, Dong ZQ, Tian LT, Li J. IGF-1 defends against chronic-stress induced depression in rat models of chronic unpredictable mild stress through the PI3K/Akt/FoxO3a pathway. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018;34(7):370-6.

Kwak JH, Jung JK, Lee H. Nuclear factor-kappa B inhibitors; a patent review (2006-2010). *Expert Opin Ther Pat*. 2011;21(12):1897-910.

Lamkanfi M, Dixit VM. Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. *Cell Host Microbe*. 2010;8(1):44-54.

Larson AM. Diagnosis and management of acute liver failure. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(3):214-21.

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;287(17):2215-20.

Lee VS, Morgan GR, Lin JC, Nazzaro CA, Chang JS, Teperman LW, Krinsky GA. Liver transplant donor candidates: associations between vascular and biliary anatomic variants. *Liver Transpl*. 2004;10(8):1049-54.

Li Y, Lu L, Luo N, Wang YQ, Gao HM. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway protects against d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure by chaperone-mediated autophagy in rats. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:544-553.

Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med*. 2000;28(4 Suppl):N37-52.

Lima TC. Cirrose Hepática induzida por tioacetamida: estudo do modelo por injeção intraperitoneal a longo prazo em ratas wistar. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo. São Paulo; 2008.

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):365-70.

Liu Y, Pan X, Li S, Yu Y, Chen J, Yin J, Li G. Endoplasmic reticulum stress restrains hepatocyte growth factor expression in hepatic stellate cells and rat acute liver failure model. *Chem Biol Interact*. 2017;277:43-54.

Locke M, Noble EG, Tanguay RM, Field MR, Ianuzzo CD. Activation of heat-shock transcription factor in rat heart after heat shock and exercise. *Am J Physiol*. 1995;268(6):1387-94.

Losi-Guembarovski R, Cólus IMS. Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): ethnic distribution and relation with cancer. *Semina: Ci Biol Saúde*. 2001;22:3-9.

Lucke B, Mallory T. The Fulminant Form of Epidemic Hepatitis. *Am J Pathol*. 1946;22(5):867-945.

Mação LB. Avaliação do estresse oxidativo na cardiopatia chagásica crônica após terapêutica antioxidante. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis; 2006.

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):4464-74.

Mattos AA, Dantas-Corrêa EB. Tratado de Hepatologia. 4 ed. São Paulo: Rubio; 2010.

Medras ZJH, El-Sayed NM, Zaitone SA, Toraih EA, Sami MM, Moustafa YM. Glutamine up-regulates pancreatic sodium-dependent neutral aminoacid transporter-2 and mitigates islets apoptosis in diabetic rats. *Pharmacol Rep*. 2018;70(2):233-42.

Miguel FM, Schemitt EG, Colares JR, Hartmann RM, Morgan-Martins MI, Marroni NP. Action of vitamin E on experimental severe acute liver failure. *Arq Gastroenterol* 2017;54:123-9.

Neuer A, Spandofer SD, Giraldo P, Dieterles, Rosenwaks Z, Witkin SS. The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update*. 2000;6(2):149-59.

Nunes PP. Fisiologia Hepática – texto de apoio: Faculdade de Medicina. Universidade do Porto; 2007;26p.

Oliveira CR. Estresse Oxidativo Induzido por Bifenilos Policlorados em ratos e tratados com Quercetina. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular aplicada à Saúde] - Universidade Luterana do Brasil. Canoas; 2013.

Oliveira DC. Avaliação do controle da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias mediada pela IL-10. Participação da IL-10 na modulação da resposta inflamatória exercida pela glutamina e na restrição alimentar. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo; 2017.



Park YS, Kim DJ, Koo H, Jang SH, You YM, Cho JH, Yang SJ, Yu ES, Jung Y, Lee DC, Kim JA, Park ZY, Park KC, Yeom Y. AKT-induced PKM2 phosphorylation signals for IGF-1-stimulated cancer cell growth. *Oncotarget*. 2016;7(30):48155-67.

Paschoal FM Junior, Nogueira RC, Oliveira ML, Paschoal EHA, Teixeira MJ, D'Albuquerque LAC, Bor-Seng-Shu E. Cerebral hemodynamic and metabolic changes in fulminant hepatic failure. *Arq Neuropsiquiatr*. 2017;75(7):470-6.

Pearson Education, Inc. PowerPoint® Lecture Slides prepared by Meg Flemming Austin Community College. Chapter 16. The Digestive System. 2013.

Pobezinskaya YL, Kim YS, Choksi S, Morgan MJ, Li T, Liu C, Liu Z. The function of TRADD in signaling through tumor necrosis factor receptor 1 and TRIF-dependent Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2008;9(9):1047-54.

Porter WR, Neal RA. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 1978;6(4):379-88.

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):147-50.

Rao J, Zhang C, Wang P, Lu L, Qian X, Qin J, Pan X, Li G, Wang X, Zhang F. C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to hepatocyte death via the promotion of ERO1 $\alpha$  signalling in acute liver failure. *Biochem J*. 2015;466(2):369-78.

Ren K, Torres R. Role of interleukin-1beta during pain and inflammation. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):57-64.

Ritossa F. A new puffing pattern induced and temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18 (12): 571-573.

Rodrigues D. Transplante de Hepatócitos no modelo experimental de hepatotoxicidade aguda induzida por paracetamol em ratos. Tese (Doutorado em Ciências em Gastroenterologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 2008.

Rodrigues G. Ação da Sinvastatina no modelo experimental de Esteato-Hepatite Não Alcoólica. Tese (Doutorado em Medicina: Ciências Médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 2014.

Rosa, SEA. Regulação da homeostasia do retículo endoplasmático em linfócitos B na imunodeficiência comum variável. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Universidade de São Paulo. São Paulo; 2011.

Roul D, Recchia FA. Metabolic Alterations Induce Oxidative Stress in Diabetic and Failing Hearts: Different pathways, same outcome. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(17):1502-14.

Salvi JO, Schemitt EG, Colares JR, Hartmann RM, Marroni CA, Marroni NAP. Action of melatonin on severe acute liver failure in rats. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 2017;12:62-75.

Schemitt EG, Colares JR, Hartmann RM, Morgan-Martins M, Marroni CA, Tunon MJ, Marroni NP. Effect of glutamine on oxidative stress and inflammation in a rat model of fulminant hepatic failure. *Nutr Hosp*. 2016;33(2):210-9.

Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*. 2004;10(4):6.

Schroder M. Endoplasmic reticulum stress responses. *Cellular and molecular life sciences*, 2008;65(6):862-94.

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;42(16):10446-59.

Sharma S. 10 Signs & Symptoms of Liver Damage. 2016. Disponível em: <https://www.medicalindiatourism.com/blog/signs-symptoms-liver-damage.html>. Acesso em: 19 de outubro de 2018.

Shawcross DL, Davies NA, Williams R, Jalan R. Systemic inflammatory response exacerbates the neuropsychological effects of induced hyperammonemia in cirrhosis. *J Hepatol*. 2004;40(2):247-54.

Sherlock SD, Dooley J. Diseases of the liver and biliary system. 10th ed. London: Blackwell Science Ltd; 1997.

Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr*. 1991;69(21-23):965-8.

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.

Skarra DV, Thackray VG. FOXO1 is regulated by insulin and IGF1 in pituitary gonadotropes. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;405:14-24.

Soares AD, Costa KA, Wanner SP, Santos RG, Fernandes SO, Martins FS, Nicoli JR, Coimbra CC, Cardoso VN. 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;112(10):1601-10.

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):143-8.

Strauss E. Falência Hepática Aguda. In: *Hepatologia: Sociedade Brasileira de Hepatologia*; 2011. 8p.

Sun Y. Kim and Ashley E. Webb. Neuronal functions of FOXO/DAF-16. *Nutr Healthy Aging*. 2017;4(2):113-26.

Temple RJ, Himmel MH. Safety of newly approved drugs: implications for prescribing. *Jama*. 2002;287(17):2273-5.

Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci*. 1991;36(6):770-4.

Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Álvarez M, Prieto J, González-Gallego J.. Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J. Pineal Res*. 2013;55:221-8.

Vandenabeele P, Vanden Berghe T, Festjens N. Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE*. 2006;2006(358):pe44.

Vasallo C, Gastaminza P. Cellular stress responses in Hepatitis C virus infection: mastering a two-edged sword. *Virus Res*. 2015;209:100-17.

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;294(2):473-9.

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;268(3):204-12.

You H, Pellegrini M, Tsuchihara K, Yamamoto K, Hacker G, Erlacher M, Villunger A, Mak TW. FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal. *J Exp Med*. 2006;203(7):1657-63.

Zabot GP, Carvalhal GF, Marroni NP, Licks F, Hartmann RM, da Silva VD, Fillmann HS. Glutamine prevents oxidative stress in a model of portal hypertension. *World J Gastroenterol*. 2017;23(25):4529-37.

Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med*. 2003;31(1 Suppl):S105-11.

Zuhl M, Dokladny K, Mermier C, Schneider S, Salgado R, Moseley P. The effects of acute oral glutamine supplementation on exercise-induced gastrointestinal permeability and heat shock protein expression in peripheral blood mononuclear cells. *Cell Chaperones Stress*. 2015;20(1):85-93.

## 7 ARTIGOS

### 7.1 Artigo 1

“Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure”

Submetido para publicação na revista *World Journal of Hepatology*.



Manuscript Information	Manuscript Files	Manuscript Operations
Manuscript ID:	43256	
Manuscript Status:	Reviewing	
Journal:	World Journal of Hepatology	
Manuscript Title:	Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure	
Running Title:	Glutamine is protective in severe ALF	
Country of Manuscript Source:	Brazil	
Manuscript Source:	Unsolicited Manuscript	
Invited Manuscript ID:		

## Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure

Elizângela Gonçalves Schemitt<sup>1,5,6</sup>, Renata Minuzzo Hartmann<sup>1,5,6</sup>, Josieli Rakopf Colares<sup>1,5,6</sup>, Francielli Licks<sup>2,5,6</sup>, Jéferson de Oliveira Salvi<sup>3,5,6</sup>, Cláudio Augusto Marroni<sup>4,5</sup>, Norma Possa Marroni<sup>1,2,3,5,6</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Biological Sciences: Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>3</sup> Postgraduate Program in Cellular and Molecular Biology applied to Health, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Hepatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>5</sup> Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>6</sup> Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

**Author contributions:** Schemitt EG, Hartmann RM, Colares JR and Marroni NP contributed to study conception and design; Schemitt EG, Hartmann RM, Colares JR, Licks F and Salvi JO contributed to data acquisition, data analysis and interpretation, and writing of article; Schemitt EG, Marroni CA and Marroni NP contributed to editing and reviewing of article. All authors have read and approved of the final version of the article.

**Institutional review board statement:** This study was conducted at the Animal Experimentation Unit and the Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas of Porto Alegre, after approval from the Institutional Animal Care and Use Committee (opinion no. CEUA 15-0175).

**Conflict-of-interest statement:** The authors have no conflicts of interest to disclose.

**ARRIVE statement:** The authors followed the checklist ARRIVE - Animal Research: Reporting In Vivo Experiments -

**Correspondence to:** Claudio Augusto Marroni, Dr, Professor, Graduate Program in Medicine: Hepatology at Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Rua José Kanan Aranha 102; Jardim Isabel –Porto Alegre-RS; Brasil; CEP-91760470. nmarroni@terra.com.br

Telephone: 55-51999638306, 55-5132483202

## **Abstract**

### **AIM**

Evaluate the antioxidant effects of glutamine on Nrf2 activation and NF $\kappa$ B-mediated inflammation in rats with thioacetamide-induced severe acute liver failure.

### **METHODS**

Male Wistar rats ( $n=28$ ) were divided into four groups: control, control+glutamine, thioacetamide, and thioacetamide+glutamine. Two thioacetamide doses (400 mg/kg) were administered intraperitoneally, 8h apart. Glutamine (25 mg/kg) was administered at 30 min, 24h, and 36h. At 48h, blood was collected for AST, ALT, and ALP measurement. The liver was harvested for histology and assessment of TBARS, CAT, GPx, GST, GSH, Nrf2, Keap1, NQO1, SOD, TLR4, NF $\kappa$ B, COX-2, iNOS, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>.

### **RESULTS**

Thioacetamide caused disruption of the hepatic parenchyma, with inflammatory infiltration, massive necrosis, and ballooning degeneration. Glutamine mitigated this tissue damage, with visible regeneration of hepatic parenchyma; decreased TBARS ( $P < 0.001$ ), GSH ( $P < 0.01$ ), IL-1 $\beta$ , IL6, and TNF $\alpha$  levels ( $P < 0.01$ ) in hepatic tissue; and decreased blood levels of AST, ALT, and ALP ( $P < 0.05$ ). In addition, CAT, GPx, and GST activities were restored in the glutamine group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ , and  $P < 0.001$ , respectively vs. thioacetamide alone). Glutamine increased expression of Nrf2 ( $P < 0.05$ ), NQO1, and SOD ( $P < 0.01$ ), as well as levels of IL-10 ( $P < 0.001$ ), while decreasing expression of Keap1, TLR4, NF $\kappa$ B ( $P < 0.001$ ), COX-2 and iNOS, ( $P < 0.01$ ), and reducing NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub> levels ( $P < 0.05$ ).

### **CONCLUSION**

In the thioacetamide model of severe acute liver failure, glutamine activated the Nrf2 pathway, thus promoting antioxidant protection, and blunted the NF $\kappa$ B-mediated pathway, reducing inflammation.

**Key words:** Thioacetamide; Cytokines; Oxidative stress; Inflammation; Liver failure; Chemical and drug induced liver injury; Glutamine

**Core tip:** Severe acute liver failure (SALF) is a rare syndrome characterized by rapid deterioration of liver function, usually in patients without underlying liver disease; the only effective treatment is transplantation. In this study, we used thioacetamide (TAA), a known xenobiotic hepatotoxicant, to induce SALF in rats. This was followed by administration of glutamine in an attempt to activate antioxidative defenses via the Nrf2 pathway and mitigate liver injury. Glutamine successfully activated Nrf2 and inhibited TLR4/NF $\kappa$ B-mediated inflammation, allowing restoration of parenchymal architecture and recovery of several parameters to near-control levels.

## INTRODUCTION

Severe acute liver failure (SALF) is a complex and rare syndrome characterized by rapid deterioration of liver function, usually in patients without underlying liver disease<sup>[1,2]</sup>. Management includes intensive and comprehensive supportive care, but the only effective treatment to date is liver transplantation<sup>[3]</sup>.

The xenobiotic thioacetamide (TAA) has been used to induce hepatic damage in animals, and constitutes an effective experimental model to study the mechanisms involved in the pathophysiology of SALF and investigate potential therapies thereof.

Several studies have implicated oxidative stress and inflammation as critical events involved in experimental SALF<sup>[4,5,6,7,8,9]</sup>.

Reactive oxygen species (ROS) are generated during the process of oxygen metabolism and play several important physiological roles, including signal transduction, defense against microbial pathogens, and gene expression to support cell growth or cell death signaling pathways<sup>[5,10]</sup>. Reactive nitrogen species (RNS), in turn, are derived from nitric oxide (NO), which is produced via inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity<sup>[5,6]</sup>. Because of their unique chemical characteristics, ROS and RNS can trigger lipid peroxidation and cause DNA strand breaks and protein oxidation, resulting in cellular injury. Oxidative and nitrosative stress represents an imbalance in the production and elimination of these reactive species and a decrease in the production of antioxidants<sup>[5,11,27]</sup>.

The antioxidant defense system is essential for cell protection. Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx), as well as non-enzymatic electron receptors such as glutathione (GSH), are affected by oxidative stress conditions<sup>[12,27]</sup>. The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is an important regulator of redox balance. Under physiological conditions, Nrf2 is stored in the cytoplasm in inactivated form, bound to Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Under stress conditions, Nrf2 dissociates Keap1 and is translocated to the nucleus, where it promotes expression of cytoprotective target genes, such as NADPH quinone oxidoreductase1 (NQO1), antioxidant enzymes, and phase-II detoxification enzymes such as glutathione S-transferase (GST)<sup>[5,13,14,15]</sup>.



Inflammation is a key component of several liver diseases. The inflammatory process leads to parenchymal damage, which progresses to fibrosis, liver cancer, and, occasionally, SALF<sup>[16]</sup>. Metabolites of hepatotoxic drugs bind to a toll-like receptor 4 (TLR4) complex that activates nuclear factor kappa B (NFκB), triggering the production of pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin (IL)-1β, and IL-6, and modulation of anti-inflammatory cytokines such as IL-10<sup>[13,16,17,27]</sup>. Furthermore, it can stimulate production of the enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and iNOS, both of which act as inflammatory mediators<sup>[18]</sup>.

Many isolated compounds have been investigated for their potential to eliminate oxidative stress and mitigate the inflammatory process in liver diseases. Within this context, glutamine (Gln) has been investigated due to its important role in a wide range of metabolic pathways. It is indispensable for nucleotide, glucose, and protein synthesis. It is a precursor of GSH and plays a key role in the immune defense of the gut mucosal barrier, participating in immunoglobulin formation<sup>[19,20]</sup>. Several studies in humans have shown that Gln modulates the expression of genes related to the activation of pathways involved in several disease states<sup>[21,22,23,24]</sup>. Furthermore, studies conducted in different experimental models have demonstrated beneficial effects of Gln on the rat liver, bowel, and stomach<sup>[20,25,26,27,28,29]</sup>.

Within this context, the present study aimed to evaluate the effect of Gln as an antioxidant and its role in the inflammatory process in an experimental model of severe acute liver failure induced by thioacetamide.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Ethical considerations***

This study was conducted at the Animal Experimentation Unit and the Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, after approval from the Institutional Animal Care and Use Committee (opinion no. CEUA 15-0175).

Animal handling followed the ethical principles for animal experimentation mandated by current Brazilian legislation (Law no. 11794/2008), the standards of the Brazilian Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), the State Code for Animal Protection, and established local procedures for the care and use of animals in experimental research.

### ***Experimental procedures***

Twenty-eight male Wistar rats (mean weight 300 g) were used in this study. During the experiment, the animals were housed in boxes (47×34×18 cm) lined with wood shavings, in a 12-hour light/dark cycle, and a controlled temperature of 18 to 22 °C. Water and feed were given ad libitum. The animals were randomized in four groups ( $n = 7$  each): control (CO), control plus glutamine (CO + G), thioacetamide (TAA), and thioacetamide plus glutamine (TAA + G).

Severe acute liver failure was induced by intraperitoneal administration of two doses of thioacetamide (TAA), 400 mg/kg in normal saline solution (0.9% NaCl), with an 8-hour interval between doses<sup>[8]</sup>. The glutamine-treated groups received intraperitoneal Gln (Sigma Chemical®, St. Louis, MO, USA), 25 mg/kg in 1 mL 0.9% NaCl. The first dose was administered 30 minutes after the last dose of TAA; the second and third doses of Gln were administered 24 and 36 hours, respectively, after the start of the experiment.

At 48 hours, the animals were weighed and anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine hydrochloride (95 mg/kg) and 2% xylazine hydrochloride (8 mg/kg). Blood was then collected from the retro-orbital plexus with a glass capillary tube and placed into a heparin-containing test tube to prevent coagulation.

After blood sampling, animals were euthanized by anesthetic overdose (three times the therapeutic dose, as per CONCEA guidelines)<sup>[30]</sup>. Upon confirmation of death, the abdominal region was shaved and disinfected, a midline ventral laparotomy was performed, and the liver was removed in sections for storage and subsequent analysis. One liver fragment was submerged in 10% formaldehyde solution for 24 hours for histological examination, while another fragment was frozen -80 °C for other analyses.

### ***Histological examination of hepatic tissue***

Tissue samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. The resulting paraffin blocks were then placed in a Leitz® 1512 microtome and cut into sections 3 µm thick. The slides were then dipped in hematoxylin and eosin (H&E) for 5 minutes each and placed in a running water bath. For dehydration, the slides were run through a graded ethanol series, followed by two xylol baths. Finally, coverslips were

mounted with Canada balsam. Slides were examined under a light microscope coupled to a digital camera. Images were captured using Image-Plus software (Media Cybernetics®, Bethesda, USA) at a magnification of 200x. Hallmarks of acute liver injury were scored on a scale of 0 to 3, where 0 = normal hepatic tissue; 1 = mild damage with scant inflammatory infiltration; 2 = moderate damage and infiltration; and 3 = severe damage with infiltration and loss of hepatic architecture.

### ***Spectrophotometric analysis of biochemical parameters***

Hepatic integrity was assessed by measurement of the liver enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (ALP) in plasma, using the commercially available Liquiform Labtest® kit (a kinetic spectrophotometric assay). Protein content in liver homogenate was determined by Bradford's method<sup>[31]</sup>. Lipid peroxidation was investigated by the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) method<sup>[32]</sup>. Levels of GSH were evaluated<sup>[33]</sup>, as well as activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT)<sup>[34]</sup> and glutathione peroxidase (GPx)<sup>[35]</sup> and of the phase-II detoxification enzyme glutathione S-transferase (GST)<sup>[36]</sup>. Production of nitric oxide metabolites (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) was measured indirectly by the Griess reaction<sup>[37]</sup>.

### ***Western blot analysis of protein expression***

Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared from liver homogenates<sup>[38]</sup>. The supernatant fraction was collected, aliquoted, and stored at -80 °C. Protein content was determined by Bradford's method<sup>[31]</sup>. Lysed proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes<sup>[39,40]</sup>. The membranes were then blocked with 5% skim milk in Tris buffer containing 0.05% Tween (TTBS) for 1 hour at room temperature and probed overnight at 4 °C with anti-Nrf2 (57 kDa), anti-Keap1 (69 kDa), anti-NQO1 (31 kDa), anti-SOD (32 kDa), anti-TLR4 (95 to 120 kDa), anti-NFκB (65 kDa), anti-COX-2 (21 kDa), and anti-iNOS (120 kDa) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluted 1:200 to 1:1,000 with TTBS in dehydrated milk at 5%. Primary antibodies were detected with HRP-conjugated anti-rat IgG, anti-rabbit IgG, or anti-goat IgG secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Protein detection was performed with a commercially available electrochemiluminescence kit (Amersham Pharmacia Biotech,

Little Chalfont, Bucks, England)<sup>[41]</sup>. Density of the specific bands was quantified with imaging densitometry software (Scion Image, Scion Corporation, Frederick, MA, USA).

### ***Multiplex analysis***

Levels of IL-1, IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  were measured in hepatic tissue homogenates using a MILLIPLEX™ MAP Rat Cytokine bead-based multiplex assay kit (RCYTO-80K, Millipore, Billerica, MA, USA). The MILLIPLEX™ MAP method is based on Luminex® xMAP™ technology. All procedures were performed in accordance with manufacturer recommendations. Tissue specimens were diluted 1:5 in sample diluent and incubated in duplicate overnight with TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, and IL-10 capture beads. The beads were subsequently washed and incubated for 2 hours with biotin-conjugated detection antibody, and then for 30 minutes with streptavidin-phycoerythrin. Bead fluorescence was read in a Luminex 100 IS Multiplex BioAssay analyzer. Cytokine concentrations were determined from these readings using four standard curves. Results were expressed as pg/mL.

### ***Statistical analysis***

Quantitative data were expressed as mean  $\pm$  standard error. Groups were compared by one-way analysis of variance (ANOVA). Differences in means were located by the Student–Newman–Keuls procedure. Data were analyzed in program GraphPad Instat 3.1, and significance was accepted at  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

### ***Histopathological analysis***

On histological examination of H&E-stained slides at 200 $\times$  magnification (Figure 1), disruption of the hepatic parenchyma was observed in the TAA group, with inflammatory infiltration, massive necrosis, and ballooning; none of these features occurred in the CO or CO + G groups. Photomicrographs of liver tissue from rats in the TAA + G group show regeneration of the hepatic parenchyma, with a decrease in inflammatory infiltration and a substantial reduction in ballooning and spotty necrosis.

### ***Assessment of hepatic cellular integrity***

Liver function tests (Table 1) showed increased levels of liver enzymes in TAA group animals, which decreased significantly when Gln was administered ( $P<0.05$ ).

### ***Assessment of oxidative stress***

Assessment of lipid peroxidation by the TBARS method (Figure 2) revealed a significant increase in the TAA group in relation to the CO and CO + G groups ( $P<0.001$ ). Again, significant reductions were observed in the TAA + G group (to which Gln was administered) as compared with the TAA group ( $P<0.001$ ).

Nuclear expression of Nrf2 (Figure 3A) was decreased in the TAA group as compared with the CO and CO + G groups ( $P<0.01$ ), and increased in the TAA + G group as compared with the TAA group ( $P<0.05$ ). Conversely, expression of the inhibitory cytoplasmic protein Keap1 (Figure 3B) was increased in the TAA group as compared to both control groups ( $P<0.001$ ) and significantly reduced in the TAA + G group when compared to the TAA group ( $P<0.01$ ).

Expression of both NQO1 (Figure 4A) and SOD (Figure 4B) was decreased in the TAA group compared to the CO and CO + G groups ( $P<0.001$  and  $P<0.05$ , respectively) and increased in the TAA + G group as compared to the TAA group ( $P<0.01$ ).

GSH levels (Figure 5) were statistically lower in the TAA group than in both control groups ( $P<0.01$ ), but increased significantly in the TAA + G group ( $P<0.01$ ).

Table 2 shows the findings of analysis of activity of the antioxidant enzymes CAT and GPx and the detoxification enzyme GST. GPx enzyme activity was increased in the TAA group as compared with the CO and CO + G groups ( $P<0.001$ ), and decreased in the Gln-treated group as compared with the TAA group ( $P<0.01$ ). CAT activity exhibited the inverse behavior; it was lower in the TAA group than in the control groups ( $P<0.01$ ) and higher in the TAA + G group than in the TAA group ( $P<0.01$ ). GST activity increased in the TAA group ( $P<0.001$ ) and decreased in the Gln-treated group ( $P<0.001$ ), which is consistent with its detoxifying role.

### ***Assessment of the inflammatory process***

Cytoplasmic expression of TLR4 (Figure 6A) and nuclear expression of NF $\kappa$ B (Figure 6B) were significantly increased in the TAA group as compared with control groups ( $P<0.001$ ), and significantly decreased in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P<0.001$ ).

Levels of the proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF $\alpha$  (Table 3) were higher in the TAA group than in both control groups, CO and CO + G ( $P < 0.001$ ). These levels decreased significantly in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.01$ ). In contrast, levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were decreased in the TAA group in relation to the CO and CO + G groups ( $P < 0.001$ ) and increased in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.001$ ).

Expression of both COX-2 and iNOS (Figure 7) was increased in the TAA group compared to the CO and CO + G groups ( $P < 0.001$ ) and decreased in the TAA + G group as compared to the TAA group ( $P < 0.01$ ).

Assessment of NO levels through their metabolites (nitrites and nitrates) (Figure 8) revealed a significant increase in the TAA group vs. the CO and CO + G groups ( $P < 0.001$ ) and a significant decrease in the TAA + G group as compared with the TAA group ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSSION

SALF is a syndrome that causes a marked decline in hepatocyte function, ultimately leading to multiple organ failure, and carries an extremely high mortality rate. The therapeutic armamentarium available to prevent or treat SALF is still very limited<sup>[17]</sup>. Studies using thioacetamide as an inducer of tissue damage have shown that this xenobiotic leads to different degrees of liver injury depending on the dose and timing of administration. This study aimed to evaluate the damage caused by acute administration of TAA in rats and assess the effects of Gln on the Nrf2-mediated antioxidant pathway and on chemical mediators of inflammation.

We observed extensive destruction of the hepatic parenchyma with necrosis, spotty hemorrhaging, leukocyte infiltration, and ballooning in the group of animals administered TAA. These findings are consistent with previous studies that reported hepatic tissue damage in experimental models using TAA<sup>[42,43,44]</sup>. In the present study, Gln was able to mitigate changes in the parameters of interest, thus restoring the hepatic parenchyma. Sellmann et al.<sup>[17]</sup> showed that Gln contributed to a reduction of inflammatory infiltration in the livers of mice with non-alcoholic steatohepatitis induced by a liquid Western-style diet (WSD)<sup>[45]</sup>. Hartmann et al. found that Gln reduced hemorrhagic spots, necrosis, and inflammatory infiltration in the liver of rats subjected to intestinal ischemia–reperfusion injury<sup>[20]</sup>.

Similar results were found on analysis of hepatic cell integrity. Gln reduced serum levels of AST, ALT, and ALP, while significantly increased levels of these enzymes were found in animals in the TAA group, suggesting massive hepatic impairment after exposure to the xenobiotic. In other studies, Gln was also able to decrease serum levels of these enzymes, thus corroborating our findings<sup>[7,13,46]</sup>.

We also observed an increase in TBARS levels in the livers of animals in the TAA group, which is indicative of increased lipid peroxidation. Other authors found similar increases in TBARS in studies that used TAA to induce liver damage<sup>[6,7,42]</sup>. Again, Gln administration was able to reduce these levels in our animals, corroborating the findings of several other studies that have demonstrated its protective effect in different experimental models<sup>[20,25,47]</sup>.

Cellular stress mediators activate Nrf2, which is translocated to the nucleus and binds to DNA through a region known as the antioxidant response element (ARE). This promotes expression of cytoprotective target genes, including antioxidant and detoxification enzymes<sup>[5]</sup>. In the present study, Gln promoted increased nuclear expression of Nrf2, whereas cytoplasmic expression of its inhibitory protein Keap1 was downregulated. Gln also promoted increased expression of the NQO1 protein and the antioxidant enzyme SOD. Similar results were reported in a study that evaluated expression of the Nrf2/Keap1 antioxidant pathway, NQO1, and SOD in the liver of rats subjected to intestinal ischemia and reperfusion<sup>[13]</sup>.

GSH is considered an important marker of the antioxidant defenses of the cell. High doses of TAA lead to liver damage because it is biotransformed into a rapidly reacting metabolite that causes an imbalance of the glutathione redox cycle<sup>[43]</sup>. In this study, Gln was able to increase GSH levels in liver tissue, demonstrating its protective role. Similar results were observed by Cruzat et al., who studied the antioxidant effects of Gln in endotoxemic animals<sup>[47]</sup>.

The first line of antioxidant defense is represented by the antioxidative enzymes, such as CAT and SOD. In this study, CAT activity was decreased in the TAA group in relation to both control groups. This reduction may reflect the redox imbalance induced by stress resulting from xenobiotic administration. Conversely, CAT activity was increased in the group which received Gln treatment. Other studies using TAA-induced liver damage models have demonstrated increased CAT activity in animals treated with berberine and  $\alpha$ -lipoic acid<sup>[18,46]</sup>.

GPx enzyme activity was increased in the TAA group and decreased in the Gln-treated group. The proper balance of antioxidative enzyme activity plays an important role in cellular protection against oxidative stress. GPx acts in an attempt to reduce molecules with oxidative potential, especially hydrogen peroxide and hydroperoxides, which may explain its increased activity in the group of animals that received TAA. Similar results regarding GPx activity were reported in other studies that used the experimental model of TAA-induced SALF and evaluated the antioxidant action of vitamin E and melatonin<sup>[6,7]</sup>.

GST is an important cellular detoxification enzyme that works in tandem with GSH to remove toxic metabolites. In this study, GST was increased in the TAA group, and Gln treatment was able to reduce its activity. Other authors have reported similar increases in GST in other hepatotoxicity models<sup>[7,48]</sup>. The protective action of Gln in this experimental model may be due to the fact that it is a precursor for GSH synthesis.

The link between oxidative stress and inflammation has been recognized in many disease states, including those which affect the liver. ROS stimulate signaling molecules such as TLR4 to activate inflammatory mediators, including NFκB, which upregulates the production of inflammatory cytokines (such as IL-1β, IL-6, and TNFα) and other mediators of inflammation (such as iNOS and COX-2)<sup>[46]</sup>.

In this study, expression of TLR4 and NFκB in the TAA group was increased in relation to both control groups. Similar results were reported in another study that evaluated TLR4 signaling pathways in a model of TAA-induced hepatic fibrosis and liver carcinogenesis<sup>[49]</sup> and in a study that evaluated NFκB activity in an LPS-induced model of SALF<sup>[17]</sup>. Gln was able to reduce TLR4 and NFκB expression, thus demonstrating its effectiveness in blunting the inflammatory process. A decrease in inflammatory modulators was also observed in other experimental studies that used allopurinol and Gln as treatments<sup>[13,50,51]</sup>.

In the present study, levels of the proinflammatory cytokines IL-1β, IL-6, and TNFα increased while those of the anti-inflammatory cytokine IL-10 declined in animals that received TAA as a hepatotoxicant. Gln reversed the inflammatory process, as demonstrated by a decrease in levels of IL-1β, IL-6, and TNFα and an increase in levels of IL-10 in liver tissue after its administration. A previous study using the TAA model of liver injury also demonstrated an increase in levels of proinflammatory cytokines in animals that developed TAA-induced liver damage<sup>[46]</sup>.



Another study reported a similar anti-inflammatory action of Gln in the liver of animals subjected to experimental endotoxemia<sup>[47]</sup>.

Activation of the TLR4/NFκB pathway promotes COX-2 production. In this study, COX-2 expression was increased in the group that received TAA and decreased in the group that received TAA followed by Gln as treatment. In another study of TAA-induced hepatotoxicity, the authors observed a similar increase in COX-2 expression, followed by decreased expression after treatment with allopurinol<sup>[50]</sup>.

As a hepatotoxicant, TAA may induce production of iNOS and, consequently, NO synthesis, which further increases inflammation in the liver. In this study, we observed overexpression of iNOS and an increase in NO (as measured by levels of its nitrite and nitrate metabolites) in the liver of animals with TAA-induced SALF. Gln was able to reverse these parameters, reducing iNOS expression and nitrite and nitrate levels. In a study using the intestinal ischemia–reperfusion model, the authors observed a similar pattern of iNOS expression and NO levels in the liver of animals which Gln treatment<sup>[13]</sup>.

Gln is an essential amino acid for several cell types, including hepatocytes. The mechanisms underlying the protective effects promoted by Gln include the antioxidant of GSH, which is dependent on a supply of glutamate—this, in turn, is synthesized from Gln. In addition, its protective role in the inflammatory process has been widely reported<sup>[47]</sup>. Gln can attenuate oxidative stress and inflammation, consequently protecting against a variety of mechanisms of cell and tissue injury.

## **CONCLUSION**

The results of this study demonstrate that Gln administration had a protective role on the Nrf2-mediated antioxidant pathway and on inflammation activated by the TLR4/NFκB pathway in rats with TAA-induced SALF. As the molecular pathways involved in the pathophysiology of SALF are manifold and complex, further studies are warranted to investigate other potential mechanisms of Gln action in this setting.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA); Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Universidade Luterana do Brasil (ULBRA); the Coordination for the Improvement of Higher

Education Personnel (CAPES); the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); and the Research Support Foundation of Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## References

1. **Cardoso L**, Moreira LFP, Pinto MA, Henriques-Pons A, Alves LA. Domino hepatocyte transplantation: a therapeutic alternative for the treatment of acute liver failure. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018; **2018**: 2593745 [DOI: 10.1155/2018/2593745]
2. **Scott TR**, Kronsten VT, Hughes RD, Shawcross DL. Pathophysiology of cerebral oedema in acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2013; **19**: 9240-9255 [PMID: PMC3882398 DOI: 10.3748/wjg.v19.i48.9240]
3. **Wu C**, Zhu Y, Yu M. Serum Metabonomics Analysis of liver failure treated by nonbioartificial liver support systems. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018; **2018**: 2586052 [PMID: PMC6057414 DOI: 10.1155/2018/2586052]
4. **Li AN**, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* 2014; **6**: 6020-6047 [PMID: PMC4277013 DOI: 10.3390/nu6126020]
5. **Li S**, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci* 2015; **16**: 26087-26124 [PMID: PMC4661801 DOI: 10.3390/ijms161125942]
6. **Miguel FM**, Schemitt EG, Colares JR, Hartmann RM, Morgan-Martins MI, Marroni NP. Action of vitamin E on experimental severe acute liver failure. *Arq Gastroenterol* 2017; **54**: 123-129 [DOI: 10.1590/S0004-2803.201700000-03]
7. **Salvi JO**, Schemitt EG, Colares JR, Hartmann RM, Marroni CA, Marroni NAP. Action of melatonin on severe acute liver failure in rats. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 2017; **12**: 62-75 [DOI: 10.9790/3008-1203036275]
8. **Schemitt EG**, Colares JR, Hartmann RM, Morgan-Martins M, Marroni CA, Tunon MJ, Marroni NP. Effect of glutamine on oxidative stress and inflammation in a rat model of fulminant hepatic failure. *Nutricion hospitalaria* 2016; **33**: 92 [DOI: 10.20960/nh.92]
9. **Shen Z**, Wang Y, Su Z, Kou R, Xie K, Song F. Activation of p62-keap1-Nrf2 antioxidant pathway in the early stage of acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Chem Biol Interact* 2018; **282**: 22-28 [DOI: 10.1016/j.cbi.2018.01.008]
10. **Finkel T**, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000; **408**: 239-247 [DOI: 10.1038/35041687]

11. **Cichoż-Lach H**, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2014; **20**: 8082-8091 [PMID: PMC4081679 DOI: 10.3748/wjg.v20.i25.8082]
12. **Valente MJ**, Carvalho F, Bastos M, de Pinho PG, Carvalho M. Contribution of oxidative metabolism to cocaine-induced liver and kidney damage. *Curr Med Chem* 2012; **19**: 5601-5606 [DOI: 10.2174/092986712803988938]
13. **Hartmann RM**, Licks F, Schemitt EG, Colares JR, do Couto Soares M, Zabot GP, Fillmann HS, Marroni NP. Protective effect of glutamine on the main and adjacent organs damaged by ischemia-reperfusion in rats. *Protoplasma* 2017; **254**: 2155-2168 [DOI: 10.1007/s00709-017-1102-3]
14. **Wang H**, Chen X, Su Y, Paueksakon P, Hu W, Zhang MZ, Harris RC, Blackwell TS, Zent R, Pozzi A. p47(phox) contributes to albuminuria and kidney fibrosis in mice. *Kidney Int* 2015; **87**: 948-962 [PMID: PMC4425591 DOI: 10.1038/ki.2014.386]
15. **Zhang YK**, Wu KC, Klaassen CD. Genetic activation of Nrf2 protects against fasting-induced oxidative stress in livers of mice. *PLoS One* 2013; **8**: e59122 [PMID: PMC3601109 DOI: 10.1371/journal.pone.0059122]
16. **Ludwig JM**, Zhang Y, Chamulitrat W, Stremmel W, Pathil A. Anti-inflammatory properties of ursodeoxycholy l lysophosphatidylethanolamide in endotoxin-mediated inflammatory liver injury. *PLoS One* 2018; **13**: e0197836 [PMID: PMC5967712 DOI: 10.1371/journal.pone.0197836]
17. **Yin X**, Gong X, Jiang R, Kuang G, Wang B, Zhang L, Xu G, Wan J. Emodin ameliorated lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure by blockade of TLR4/MD2 complex expression in D-galactosamine-sensitized mice. *Int Immunopharmacol* 2014; **23**: 66-72 [DOI: 10.1016/j.intimp.2014.08.018]
18. **Xia X**, Su C, Fu J, Zhang P, Jiang X, Xu D, Hu L, Song E, Song Y. Role of alpha-lipoic acid in LPS/d-GalN induced fulminant hepatic failure in mice: studies on oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Int Immunopharmacol* 2014; **22**: 293-302 [DOI: 10.1016/j.intimp.2014.07.008]
19. **Chen S**, Xia Y, Zhu G, Yan J, Tan C, Deng B, Deng J, Yin Y, Ren W. Glutamine supplementation improves intestinal cell proliferation and stem cell differentiation in weanling mice. *Food Nutr Res* 2018; **62**: [PMID: PMC6060183 DOI: 10.29219/fnr.v62.1439]
20. **Hartmann R**, Licks F, Schemitt EG, Colares JR, Da Silva J, Moura RM, Zabot GP, Fillmann HS, Marroni NP. Effect of glutamine on liver injuries induced by

- intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Nutr Hosp* 2017; **34**: 548-554 [DOI: 10.20960/nh.643]
21. **Cruzat VF**, Petry ER, Trapegui J. Glutamine: biochemical, metabolic, molecular aspects and supplementation. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* 2009; **15**
22. **Curi R**, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme P. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol* 2005; **204**: 392-401 [DOI: 10.1002/jcp.20339]
23. **Liboni KC**, Li N, Scumpia PO, Neu J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *J Nutr* 2005; **135**: 245-251 [DOI: 10.1093/jn/135.2.245]
24. **Ziegler TR**. Glutamine supplementation in cancer patients receiving bone marrow transplantation and high dose chemotherapy. *J Nutr* 2001; **131**: 2578S-2584S; discussion 2590S [DOI: 10.1093/jn/131.9.2578S]
25. **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**: 217-226 [DOI: 10.1016/j.tox.2007.04.012]
26. **Kretzmann NA**, Fillmann H, Mauriz JL, Marroni CA, Marroni N, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ. Effects of glutamine on proinflammatory gene expression and activation of nuclear factor kappa B and signal transducers and activators of transcription in TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2008; **14**: 1504-1513 [DOI: 10.1002/ibd.20543]
27. **Ajuwon OR**, Marnewick JL, Davids LM. Rooibos (*Aspalathus linearis*) and its major flavonoids - Potential against oxidative stress-induced conditions. In: Gowder SJT. Basic principles and clinical significance of oxidative stress. Intech, 2015: 171-218
28. **Ventura G**, Bortolotti M, Neveux N, Gusmini X, Nakib S, Sarfati G, Cynober L, De Bandt JP. Influence of an omega3-fatty acid-enriched enteral diet with and without added glutamine on the metabolic response to injury in a rat model of prolonged acute catabolism. *Nutrition* 2017; **42**: 75-81 [DOI: 10.1016/j.nut.2017.06.001]
29. **Zabot GP**, Carvalhal GF, Marroni NP, Licks F, Hartmann RM, da Silva VD, Fillmann HS. Glutamine prevents oxidative stress in a model of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2017; **23**: 4529-4537 [PMID: PMC5504368 DOI: 10.3748/wjg.v23.i25.4529]

30. **Brazil.** Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Resolução normativa nº 30, de 2 de fevereiro de 2016. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica – DBCA. Cited 28 Sep 2018. Available from: [http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/ARQUIVOS/etica-animal/RESOLUCAO\\_NORMATIVA\\_N\\_%2030\\_DE\\_02\\_02\\_2016.pdf](http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/ARQUIVOS/etica-animal/RESOLUCAO_NORMATIVA_N_%2030_DE_02_02_2016.pdf)
31. **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 [DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3]
32. **Buege JA,** Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; **52**: 302-310 [DOI: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6]
33. **Beutler E,** Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; **61**: 882-888
34. **Boveris A,** Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; **134**: 707-716 [PMID: PMC1177867 DOI: 10.1042/bj1340707]
35. **Guthenberg C,** Mannervik B. Glutathione S-transferase (transferase pi) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase rho) from erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1981; **661**: 255-260 [DOI: 10.1016/0005-2744(81)90012-7]
36. **Flohe L,** Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1984; **105**: 114-121 [DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05015-1]
37. **Granger DL,** Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol* 1999; **301**: 49-61 [DOI: 10.1016/S0076-6879(99)01068-X]
38. **Tunon MJ,** San Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Santamaria E, Alvarez M, Prieto J, Gonzalez-Gallego J. Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res* 2011; **50**: 38-45 [DOI: 10.1111/j.1600-079X.2010.00807.x]
39. **Mauriz JL,** Molpeceres V, Garcia-Mediavilla MV, Gonzalez P, Barrio JP, Gonzalez-Gallego J. Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res* 2007; **42**: 222-230 [DOI: 10.1111/j.1600-079X.2006.00409.x]

40. **San-Miguel B**, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ. N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. *Apoptosis* 2006; **11**: 1945-1957 [DOI: 10.1007/s10495-006-0090-0]
41. **Tunon MJ**, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Alvarez M, Prieto J, Gonzalez-Gallego J. Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 2013; **55**: 221-228 [DOI: 10.1111/jpi.12063]
42. **Salama SM**, Abdulla MA, AlRashdi AS, Ismail S, Alkiyumi SS, Golbabapour S. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Curcuma longa* on thioacetamide induced liver cirrhosis in rats. *BMC Complement Altern Med* 2013; **13**: 56 [PMID: PMC3605171 DOI: 10.1186/1472-6882-13-56]
43. **Sukalingam K**, Ganesan K, Xu B. Protective effect of aqueous extract from the leaves of *Justicia tranquebariensis* against thioacetamide-induced oxidative stress and hepatic fibrosis in rats. *Antioxidants (Basel)* 2018; **7**: [PMID: PMC6070870 DOI: 10.3390/antiox7070078]
44. **Wei DD**, Wang JS, Duan JA, Kong LY. Metabolomic assessment of acute cholestatic injuries induced by thioacetamide and by bile duct ligation, and the protective effects of huang-lian-jie-du-decoction. *Front Pharmacol* 2018; **9**: 458 [PMID: PMC5952270 DOI: 10.3389/fphar.2018.00458]
45. **Sellmann C**, Baumann A, Brandt A, Jin CJ, Nier A, Bergheim I. Oral supplementation of glutamine attenuates the progression of nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6J Mice. *J Nutr* 2017; **147**: 8 [DOI: 10.3945/jn.117.253815]
46. **Eissa LA**, Kenawy HI, El-Karef A, Elsherbiny NM, El-Mihi KA. Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine attenuate hepatic fibrosis induced by thioacetamide injection in rats. *Chem Biol Interact* 2018; **294**: 91-100 [DOI: 10.1016/j.cbi.2018.08.016]
47. **Cruzat VF**, Bittencourt A, Scomazzon SP, Leite JS, de Bittencourt PI, Jr., Tirapegui J. Oral free and dipeptide forms of glutamine supplementation attenuate oxidative stress and inflammation induced by endotoxemia. *Nutrition* 2014; **30**: 602-611 [DOI: 10.1016/j.nut.2013.10.019]
48. **Zhang Z**, Lv Z, Shao Y, Qiu Q, Zhang W, Duan X, Li Y, Li C. Microsomal glutathione transferase 1 attenuated ROS-induced lipid peroxidation in *Apostichopus japonicus*. *Dev Comp Immunol* 2017; **73**: 79-87 [DOI: 10.1016/j.dci.2017.03.011]

49. **Seifert L**, Deutsch M, Alothman S, Alqunaibit D, Werba G, Pansari M, Pergamo M, Ochi A, Torres-Hernandez A, Levie E, Tippens D, Greco SH, Tiwari S, Ly NNG, Eisenthal A, van Heerden E, Avanzi A, Barilla R, Zambirinis CP, Rendon M, Daley D, Pachter HL, Hajdu C, Miller G. Dectin-1 regulates hepatic fibrosis and hepatocarcinogenesis by suppressing TLR4 signaling pathways. *Cell Rep* 2015; **13**: 1909-1921 [PMID: PMC4681001 DOI: 10.1016/j.celrep.2015.10.058]
50. **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**: 1549-1557 [DOI: 10.1007/s10753-012-9470-5]
51. **Raizel R**, Leite JS, Hypolito TM, Coqueiro AY, Newsholme P, Cruzat VF, Tirapegui J. Determination of the anti-inflammatory and cytoprotective effects of L-glutamine and L-alanine, or dipeptide, supplementation in rats submitted to resistance exercise. *Br J Nutr* 2016; **116**: 470-479 [DOI: 10.1017/S0007114516001999]

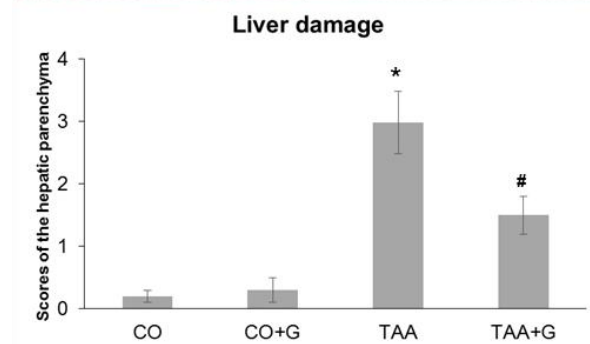
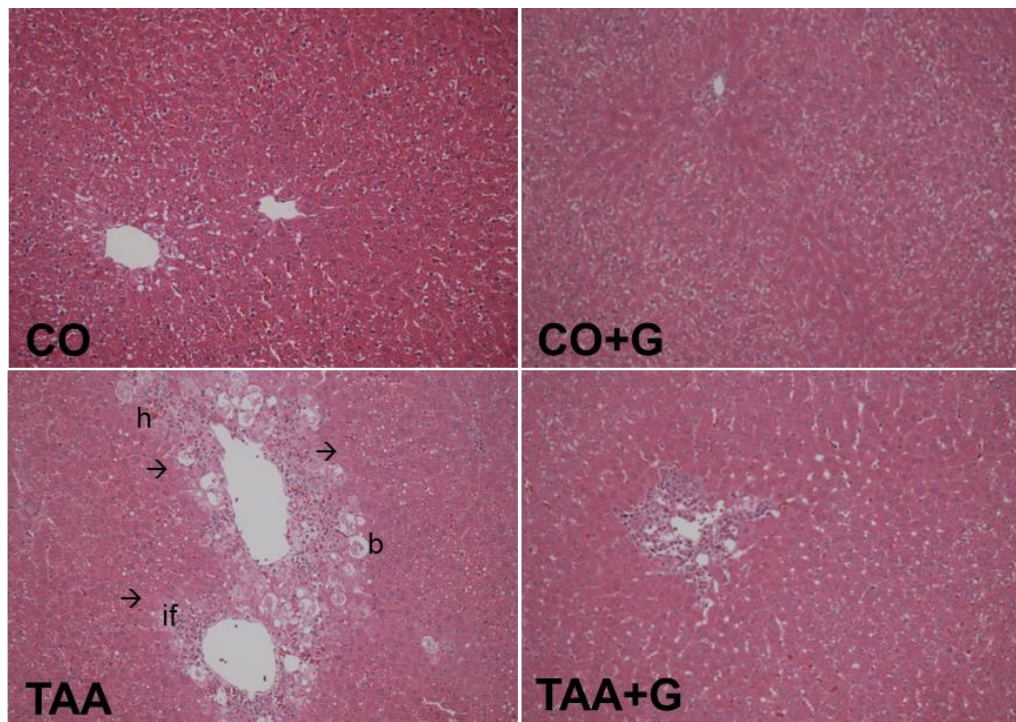


## FIGURES

**Figure 1 Effect of glutamine on liver injury in animals exposed to an experimental model of severe acute liver failure. Representative photomicrographs; original magnification, 200 $\times$ . Hematoxylin and eosin (H&E) stain.** In the TAA group, there is visible disruption of the hepatic parenchymal architecture, with inflammatory infiltration, hemorrhage, ballooning, and massive necrosis. The glutamine-treated group (TAA + G) exhibits a reduction of these parameters and restructuring of the hepatic parenchyma. There were no visible tissue changes in the CO and CO + G groups. **if**, inflammatory infiltrate; **h**, hemorrhage; **b**, ballooning; **n**, necrosis. Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

\* Significant increase in the TAA group vs. groups CO and CO + G.

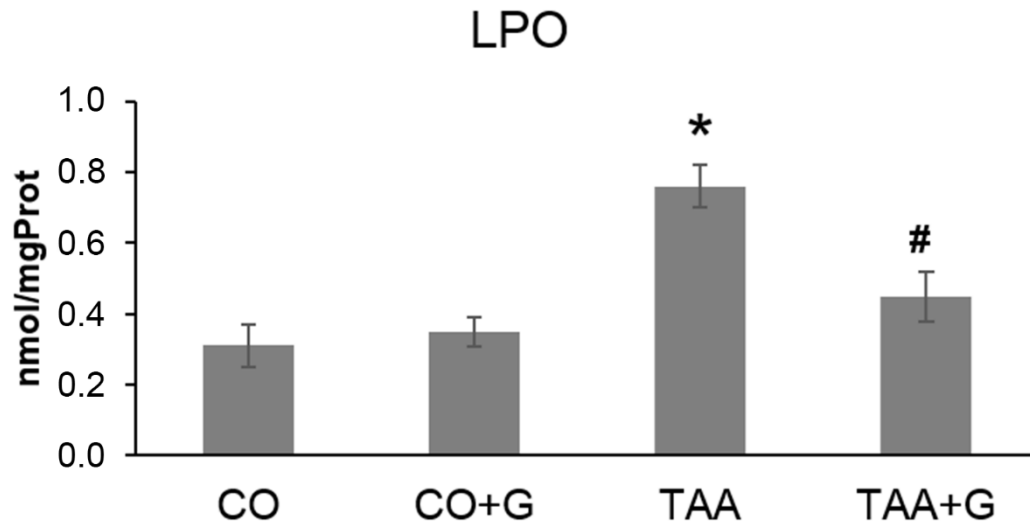
# Significant decrease in the TAA + G group vs. the TAA group.



**Figure 2 Assessment of lipid peroxidation (TBARS) in the liver of rats with severe acute liver failure.** Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

\* Significant increase in the TAA group vs. groups CO and CO + G ( $P < 0.005$ ).

# Significant decrease in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.01$ )



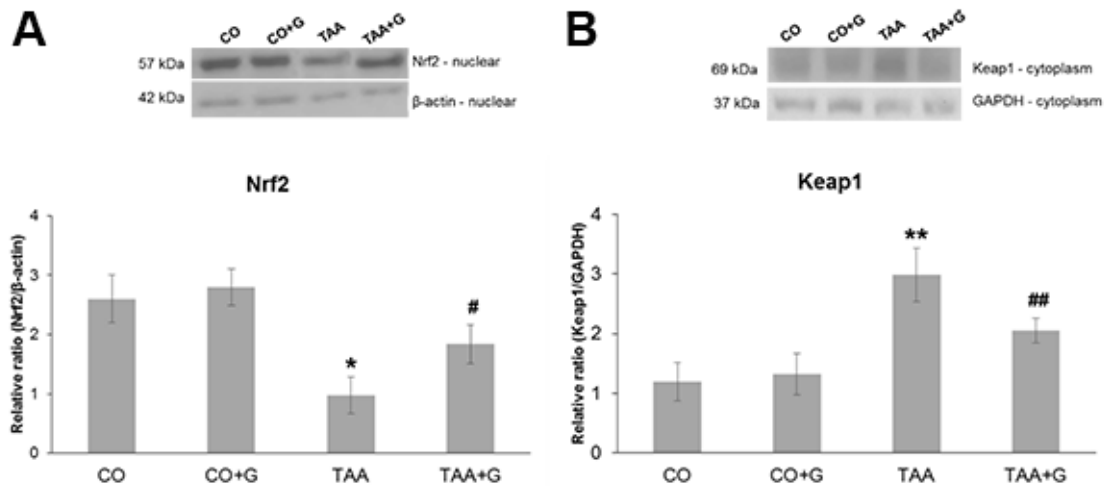
**Figure 3 Effect of glutamine in experimental severe acute liver failure.** Western blot analysis of protein expression of **A) Nrf2** and **B) Keap1**. Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

\* Significant decrease in the TAA group vs. groups CO and CO + G ( $P < 0.01$ ).

# Significant increase in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.05$ )

\*\* Significant increase in the TAA group vs. groups CO and CO + G ( $P < 0.001$ ).

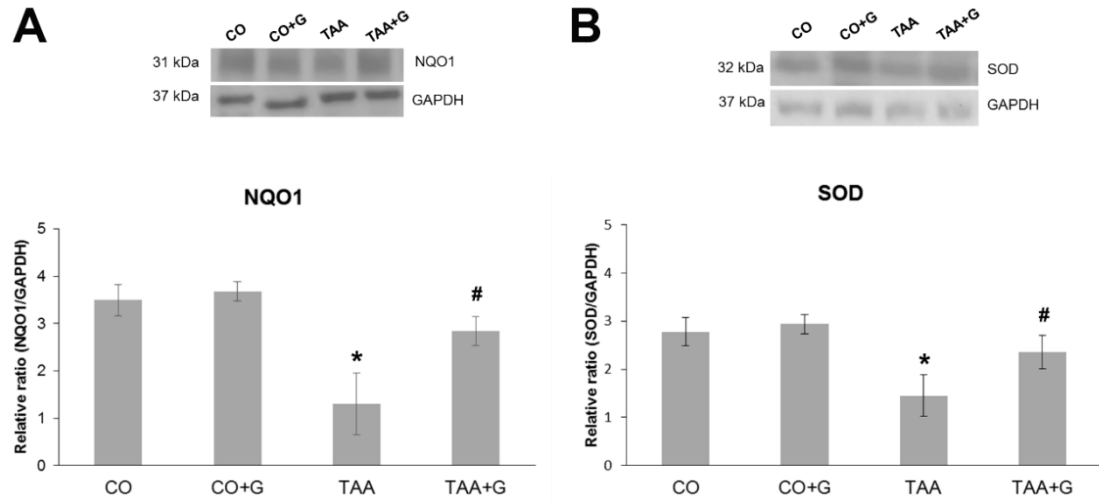
## Significant decrease in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.01$ )



**Figure 4 Effect of glutamine in experimental severe acute liver failure.** Western blot analysis of protein expression of **A) NQO1** and **B) SOD**. Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

\* Significant decrease in the TAA group vs. groups CO and CO + G (NQO1 =  $P < 0.01$ , SOD =  $P < 0.05$ ).

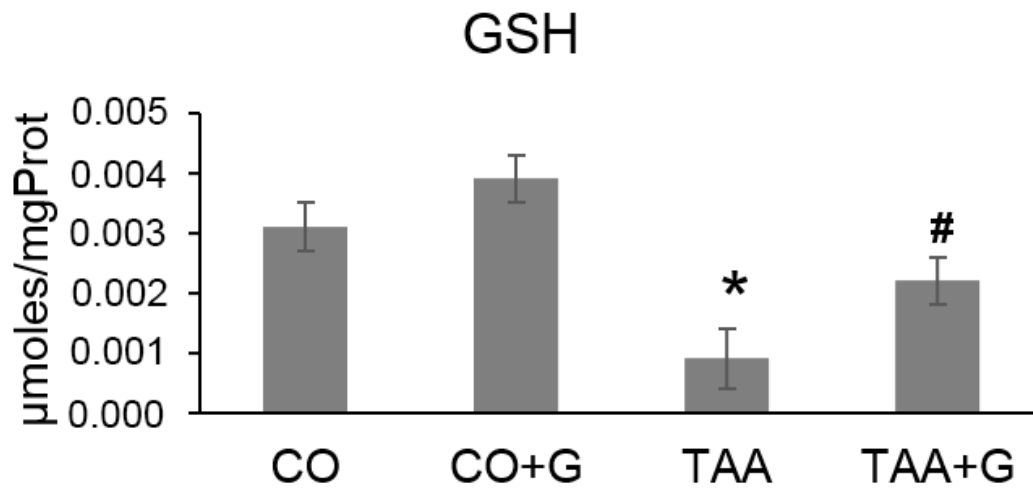
# Significant increase in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.01$ )



**Figure 5 Assessment of glutathione (GSH) levels in the liver of rats treated with glutamine after induction of severe acute liver failure.** Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

\* Significant decrease in the TAA group vs. groups CO and CO + G ( $P < 0.001$ ).

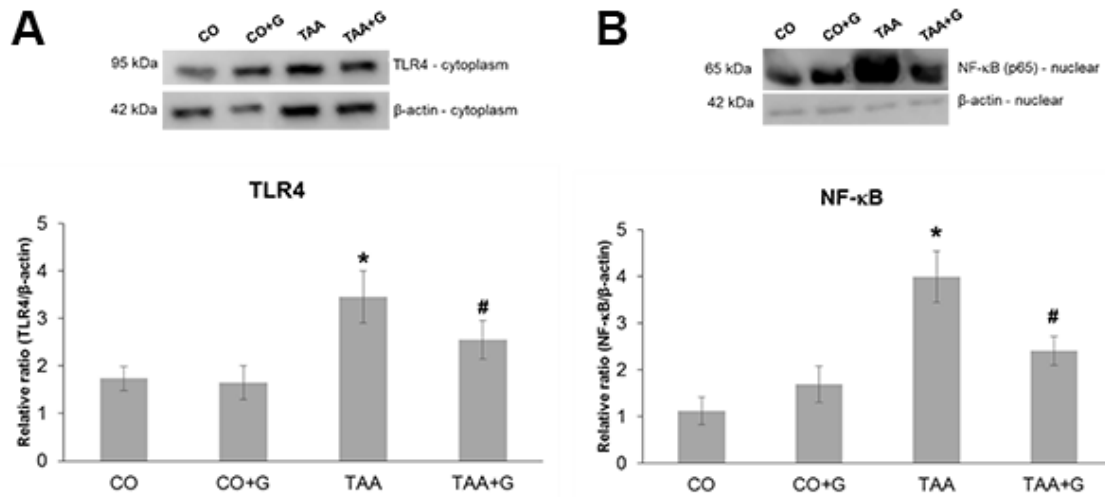
# Significant increase in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.01$ ).



**Figure 6 Effect of glutamine in experimental severe acute liver failure.** Western blot analysis of protein expression of **A) TLR4** and **B) NF $\kappa$ B**. Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

\* Significant increase in the TAA group vs. groups CO and CO + G ( $P < 0.001$ ).

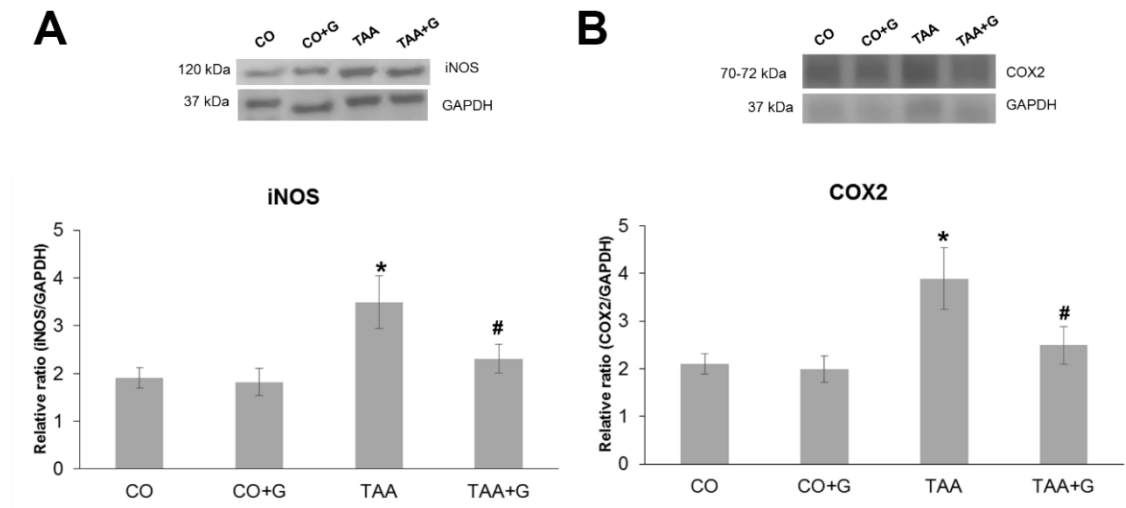
# Significant decrease in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.001$ )



**Figure 7 Effect of glutamine in experimental severe acute liver failure.** Western blot analysis of protein expression of **A) COX-2** and **B) iNOS**. Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

\* Significant increase in the TAA group vs. groups CO and CO + G ( $P < 0.001$ ).

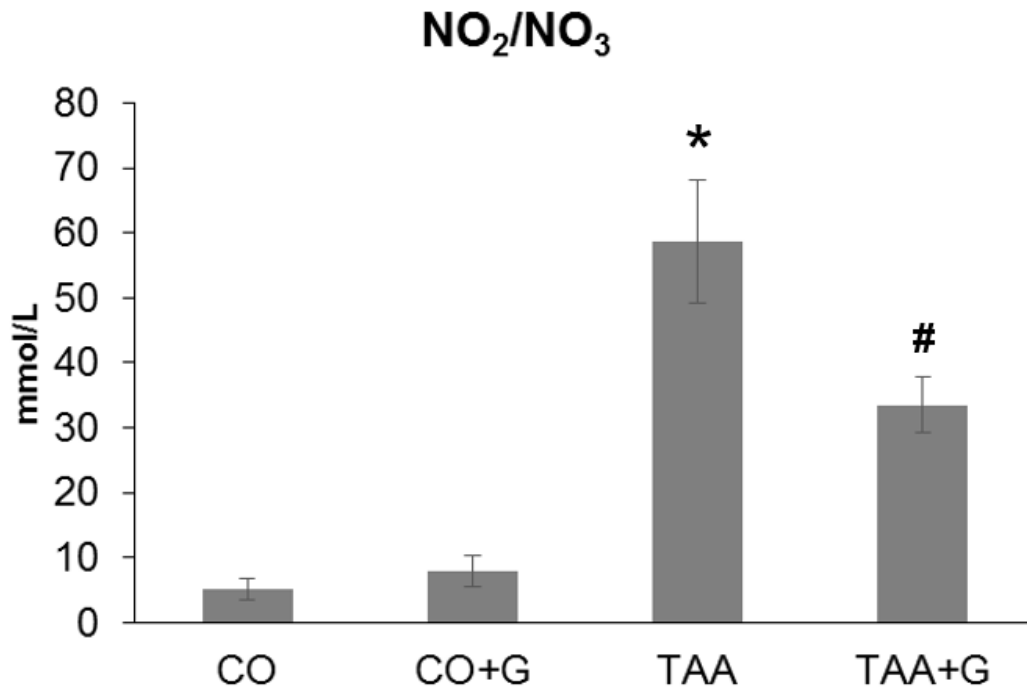
# Significant decrease in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.01$ )



**Figure 8 Effect of glutamine on levels of nitric oxide metabolites (nitrites and nitrates) in the liver of rats with severe acute liver failure.** Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

\* Significant increase in the TAA group vs. groups CO and CO + G ( $P < 0.001$ ).

# Significant decrease in the TAA + G group vs. the TAA group ( $P < 0.05$ )





**TABLES****Table 1 Effect of glutamine on transaminase levels in rats with severe acute liver failure.**

Enzyme	CO	CO + G	TAA	TAA + G
AST (U/L)	38.25±5.82	44.96±5.69	623.58±51.66 <sup>a</sup>	269.38±33.26 <sup>b</sup>
ALT (U/L)	29.65±4.65	33.45 ± 3.12	326.27±33.65 <sup>a</sup>	66.54±9.49 <sup>b</sup>
ALP (U/L)	21.36 ± 2.69	19.64 ± 0.96	71.49±4.22 <sup>a</sup>	29.64±3.33 <sup>b</sup>

AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; ALP, alkaline phosphatase.

U/L, units per liter. Values expressed as mean ± standard error.

<sup>a</sup> Significant difference among groups TAA, CO, and CO + G ( $P < 0.05$ )

<sup>b</sup> Significant difference between groups TAA + G and TAA ( $P < 0.01$ )

**Table 2 Effect of glutamine on enzyme activity of catalase, glutathione peroxidase, and glutathione S-transferase in rats with experimental severe acute liver failure**

Enzyme	CO	CO + G	TAA	TAA + G
CAT ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	0.47 $\pm$ 0.04	0.51 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
GPx ( $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	0.31 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	0.72 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
GST ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$ )	231.64 $\pm$ 11.25	249.65 $\pm$ 26.38	769.75 $\pm$ 55.69 <sup>b</sup>	326.81 $\pm$ 41.25 <sup>c</sup>

Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

Significant difference among groups TAA, CO, and CO + G (<sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.001$ )

<sup>c</sup> Significant difference between groups TAA + G and TAA ( $P < 0.001$ )

**Table 3 Effect of glutamine on levels of proinflammatory cytokines in the liver of rats with experimental severe acute liver failure**

Cytokine	CO	CO + G	TAA	TAA + G
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	61.10 $\pm$ 1.81	62.19 $\pm$ 1.32	465.96 $\pm$ 15.90 <sup>a</sup>	104.69 $\pm$ 8.57 <sup>b</sup>
IL-6 (pg/mL)	73.22 $\pm$ 0.98	78.21 $\pm$ 0.88	359.40 $\pm$ 12.62 <sup>a</sup>	155.93 $\pm$ 6.93 <sup>b</sup>
IL-10 (pg/mL)	145.69 $\pm$ 0.99	136.25 $\pm$ 1.23	58.28 $\pm$ 4.55 <sup>a</sup>	99.25 $\pm$ 3.11 <sup>b</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0.68 $\pm$ 0.23	0.71 $\pm$ 0.25	2.98 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	1.45 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>

Values expressed as mean  $\pm$  standard error.

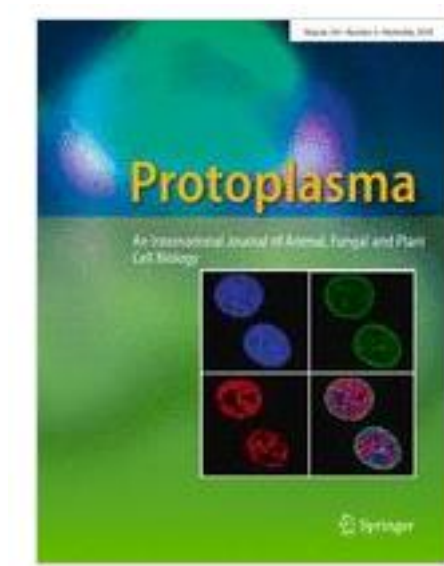
\* Significant difference among groups TAA, CO, and CO + G ( $P < 0.001$ )

# Significant difference between groups TAA + G and TAA ( $P < 0.01$ )

## 7.2 Artigo 2

“Glutamine modulates heat shock proteins, endoplasmic reticulum stress and cell death in rats with thioacetamide-induced liver failure”

Submetido para publicação na revista *Protoplasma*.



**PROTOPLASMA** Editorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW  
 MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: elizschemitt

Submissions Being Processed for Author Elizângela Gonçalves Schemitt

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action ▲	Manuscript Number ▲▼	Title ▲▼	Initial Date Submitted ▲▼	Status Date ▲▼	Current Status ▲▼
<a href="#">View Submission</a> <a href="#">Author Status</a>	PROT-D-18-00327	Glutamine modulates heat shock proteins, endoplasmic reticulum stress and cell death in rats with thioacetamide-induced liver failure	06-11-2018	06-11-2018	Submitted to Journal

**Glutamine modulates heat shock proteins, endoplasmic reticulum stress and cell death in rats with thioacetamide-induced liver failure**

**Elizângela Gonçalves Schemitt<sup>1,5,6</sup>, Renata Minuzzo Hartmann<sup>1,5,6</sup>, Josieli Rakopf Colares<sup>1,5,6</sup>, Francielli Licks<sup>2,5,6</sup>, Jéferson de Oliveira Salvi<sup>3,5,6</sup>, Cláudio Augusto Marroni<sup>4,5</sup>, Javier González-Gallego<sup>7</sup>, Norma Possa Marroni<sup>1,2,3,5,6,8</sup>**

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Biological Sciences: Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>3</sup> Postgraduate Program in Cellular and Molecular Biology applied to Health, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>4</sup> Postgraduate Program in Hepatology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>5</sup> Laboratory of Experimental Hepatology and Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>6</sup> Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>7</sup> Institute of Biomedicine (IBIOMED) and Centro de Investigación Biomedica en Redde Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), University of León, León, Spain

<sup>8</sup> Postgraduate Program in Applied Genetics and Toxicology, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author:

Elizângela Gonçalves Schemitt

Phone: +55 51 9896-7872

E-mail: elizschemitt@yahoo.com.br

ORCID of the authors:

Elizângela Gonçalves Schemitt 0000-0003-3015-0192

Renata Minuzzo Hartmann 0000-0001-8667-517X

Josieli Rakopf Colares 0000-0002-0482-204X

Francielli Licks 0000-0002-3668-5879

Jéferson de Oliveira Salvi 0000-0003-0954-412X

Cláudio Augusto Marroni 0000-0002-1718-6548

Norma Possa Marroni 0000-0001-7856-7953

Javier González-Gallego 0000-0002-4386-9342

## Abstract

Severe acute liver failure (SALF) is characterized by sudden dysfunction of liver cells in previously healthy persons without known underlying liver disease. Effective therapeutic approaches are necessary in an attempt to minimize the damage resulting from liver failure. Glutamine is considered to be an amino acid that plays many essential metabolic functions. This study was designed to evaluate the action of glutamine in protecting against cellular disturbances resulting from thioacetamide (TAA)-induced SALF in rats. Two doses of thioacetamide (400 mg/kg) and 3 doses of glutamine (25 mg/kg) (ip) were administered. The experiment lasted 48 hours. Glutamine reduced blood levels of AST and ALT in TAA-treated rats. Histological evaluation indicated that glutamine acted in tissue protection by reducing the inflammatory infiltrate, ballooning and centrilobular necrosis induced by SALF, consequently restoring the hepatic parenchyma. Glutamine increased total protein levels and decreased carbonylated protein levels in the liver of SALF animals. Glutamine also acted by modulating HSF-1 and heat shock proteins expression, as well as by decreasing the expression of proteins involved in endoplasmic reticulum stress (GRP78, ATF6 and CHOP), and modifying the expression of apoptosis-related (Bcl -2, Bax and caspase 3) and autophagy-related (mTOR, Beclin1 and LC3 $\alpha/\beta$ ) proteins. These effects related to changes in PI3K, Akt and FOXO3a expression. Data obtained support a potential hepatoprotective role of glutamine in SALF

**Keywords** Acute Liver Failure – Glutamine - Heat shock proteins - Endoplasmic reticulum stress – Apoptosis - Autophagy

## Introduction

Severe acute liver failure (SALF), often called fulminant hepatitis (FH), is an uncommon clinical syndrome dependent on multiple etiologies, which occurs in previously healthy patients as a result of sudden loss of hepatocyte functions associated with coagulopathy and encephalopathy. It is a fast-progressing (occurring in a matter of days or a few weeks), often fatal disorder. Liver transplantation is the most effective therapy for this condition, characterizing an emergency, but not always possible due to the fast progression and/or scarcity of organs, which limits its use (Singh et al., 2014). Reproducible experimental animal models that resemble SALF clinical conditions are still needed to test new therapeutic approaches (Crespo et al., 2010, San-Miguel et al., 2014).

The xenobiotic thioacetamide (TAA) is a crystalline organosulfur compound that causes cytomegaly and impairs hepatic activity, which can lead to carcinogenesis. In experimental models it is used to induce toxicity because it promotes acute toxic liver injury, characterized by centrilobular necrosis with subsequent regenerative response and severe SALF (Kucera et al., 2011, Zargar et al., 2017).

Different mechanisms, including alteration of heat shock proteins, ER stress and cell death processes are implicated in the pathophysiology of severe SALF. Under conditions of cellular stress and in response to exposure to toxic components, there may be a disruption in the capacity of the chaperone system (or heat shock proteins). This system consists of two main components, regulation of heat shock factors (HSFs) and heat shock proteins (HSPs). The HSFs (such as HSF1) can activate the HSPs when cells are under stress conditions, as they maintain cell survival by repairing or degrading damaged proteins (Li et al., 2018). Any disturbance of cellular homeostasis may result in excessive accumulation of unfolded proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), triggering ER stress, which leads to activation of the unfolded protein response (UPR) through translocation of the transmembrane transcription factor (ATF6) to the cell nucleus, where it binds to specific regulatory elements and influences the expression of ER stress response genes, such as GRP78 and CHOP proteins (Crespo et al., 2012 ; Niu et al., 2017).

Apoptosis and autophagic changes also occur in SALF (Tuñon et al., 2011 San-Miguel et al., 2014; Vallejo et al., 2014). Apoptosis, characterized by cellular

shrinkage, bubble formation in membranes and chromatin condensation, is accompanied by activation of proteases and caspases. Abnormal expression of the Bax and Bcl-2 family of proteins plays an important role in the cascade of reactions that activate caspase-3, triggering the apoptotic cell death (Bao et al., 2018). Autophagy is a catabolic process that involves the self-degradation of cellular components in a process controlled by a molecular complex containing the Beclin-1 protein, which activates the formation of autophagosomes by converting cytosolic-3-associated light cell protein (LC3-I) to the LC3-II form. This connects to the membrane promoting the elongation and finalization of the autophagosome, which fuses with lysosomes (San-Miguel et al., 2014, Vallejo et al., 2014). The target protein of rapamycin in mammals (mTOR) is a central regulator of cell growth whose regulation or activation under conditions of stress or accumulation of toxins leads to autophagic processes (Niu et al. 2017).

The PI3K/Akt signaling pathway is essential in the regulation of cell growth and proliferation, glucose uptake and cell survival through a number of mechanisms. PI3K promotes a signaling cascade that activates molecules related to cell survival. Akt responds to multiple cellular stimuli, making it an important regulator of the survival signals or cell death (Li et al., 2017). The class of forkhead proteins (FOXO) form a family of transcription factors, including FOXO3a, which are phosphorylated and regulated by Akt, resulting in a wide range of biological processes (Fluteau et al., 2015).

Glutamine (Gln) is considered to be a conditionally essential amino acid that plays an important role in the intermediate metabolic pathway. It acts as a precursor to peptides, proteins, neurotransmitters, and nitrogen bases, is used to produce energy in various organs and participates in cell proliferation, immune function, acid-base balance and the regulation of gene expression (Wang et al., 2018 ). Gln is the most abundant amino acid in the blood flow and plays a central role in nitrogen transport. It is a fuel for rapidly dividing cells and has many other essential metabolic functions (Crespo et al., 2012).

In the present study we investigated the effects of glutamine on heat shock proteins, endoplasmic reticulum stress, markers of cell death and PI3K/Akt pathway in rats with experimental SALF induced by administration of TAA.

## **Materials and methods**



## Ethical considerations

All animal procedures were in accordance with 2008 Brazilian Law 11,794 and followed the standards of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA). The study was approved by the Ethical Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre (HCPA) under nº 15-0175. The study was conducted at the Animal Experimentation Unit (UEA) and at the HCPA Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology .

## Experimental procedures

The animals were kept in plastic boxes (47x34x18cm) lined with wood shavings, with a light/dark cycle of 12 hours and temperature between 18 and 22 °C during the experiment. Water and feed were given *ad libitum*. Twenty-eight male Wistar rats weighing about 300 g were used at 3 months of age. The animals were divided into four groups: control (CO), control glutamine (CO+G), thioacetamide (TAA) and thioacetamide treated with glutamine (TAA+G).

For induction of SALF, two doses of 400 mg/kg/animal TAA diluted in 1 ml of 0.9% NaCl (ip) were administered at 8-hour intervals (Schemitt et al., 2016). In the animals of the CO group, 1 mL of 0.9% NaCl was administered. The treatment was performed with Gln (25 mg/kg) diluted in 1 mL of 0.9% NaCl and administered (ip) in the animals of the CO+G and TAA+G groups. The first administration was performed SALF an hour after the last administration of TAA. The following doses were given 24 and 36 hours after the start of the experiment, respectively. TAA and Gln were from Sigma Chemical®, St. Louis, USA.

After 48 hours, the animals were weighed and anesthetized with ketamine hydrochloride (95 mg/kg) and 2% xylazine hydrochloride (8 mg/kg) ip. Blood was collected from the retro-orbital plexus with a glass capillary tube and placed in a heparinized tube.

The animals were submitted to euthanasia by excess anesthetics, at a dose three times higher than usual, following the guidelines for euthanasia practice of the National Council of Control of Animal Experimentation (Brazil, 2016). Once death was confirmed, shaving and disinfection of the abdominal region were performed with

subsequent surgical intervention, initiated with medial ventral laparotomy, and subsequent liver removal for analysis and storage in sections. One fragment was frozen at -80 °C for further analysis and another fragment was immersed in 10% formaldehyde solution for 24 hours for histological analysis.

### **Liver enzymes**

A Labtest® Liquiform enzymatic kit was used for plasma determination by kinetic measurement of enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT).

### **Microscopic evaluation**

Tissue samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. In the next step, the paraffin blocks were attached to the microtome (Leitz® 1512) for obtaining 3- $\mu$  sections. In the staining phase, slides were dipped in hematoxylin & eosin (HE) dyes for 5 minutes each, then subjected to a running water bath. In the dehydration phase, the structures passed through 3 containers with absolute alcohol and 2 with xylol. Thereafter, the coverslip was placed on the slide using Canada Balsam. The slides were evaluated through a microscope equipped with a digital camera to capture images using Image-Plus software (Media Cybernetics®, Bethesda, USA) at 200X magnification.

### **Preparation of homogenates**

Nine ml of phosphate buffer were used per gram of tissue and then homogenized in Ultra-Turrax (IKA-WERK) for approximately 40 seconds and kept on ice, followed by centrifugation in Refrigerated Centrifuge (SORVALL RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge) for 10 minutes at 4000 rpm (Llesuy et al., 1985). The precipitate was discarded and the supernatant used to quantify total and carbonylated proteins.

### **Total and carbonylated protein**

Total protein concentration in liver homogenate was quantified by the Bradford method (Bradford 1976). A commercial kit (MAK 094 Sigma-Aldrich, USA) was used to determine carbonylated proteins at a spectrophotometric absorption of 375nm.

### **Western blotting**

Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared from liver homogenates using a specific lysis buffer and protease inhibitors (Moreira et al., 2004). The supernatant fraction was collected and stored at -80 °C in aliquots for further analysis. The lysed proteins were separated by dodecyl gel sulfate-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Mauriz 2007 et al.; San-Miguel et al., 2006). The membranes were then blocked with 5% skim milk in Tris buffer containing 0.05% Tween (TTBS) for 60 minutes at 37 °C. Thereafter, primary antibodies were incubated and remained under stirring overnight at 4 °C. The following proteins were evaluated: HSF-1 (75 kDa), HSP27 (27 kDa), HSP70 (70 kDa), HSP90 (90 kDa), ATF-6 (90 kDa), GRP78 (78 kDa), CHOP (30 kDa), PI3K (85 kDa), Akt (62 kDa), FOXO3A (87-99 kDa), Bcl-2 (26 kDa), BAX (23 kDa), Caspase 3 (32 kDa), mTOR (211-245 kDa), Beclin-1 (60 kDa) e LC3 $\alpha/\beta$  (15-18 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:200 to 1:1000 dilution with TTBS in skim milk at 5%. Primary antibody bound to HRP was detected with anti-mouse IgG , anti-rabbit IgG or anti-goat IgG antibodies (Santa Cruz Bio Technology, Santa Cruz, CA, USA ). Protein detection was performed by chemiluminescence using a commercial ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little ChSALFont, UK) (Tunon et al., 2013). The density of specific bands was quantified through image densitometry software (Scion Image , Maryland, MA).

### **Statistical analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The groups were compared by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls Student test for multiple comparisons. The data were analyzed with the GraphPad InsTat 3.1 program.

### **Results**

### **Effects of glutamine on liver integrity**

Measurement of AST and ALT levels in plasma showed that there was a significant increase of both enzymes ALT in the TAA group as compared to the control groups ( $p < 0.001$ ) and a significant decrease in the TAA+G group as compared to the TAA group ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1).

The histopathological evaluation of liver of rats with TAA-induced SALF showed severe loss of hepatic architecture, with presence of inflammatory infiltrate, ballooning and extensive centrilobular necrosis. These findings are similar to those found in human SALF, evidencing the efficacy of the experimental model. In contrast, in the photomicrograph of the Gln-treated group, re-structuring of the hepatic parenchyma was observed, with reduction of the inflammatory infiltrate and ballooning and important reduction of necrotic areas (Fig. 2).

### **Effects of glutamine on liver proteins**

Quantification of total protein levels (Fig. 3a) in liver homogenates showed a significant decrease in the TAA group compared to control groups ( $p < 0.001$ ) and a significant increase in the TAA+G group compared to the TAA group ( $p < 0.05$ ). An inverse behavior was observed in carbonylated protein levels (Figure 3b), where there was a significant increase in the TAA group in relation to CO and CO+G groups ( $p < 0.001$ ) and a significant decrease in the glutamine-treated group ( $p < 0.05$ ).

### **Effects of glutamine on heat shock proteins**

In the analysis of HSF-1 transcription factor (Fig. 4) and HSP70 and HSP90 proteins (Fig. 5) expression, a significant increase was observed in the TAA group in relation to the CO and CO+G groups ( $p < 0.05$ ) and a significant decrease in the TAA+G group ( $p < 0.01$ ). HSP27 (Fig. 5) was decreased in the TAA group ( $p < 0.05$ ) and increased in the TAA+G group as compared to the TAA group ( $p < 0.05$ ).

### **Effects of glutamine on markers of ER stress**

Concerning markers of ER stress, analysis of ATF6 transcription factor and CHOP and GRP78 proteins (Fig. 6) expression showed a significant increase in the TAA group in relation to the CO and CO+G groups ( $p < 0.01$ ) and a significant decrease in the TAA+G group ( $p < 0.05$ ).

### **Effects of glutamine on markers of apoptosis and autophagy**

The results for expression of proteins involved in the apoptosis cascade are shown in Fig. 7. Expression of Bcl-2 protein was decreased in the TAA group relative to control groups ( $p < 0.001$ ) and increased in the Gln-treated group ( $p < 0.001$ ). The Bax trigger protein and the apoptosis effector protein caspase 3, were increased in the TAA group relative to the CO and CO+G groups ( $p < 0.05$ ) and this expression decreased significantly in the group of Gln-treated animals ( $p < 0.05$ ).

The analysis of the autophagy-related proteins mTOR, Beclin1 and LC3 $\alpha/\beta$  protein expression (Fig. 8) showed a significant increase in the TAA group as compared to control groups ( $p < 0.01$ ) and a significant decrease in the TAA+G group as compared to the control group TAA ( $p < 0.05$ ).

### **Effects of glutamine on the PI3K/Akt pathway and FOXO proteins**

Several molecules are mediators in cell signaling pathways and activate different cascades that culminate in the most diverse mechanisms within the cell. Fig. 9 shows the results of the evaluation of PI3K, Akt and FOXO3a proteins expression. PI3K expression was decreased in the TAA group as compared to controls ( $p < 0.05$ ) and increased in the Gln-treated group ( $p < 0.05$ ). Akt and FOXO3a proteins that participate in the activation of the apoptosis cascade were increased in the TAA group ( $p < 0.001$ ) and decreased in the TAA+G group as compared to the TAA group ( $p < 0.01$ ).

## **Discussion**

In this study, impairment of liver integrity was evidenced by changes in blood AST and ALT. These findings were also reported by other authors who evaluated hepatic enzymes in experimental models (Kucera et al., 2011, Zargar et al., 2017). Gln was

able to reduce enzyme levels, thus showing its ability to protect against liver damage induced by TAA. Other studies have evidenced this protective action of Gln by restoring liver integrity in animals (Schemitt et al., 2016; Singh et al., 2014).

Centrilobular necrosis is a histopathological characteristic seen in human SALF. Experimental studies have shown the presence of necrosis in SALF using the xenobiotic TAA as an inducer of the disease in rats (Kucera et al., 2011; Zargar et al., 2017). In our research, the presence of necrosis in animals of the TAA group was also confirmed by the histopathological study. Gln, in turn, acted by minimizing the deleterious effects of TAA, being possibly able to stimulate the liver regeneration capacity.

We also found that TAA treatment led to a decrease in total protein levels. Similar results were found in a previous study from our lab (Schemitt et al., 2016). TAA metabolites also lead to the formation of oxidative molecules that react with proteins contributing to the carbonylation process (Sokolovic et al., 2013). In this study, Gln increased total protein levels and decreased carbonylated protein levels, confirming its hepatoprotective action.

As a consequence of oxidative reactions and the presence of toxins, cells induce the expression of cellular defense mechanisms including heat shock proteins. HSFs regulate HSP expression to protect cells against stress-induced toxicity (Li et al., 2018). HSP27 plays an important role in regulating the balance between cell death and survival (Han et al. 2018). The protein repair mechanism promoted by HSP70 involves folding cycles, similar to that occurring in freshly synthesized peptide chains, being essential for the restoration of cellular homeostasis (Castro et al., 2013). The HSP90 system is directed to the conformation control of signaling proteins. In the initial folding and assembly, many proteins require subsequently the company of these HSPs to remain in a functionally active conformation, even under stress conditions (Buchberger et al., 2013). In the present study, Gln decreased HSF-1 expression and regulated HSP27, HSP70 and HSP90 expression. Other authors have also observed this modulating effect of Gln on proteins of the chaperone system in different experimental studies (Hartmann et al., 2017; Li et al., 2018; Zuhl et al. 2015).

A deficiency in the chaperone system leads to the accumulation of misfolded or unfolded proteins, which is an important ER stress-inducing factor. Transcription factor ATF-6, proteins CHOP and GRP78 are good markers of ER stress, since

studies have demonstrated their increased expression under ER dysfunction conditions (Crespo et al., 2012, Liu et al., 2017, Wen et al., 2018). Our study corroborate these findings because it showed an increase in these ER stress markers in the group of animals receiving the xenobiotic TAA. On the other hand, Gln decreased this expression in the group of treated animals. Crespo et al. (2012) also reported this decrease in Gln-treated rats in a model of TNBS-induced colitis (Crespo et al., 2012).

In the mechanisms of apoptosis, decrease of Bcl -2 expression inhibits pro-survival proteins and consequently leads to release of Bax protein and cleavage of caspase 3 (Molpeceres et al. 2007). It has been reported that attenuation of apoptosis contributes to the beneficial effects of melatonin in SALF (Tuñon et al., 2011). In diabetic rats glutamine promoted protection against apoptosis by increasing Bcl-2 expression and decreasing Bax and caspase 3 (Medras et al., 2018). Similar results were obtained in our study, which demonstrated the hepatoprotective effect of Gln on apoptosis parameters in the experimental model of TAA-induced SALF.

In the present study, we also observed a decrease in Beclin1 and LC3 expression in glutamine-treated animals, evidencing the inhibition of the autophagic pathway. Beclin1 signals the initiation of the process and LC3 participates in the autophagosome that culminates in the completion of the autophagic process. Other authors have also shown a similar decrease using melatonin as treatment in a model of SALF induced by virus in rabbits (San-Miguel et al., 2014, Vallejo et al., 2014). The mTOR protein integrates multiple signals of growth factors, nutrients and cellular energy state to control a wide range of metabolic processes, including autophagy. In this study we found that Gln decreased mTOR expression, contributing to the inactivation of processes involved in autophagy, in contrast to what was observed in the group of untreated animals, where mTOR expression was increased. Li et al. (2017) also observed this increase in a study evaluating cell death activation pathways in D-GalN/LPS-induced SALF (Li et al., 2017).

In order to maintain the balance between processing and loading of proteins, signaling pathways are activated that are essential for cell survival, such as PI3K/Akt. In the present study it was observed that Gln increased PI3K expression and decreased Akt expression. Similar changes have been reported in a study evaluating SALF induced by galactosamine/liposaccharide (Li et al., 2017). In vitro studies have demonstrated that Gln-mediated cellular survival occurred through

modulation of the ratio between Pik3 and phosphorylated Akt (Larson et al., 2007, Wang et al., 2018). Taken together, these results may indicate this pathway as a protective mechanism with the purpose of limiting the additional apoptosis associated with cell stress.

FOXO transcription factors control various biological functions, including apoptosis (Fluteau et al., 2015). A recent study demonstrated that FOXO3a activation suppressed the growth of pancreatic cancer and metastasis by correlating its findings with activation of the apoptotic pathway (Nagarajan et al., 2017). In the present study, Gln decreased FOXO3a expression possibly by inactivating the apoptosis pathway.

Therefore, data here reported indicate that Gln protected the livers of rats submitted to the experimental model of SALF by acting on heat shock proteins, reducing ER stress and acting positively on the pathways that involve cell death processes, thus contributing to cell survival. Further studies will be deepened into the mechanisms of the therapeutic action of Gln and to investigate other pathways involved in the pathophysiology of severe SALF which could be modulated by Gln.

**Acknowledgments** The authors are grateful to the Research and Events Incentive Fund (FIPE) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), the Lutheran University of Brazil (ULBRA), the Coordination for Improvement of Higher Level Personnel - Brazil (CAPES) - Finance Code 001, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Foundation for Research Support of Rio Grande do Sul (FAPERGS). CIBERehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III, Spain

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.



## References

- Bao J, Ye C, Zheng Z, Zhou Z (2018) Fmr1 protects cardiomyocytes against lipopolysaccharide-induced myocardial injury. *Exp Ther Med* 16:1825-1833 doi:10.3892/etm.2018.6386
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Buchberger E, El Harchi M, Payrhuber D, Zommer A, Schauer D, Simonitsch-Klupp I, Bilban M, Brostjan C (2013) Overexpression of the transcriptional repressor complex BCL-6/BCoR leads to nuclear aggregates distinct from classical aggresomes. *PLoS One* 8:e76845 doi:10.1371/journal.pone.0076845
- Castro S, Lobo C, Figueiredo J, Ribeiro A, Rodrigues G (2013) Heat shock protein Hsp70: structure and action in response to cellular stress. *AVB* 7:11
- Crespo I, San-Miguel B, Laliena A, Alvarez M, Cuolebras JM, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ (2010) Melatonin prevents the decreased activity of antioxidant enzymes and activates nuclear erythroid 2-related factor 2 signaling in an animal model of fulminant hepatic failure of viral origin. *J Pineal Res* 49:193-200 doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00787.x
- Crespo I, San-Miguel B, Prause C, Marroni N, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ (2012) Glutamine treatment attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS-induced colitis. *PLoS One* 7:e50407 doi:10.1371/journal.pone.0050407
- Fluteau A, Ince PG, Minett T, Matthews FE, Brayne C, Garwood CJ, Ratcliffe LE, Morgan S, Heath PR, Shaw PJ, Wharton SB, Simpson JE (2015) The nuclear retention of transcription factor FOXO3a correlates with a DNA damage response and increased glutamine synthetase expression by astrocytes suggesting a neuroprotective role in the ageing brain. *Neurosci Lett* 609:11-17 doi:10.1016/j.neulet.2015.10.001
- Gonzalez FJ, Fang ZZ, Ma X (2015) Transgenic mice and metabolomics for study of hepatic xenobiotic metabolism and toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 11:869-881 doi:10.1517/17425255.2015.1032245

- Han L, Jiang Y, Han D, Tan W (2018) Hsp27 regulates epithelial mesenchymal transition, metastasis and proliferation in colorectal carcinoma. *Oncol Lett* 16:5309-5316 doi:10.3892/ol.2018.9286
- Hartmann RM, Licks F, Schemitt EG, Colares JR, do Couto Soares M, Zobot GP, Fillmann HS, Marroni NP (2017) Protective effect of glutamine on the main and adjacent organs damaged by ischemia-reperfusion in rats. *Protoplasma* 254:2155-2168 doi:10.1007/s00709-017-1102-3
- Kucera O, Lotkova H, Stankova P, Podhola M, Rousar T, Mezera V, Cervinkova Z (2011) Is rat liver affected by non-alcoholic steatosis more susceptible to the acute toxic effect of thioacetamide?. *Int J Exp Pathol* 92:281-289 doi:10.1111/j.1365-2613.2011.00765.x
- Larson SD, Li J, Chung DH, Evers BM (2007) Molecular mechanisms contributing to glutamine-mediated intestinal cell survival. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G1262-1271 doi:10.1152/ajpgi.00254.2007
- Li PC, Li XN, Du ZH, Wang H, Yu ZR, Li JL (2018) Di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP)-induced kidney injury in quail (*Coturnix japonica*) via inhibiting HSF1/HSF3-dependent heat shock response. *Chemosphere* 209:981-988 doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.158
- Li Y, Lu L, Luo N, Wang YQ, Gao HM (2017) Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway protects against d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure by chaperone-mediated autophagy in rats. *Biomed Pharmacother* 92:544-553 doi:10.1016/j.biopha.2017.05.037
- Liu Y, Pan X, Li S, Yu Y, Chen J, Yin J, Li G (2017) Endoplasmic reticulum stress restrains hepatocyte growth factor expression in hepatic stellate cells and rat acute liver failure model. *Chem Biol Interact* 277:43-54 doi:10.1016/j.cbi.2017.08.015
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S (1985) Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71:241-249
- Mauriz JL, Molpeceres V, Garcia-Mediavilla MV, Gonzalez P, Barrio JP, Gonzalez-Gallego J (2007) Melatonin prevents oxidative stress and changes in antioxidant enzyme expression and activity in the liver of aging rats. *J Pineal Res* 42:222-230 doi:10.1111/j.1600-079X.2006.00409.x

- Medras ZJH, El-Sayed NM, Zaitone SA, Toraih EA, Sami MM, Moustafa YM (2018) Glutamine up-regulates pancreatic sodium-dependent neutral amino acid transporter-2 and mitigates islets apoptosis in diabetic rats. *Pharmacol Rep* 70:233-242 doi:10.1016/j.pharep.2017.10.009
- Molpeceres V, Mauriz JL, García-Medivilla MV, González P, Barrio JP, González-Gallego J. (2007) Melatonin is able to reduce the apoptotic liver changes induced by aging via inhibition of the intrinsic pathway of apoptosis. *J gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:687-695
- Moreira AJ, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni C, Marroni N, González-Gallego J. (2004) Quercetin prevents oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 68:1939-1946 doi: 10.1016/j.bcp.2004.07.016
- Nagarajan A, Dogra SK, Sun L, Gandotra N, Ho T, Cai G, Cline G, Kumar P, Cowles RA, Wajapeyee N (2017) Paraoxonase 2 Facilitates Pancreatic Cancer Growth and Metastasis by Stimulating GLUT1-Mediated Glucose Transport. *Molcell* 67:685-701 e686 doi:10.1016/j.molcell.2017.07.014
- Niu M, Dai X, Zou W, Yu X, Teng W, Chen Q, Sun X, Yu W, Ma H, Liu P (2017) Autophagy, endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in intracerebral hemorrhage. *Transl Neurosci* 8:37-48 doi:10.1515/tnsci-2017-0008
- San-Miguel B, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ (2006) N-acetyl-cysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure. *Apoptosis* 11:1945-1957 doi:10.1007/s10495-006-0090-0
- San-Miguel B, Crespo I, Vallejo D, Alvarez M, Prieto J, Gonzalez-Gallego J, Tunon MJ (2014) Melatonin modulates the autophagic response in acute liver failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res* 56:313-321 doi:10.1111/jpi.12124
- Schemitt EG, Colares JR, Hartmann RM, Morgan-Martins M, Marroni CA, Tuñon MJ, Marroni NP (2016) Effect of glutamine on oxidative stress and inflammation in a rat model of fulminant hepatic failure. *Nutr Hosp* 33:92 doi:10.20960/nh.92
- Singh S, Mondal P, Trigun SK (2014) Acute liver failure in rats activates glutamine-glutamate cycle but declines antioxidant enzymes to induce oxidative stress in

- cerebral cortex and cerebellum. *PLoS One* 9:e95855  
doi:10.1371/journal.pone.0095855
- Sokolovic D, Djordjevic B, Kocic G, Veljkovic A, Marinkovic M, Basic J, Jevtovic-Stoimenov T, Stanojkovic Z, Sokolovic DM, Pavlovic V, Djindjic B, Krstic D (2013) Melatonin protects rat thymus against oxidative stress caused by exposure to microwaves and modulates proliferation/apoptosis of thymocytes. *Gen Physiol Biophys* 32:79-90 doi:10.4149/gpb\_2013002
- Soultati A, Dourakis SP (2006) Pathogenesis of Fulminant Hepatic Failure. *Ann Gastroenterol* 19:313-24
- Tuñón MJ, San-Miguel B, Crespo I, Laliena A, Vallejo D, Álvarez M, Prieto J, González-Gallego J. (2013) Melatonin treatment reduces endoplasmic reticulum stress and modulates the unfolded protein response in rabbits with lethal fulminant hepatitis of viral origin. *J Pineal Res* 55:221-228 doi:10.1111/jpi.12063
- Tuñón MJ, San Miguel B, Crespo I, Jorquera F, Santamaría E, Alvarez M, Prieto J, González-Gallego J. (2011) Melatonin attenuates apoptotic liver damage in fulminant hepatic failure induced by the rabbit hemorrhagic disease virus. *J Pineal Res* 50:38-45 doi:10.1111/j.1600-079X.2010.00807.x
- Vallejo D, Crespo I, San-Miguel B, Alvarez M, Prieto J, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J (2014) Autophagic response in the rabbit hemorrhagic disease, an animal model of virally-induced fulminant hepatic failure. *Vet Res* 45:15 doi:10.1186/1297-9716-45-15
- Wang C, Deng Y, Yue Y, Chen W, Zhang Y, Shi G, Wu Z (2018) Glutamine enhances the hypoglycemic effect of Insulin in L6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/glucose transporter 4 (GLUT4) signaling pathway. *Med Sci Monit* 24:1241-50
- Wen J, Lin H, Zhao M, Tao L, Yang Y, Xu X, Jia A, Zhang J, Weng D (2018) Piceatannol attenuates D-GalN/LPS-induced hepatotoxicity in mice: Involvement of ER stress, inflammation and oxidative stress. *Int Immunopharmacol* 64:131-139 doi:10.1016/j.intimp.2018.08.037
- Zargar S, Wani TA, Alamro AA, Ganaie MA (2017) Amelioration of thioacetamide-induced liver toxicity in wistar rats by rutin. *Int J Immunopathol Pharmacol* 30:207-214 doi:10.1177/0394632017714175

Zuhl M, Dokladny K, Mermier C, Schneider S, Salgado R, Moseley P (2015) The effects of acute oral glutamine supplementation on exercise-induced gastrointestinal permeability and heat shock protein expression in peripheral blood mononuclear cells. *Cell Stress Chaperones* 20:85-93  
doi:10.1007/s12192-014-0528-1

## Figure Legends

**Fig. 1** Effects of SALF and glutamine on liver integrity through analysis of enzymes aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*Significant difference in TAA group in relation to CO and CO+G groups ( $p < 0.001$ ). #Significant difference in TAA+G group compared to TAA group ( $p < 0.001$ ).

**Fig. 2** Microphotographs of livers from the different experimental groups. In CO and CO+G groups, a normal hepatic parenchyma is observed. In TAA group, notice the destruction of the parenchyma with the presence of inflammatory infiltrate (if), ballooning (b) and necrosis (n). TAA+G shows liver tissue regeneration and damage reduction. Hematoxylin & eosin. Magnification: 200x.

**Fig. 3** Effects of SALF and glutamine on liver total protein (a) and carbonylated proteins (b) levels. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*Significant difference in TAA group in relation to CO and CO+G groups ( $p < 0.001$ ). #Significant difference in TAA+G group in relation to TAA group ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 4** Effects of SALF and glutamine on HSF-1 facto. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*Significant difference in TAA group in relation to CO+CO groups, and G ( $p < 0.01$ ). #Significant difference in the TAA+G group compared to the TAA group ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 5** Effects of SALF and glutamine on heat shock proteins. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*Significant difference in TAA group in relation to CO and CO+G groups ( $p < 0.05$ ). #Significant difference in TAA+G group compared to TAA group ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 6** Effects of SALF and glutamine on endoplasmic reticulum stress. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*Significant difference in TAA group in relation to CO and CO+G groups ( $p < 0.01$ ). #Significant difference in TAA+G group in relation to TAA group ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 7** Effects of SALF and glutamine on apoptosis. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significant difference in TAA group in relation to CO and CO+G groups (\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ ). Significant difference in TAA+G group compared to AAR group (\*\* $p < 0.001$ , ##  $p < 0.05$ ).

**Fig. 8** Effects of SALF and glutamine on autophagy. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*Significant difference in TAA group in relation to CO and CO+G groups ( $p < 0.05$ ). #Significant difference in TAA+G group in relation to TAA group ( $p < 0.05$ ).

**Fig. 9** Effects of SALF and glutamine on PI3K/Akt and FOXO3a pathways. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Significant difference in TAA group as compared to CO and CO+G groups (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ). Significant difference in TAA+G group compared to the TAA group (\*\* $p < 0.05$ , ##  $p < 0.001$ ).

Figure 1

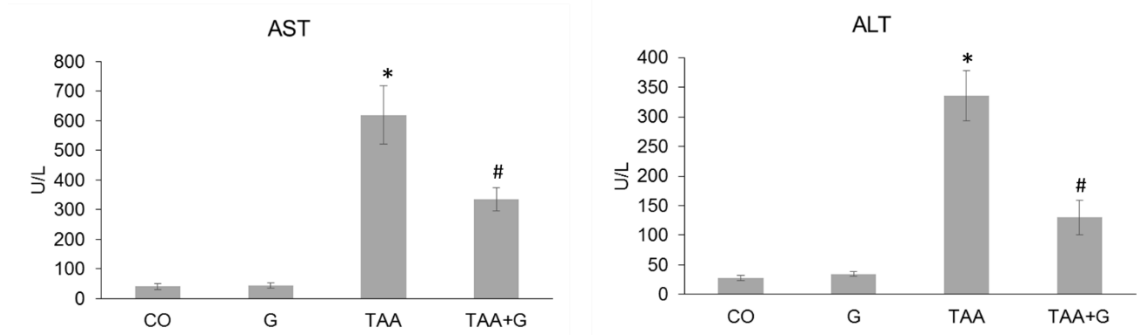
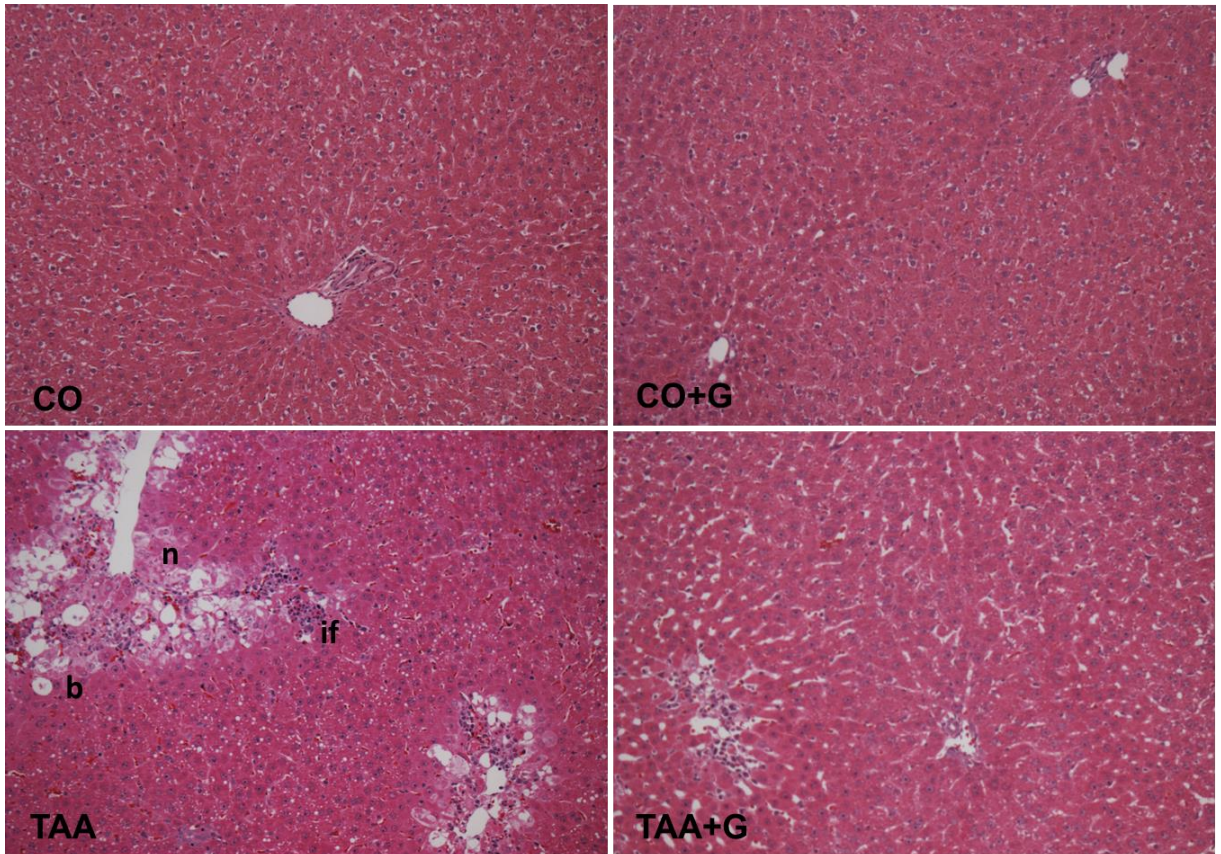
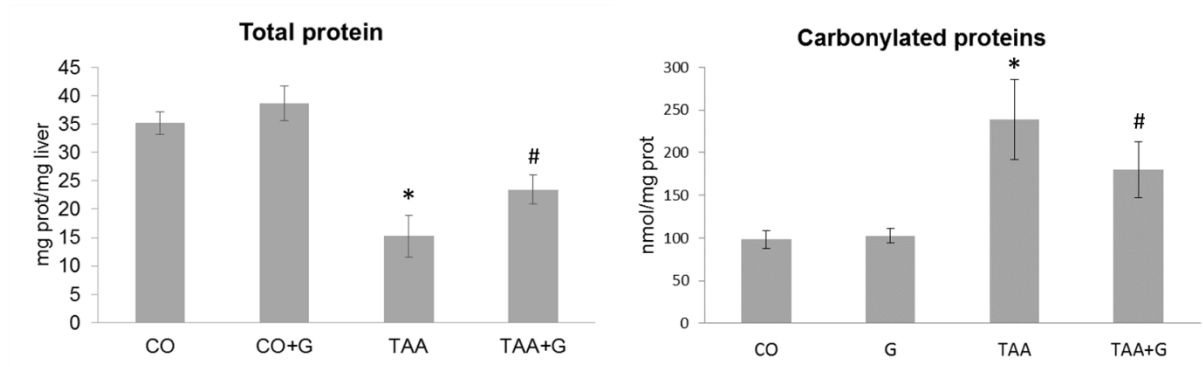


Figure 2

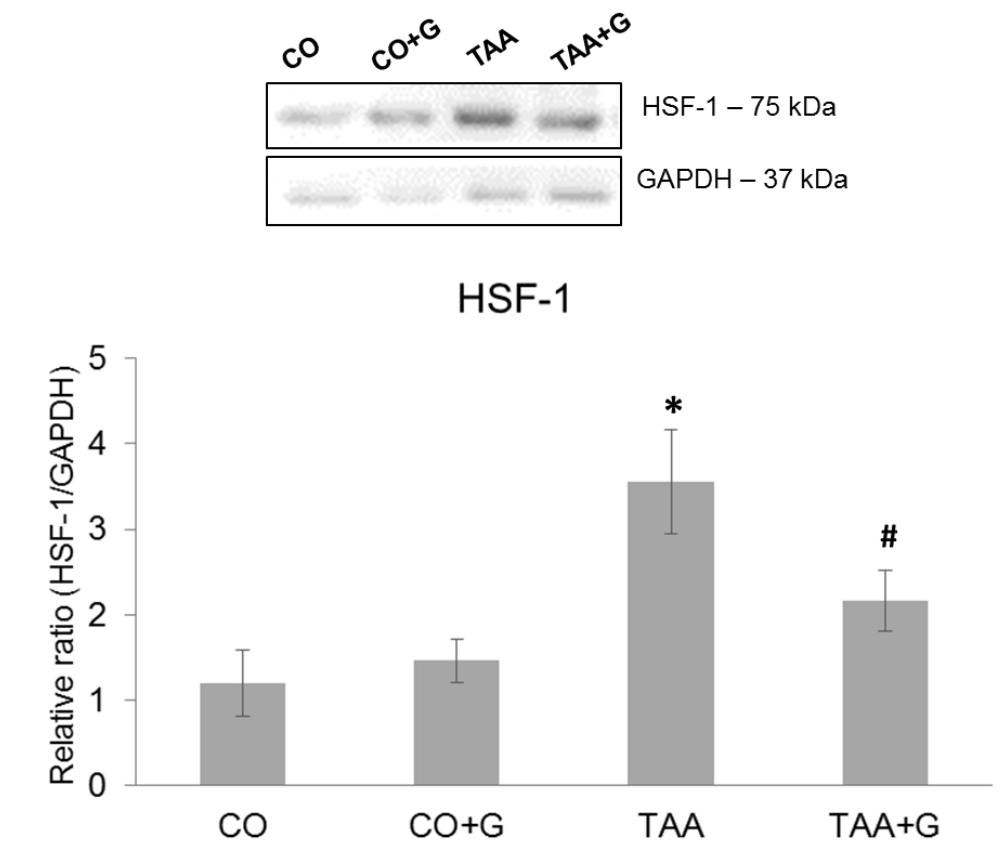




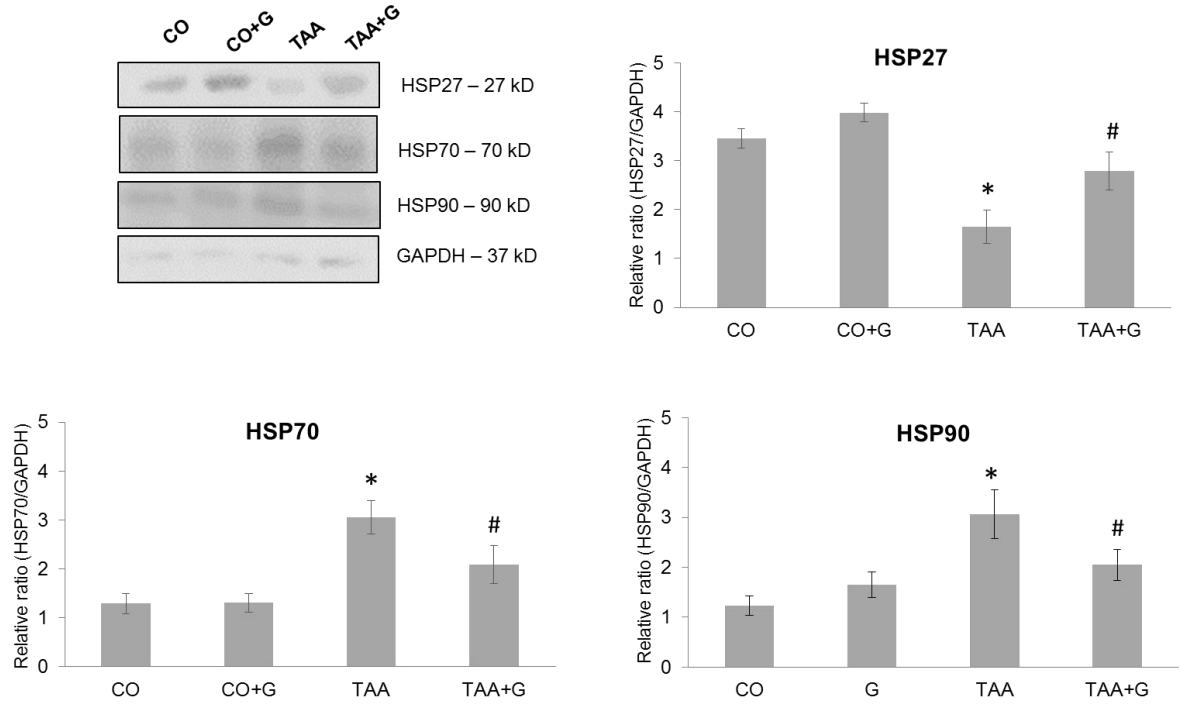
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

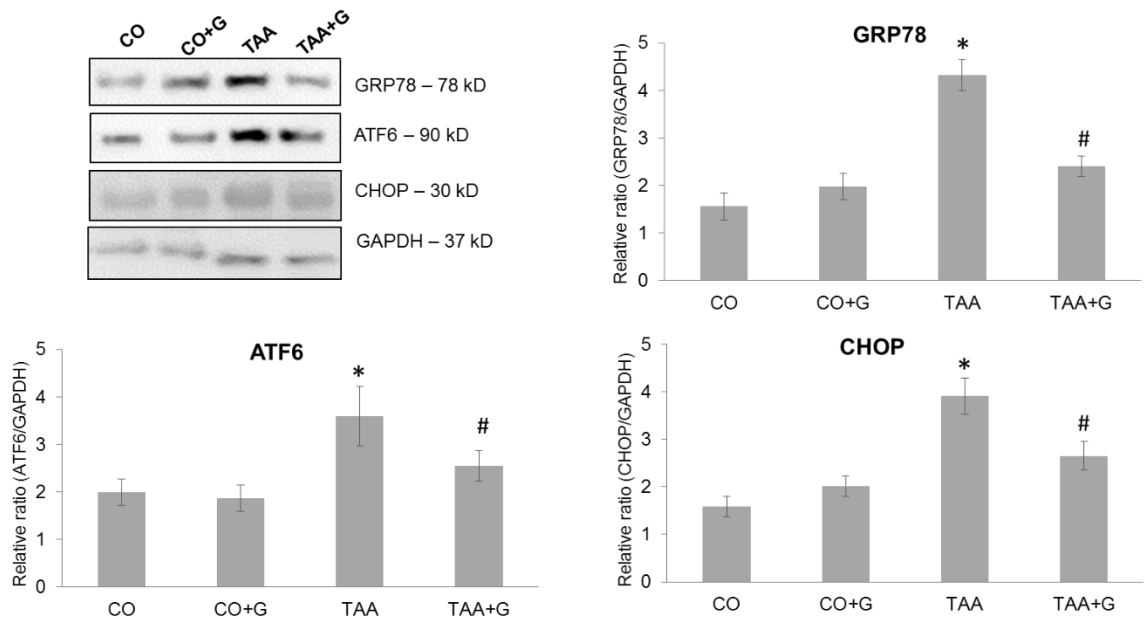


Figure 7

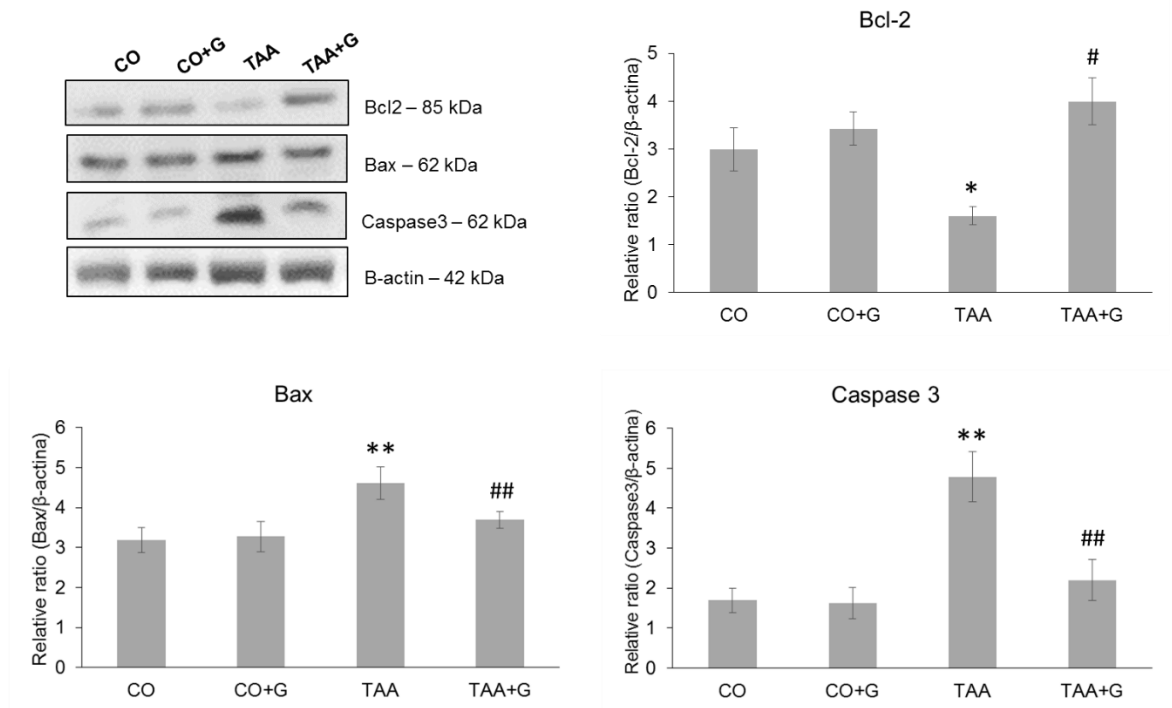


Figure 8

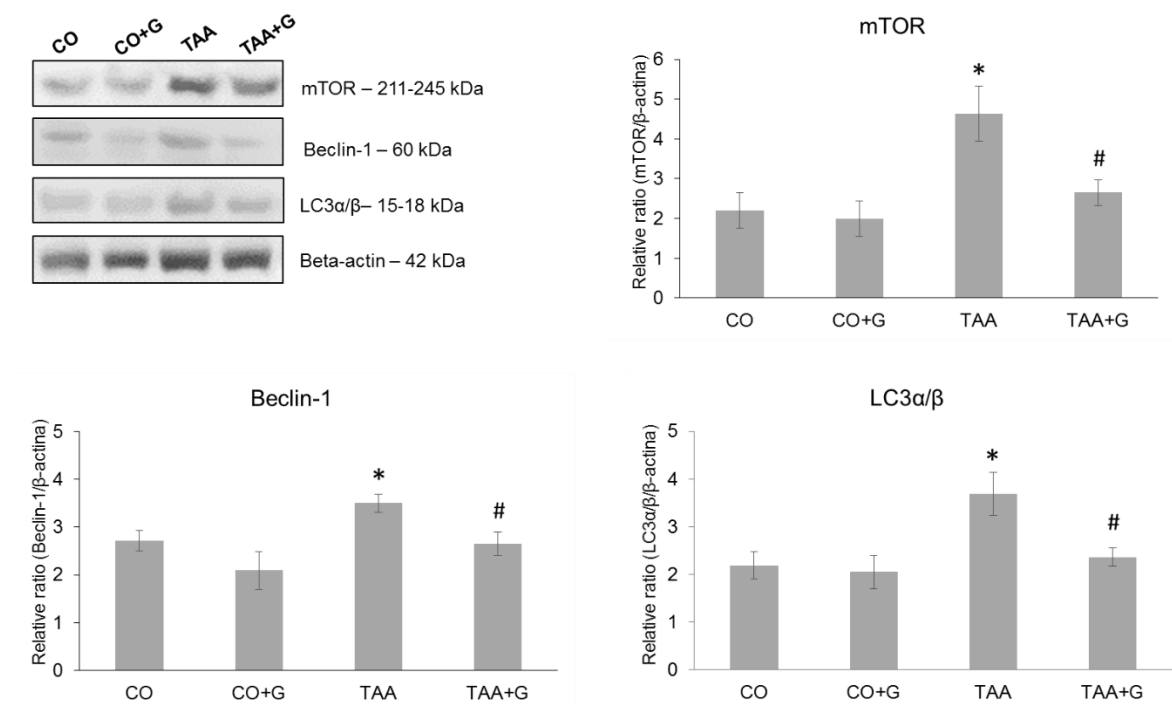
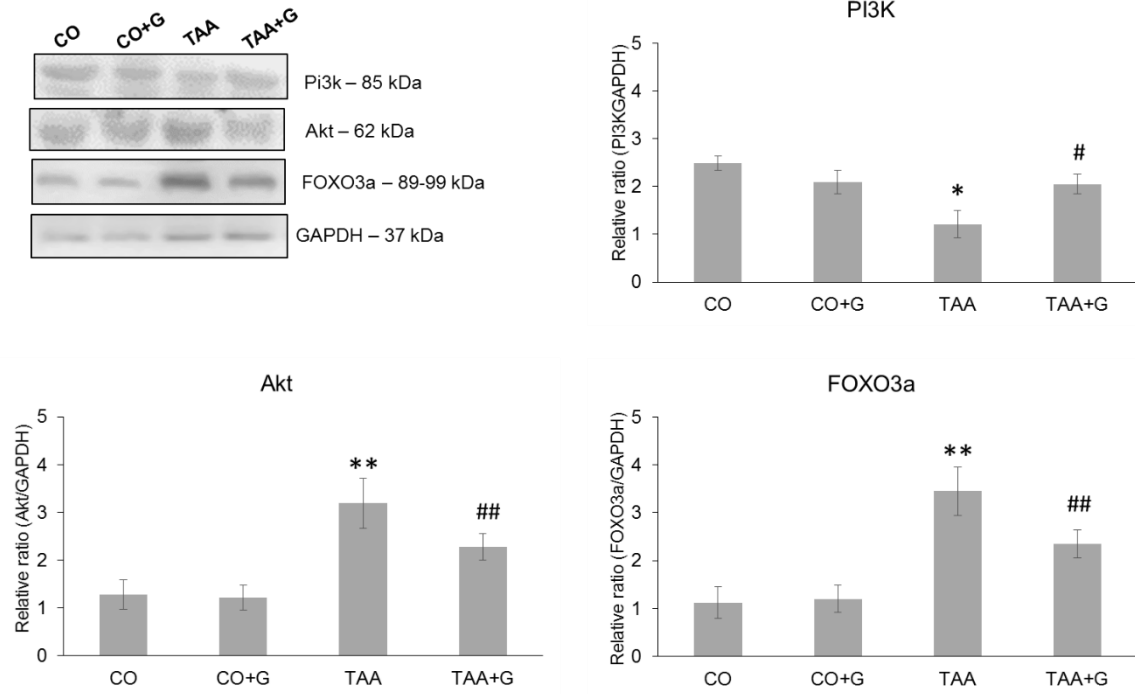


Figure 9



## 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.

As terapias atualmente utilizadas não se mostram eficazes para o tratamento da IHAG. O conhecimento dos mecanismos oxidativos, inflamatórios, de proteção celular, de estresse de retículo e de morte celular, envolvidos na doença é de suma importância para a compreensão da fisiopatologia dessa síndrome. Em tratamentos futuros, a glutamina poderá ser uma escolha eficaz como estratégia terapêutica.

### 8.1 Conclusões do artigo I: Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure

A partir dos dados obtidos, a administração da glutamina:

- diminuiu os níveis séricos das enzimas que avaliam a integridade hepática AST, ALP e FA;
- diminuiu os danos teciduais evidenciados na análise microscópica;
- diminuiu a lipoperoxidação;
- restaurou a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e da atividade da enzima detoxificadora GST;
- modulou a expressão do fator nuclear Nrf2, seu inibidor KEAP1 e da proteína NQO1;
- diminuiu os níveis de GSH;
- diminuiu o processo inflamatório, evidenciado pela modulação do TNF- $\alpha$ , TLR4, Nf- $\kappa$ B, das citocinas, da iNOS e dos metabólitos do óxido nítrico – nitritos e nitratos.

8.2 Conclusões do Artigo II: *Glutamine modulates heat shock proteins, endoplasmic reticulum stress and cell death in rats with thioacetamide-induced liver failure*

A administração de glutamina foi capaz de:

- diminuir os níveis séricos das enzimas AST e ALT;
- aumentar os níveis das proteínas totais e diminuir os níveis de proteínas carboniladas no fígado dos animais;
- modular as proteínas de choque térmico HSF-1, HSP27, HSP70 e HSP90.
- diminuir a expressão de enzimas relacionadas ao estresse de retículo endoplasmático;
- modular proteínas envolvidas nas vias de sinalização celular;
- modular as proteínas relacionadas à apoptose (Bax Bcl2 e caspase 3) e diminuir a expressão de proteínas relacionadas à autofagia (mTOR, Beclin-1 e LC3 $\alpha/\beta$ ).
- diminuir a necrose, o infiltrado inflamatório e a balonização no tecido hepático;

Em decorrência dos resultados obtidos neste trabalho, confirmamos a eficácia do modelo experimental no desenvolvimento da IHAG e sugerimos que a glutamina, possa ser uma potencial terapia para a toxicidade hepática (figura 23).

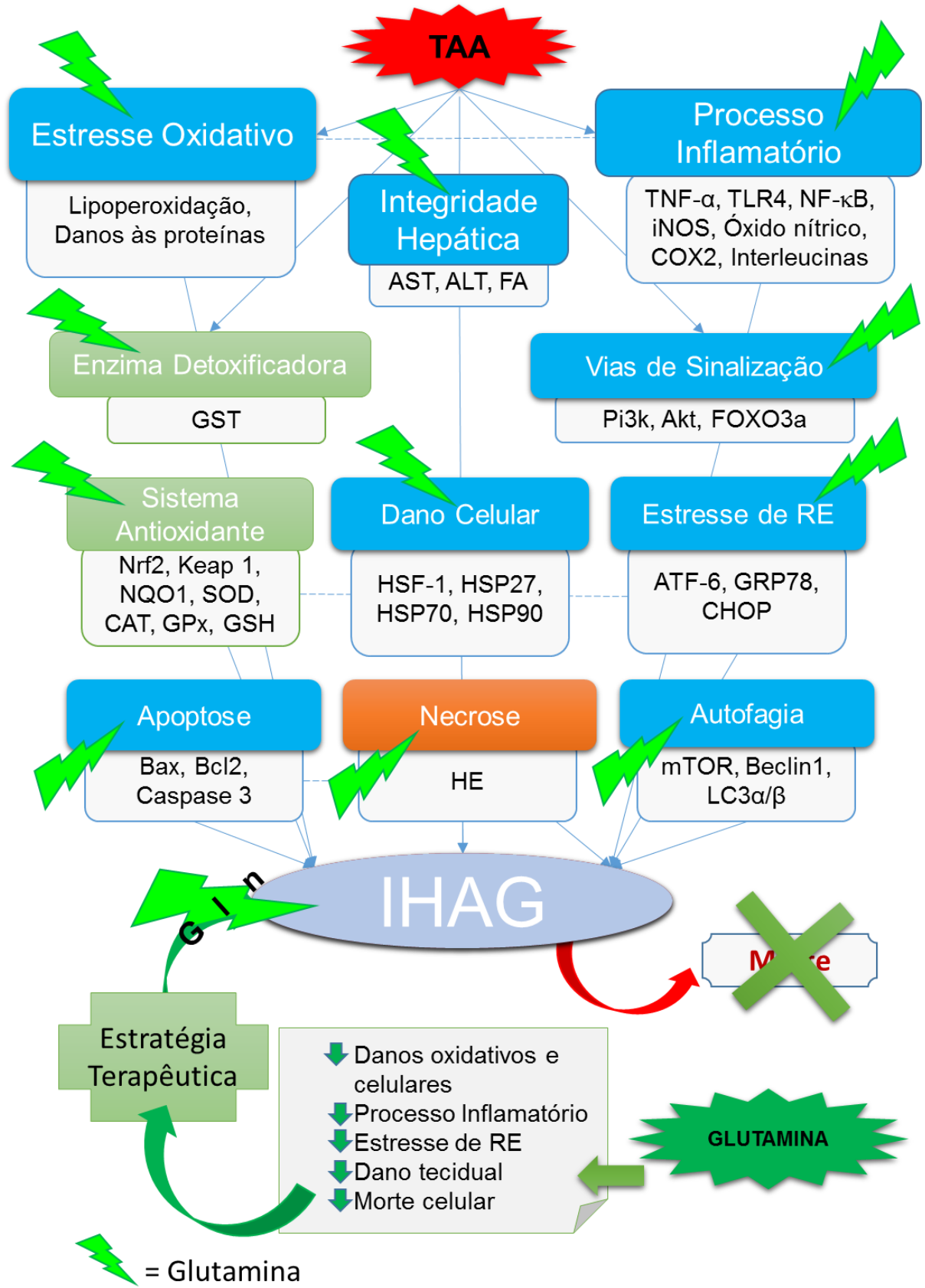


Figura 23. Ação da glutamina nas vias estudadas. Fonte: autora.

## 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, não são totalmente esclarecidos.

Dando continuidade ao estudo, utilizando o modelo experimental de IHAG induzido por tioacetamida, avaliaremos o metabolismo da amônia e outros mecanismos envolvidos na encefalopatia hepática decorrente da IHAG.

Dessa forma poderemos estreitar o eixo da bancada experimental ao leito hospitalar, desenvolvendo assim, uma pesquisa translacional (figura 24).

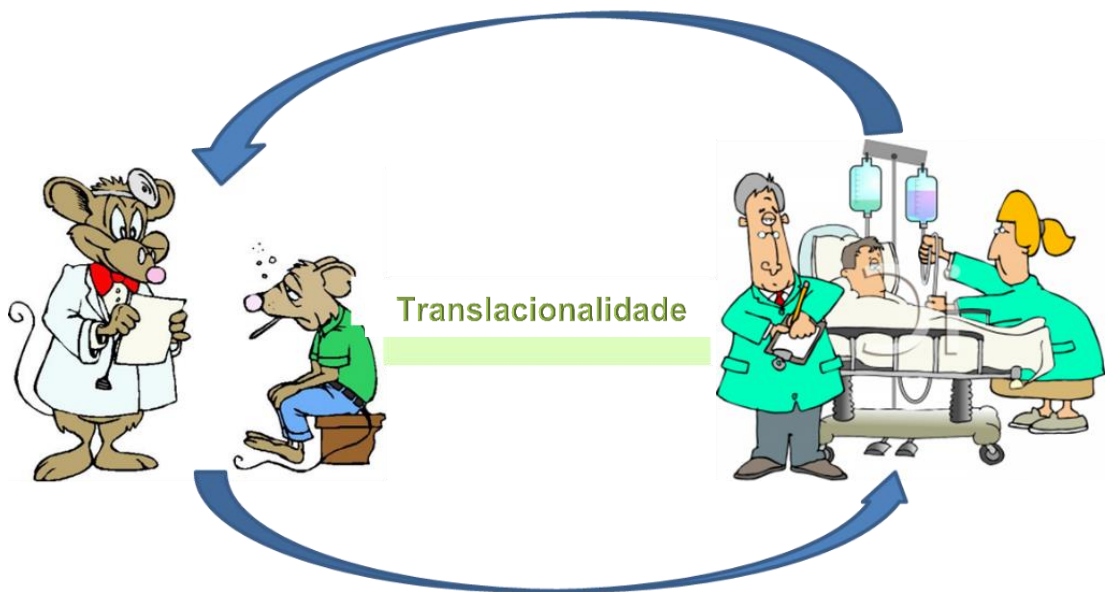


Fig  
ura

24. Medicina translacional: da bancada laboratorial à clínica médica. Fonte: adaptado de Bona, 2014.



10 ANEXOS

## 10. 1 Anexo A

Certificado de aprovação do projeto.

**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO****COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 150175

**Data da Versão do Projeto:** 02/06/2015

**Pesquisadores:**

NORMA ANAÍR POISSA MARRONI

JOSIELI RASKOPF COLARES

MARIANA DO COUTO SOARES

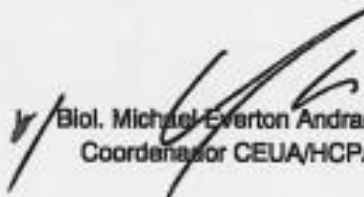
ELIZÂNGELA GONÇALVES SCHEWITT

**Título:** O papel protetor da glutamina no fígado de ratos com insuficiência Hepática Aguda Grave

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 15 de julho de 2015.

  
Biol. Michael Everton Andrades  
Coordenador CEUA/HCPA

## 10.2 Anexo B

**Artigos completos referentes à tese, enviados para publicação:**

SCHEMITT, ELIZÂNGELA GONÇALVES; HARTMANN, RENATA MINUZZO; COLARES, JOSIELI RAKOPF; LICKS, FRANCIELLI; SALVI, JÉFERSON DE OLIVEIRA; MARRONI, CLÁUDIO AUGUSTO; MARRONI, NORMA POSSA. Protective action of glutamine in rats with severe acute liver failure. (World Journal of Hepatology) 2018.

SCHEMITT, ELIZÂNGELA GONÇALVES; HARTMANN, RENATA MINUZZO; COLARES, JOSIELI RAKOPF; LICKS, FRANCIELLI; SALVI, JÉFERSON DE OLIVEIRA; MARRONI, CLÁUDIO AUGUSTO; GONZÁLEZ-GALLEGO, JAVIER; MARRONI, NORMA POSSA. Glutamine modulates heat shock proteins, endoplasmic reticulum stress and cell death in rats with thioacetamide-induced liver failure. (Protoplasma) 2018.

**Artigos completos publicados em periódicos durante a vigência do doutorado:**

THOEN, RUTIANE ULLMANN; BARTER, NATHANIELE NEBEL; SCHEMITT, ELIZÂNGELA; BONA, SILVIA; FERNANDES, SABRINA; CORAL, GABRIELA; MARRONI, NORMA POSSA; TOVO, CRISTIANE; GUEDES, RENATA PADILHA; PORAWSKI, MARILENE. Zinc supplementation reduces diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in rats. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*. v.1, p.Epub ahead of print, 2018.

NUNES, M. L.; SCHEMITT, ELIZÂNGELA; PORAWSKI, M. Anti-inflammatory and antioxidant effect of long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFAs) in diabetic rats. *International Journal of Food Science and Nutrition*. v.3, p.25 - 32, 2018.

SALVI, J. O.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; HARTMANN, R. M.; Marroni, C.A.; MARRONI, N. P. Action of Melatonin on Severe Acute Liver Failure in Rats. *JOURNAL OF PHARMACY AND BIOLOGICAL SCIENCES*. , v.12, p.62 - 75, 2017.

MIGUEL, F. M.; SCHEMITT, E. G.; COLARES, J. R.; HARTMANN, R. M.; MORGAN-MARTINS, M.I.; MARRONI, N. P. Action of vitamin e on experimental severe acute liver failure. *Arquivos de Gastroenterologia*. p.123 - 129, 2017.

HARTMANN, RENATA; LICKS, FRANCIELLI; SCHEMITT, ELIZÂNGELA GONÇALVES; COLARES, JOSIELI RASKOPF; DA SILVA, JULIANA; MOURA, ROSA MARIA; ZABOT, GILMARA PANDOLFO; FILLMANN, HENRIQUE SARUBBI; MARRONI, NORMA POSSA. Effect of glutamine on liver injuries induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Nutricion Hospitalaria*. v.34, p.548 , 2017.

HARTMANN, RENATA MINUZZO; LICKS, FRANCIELLI; SCHEMITT, ELIZÂNGELA GONÇALVES; COLARES, JOSIELI RASKOPF; DO COUTO SOARES, MARIANA; ZABOT, GILMARA PANDOLFO; FILLMANN, HENRIQUE SARUBBI; MARRONI, NORMA POSSA. Protective effect of glutamine on the main and adjacent organs damaged by ischemia-reperfusion in rats. *Protoplasma*. v.254, p.7 - 14, 2017.

COLARES, JOSIELI RASKOPF; SCHEMITT, ELIZÂNGELA GONÇALVES; HARTMANN, RENATA MINUZZO; LICKS, FRANCIELLI; SOARES, MARIANA DO COUTO; BOSCO, ADRIANE DAL; MARRONI, NORMA POSSA. Antioxidant and anti-inflammatory action of melatonin in an experimental model of secondary biliary cirrhosis induced by bile duct ligation. *World Journal of Gastroenterology*. v.22, p.8918, 2016.

MOURA, ROSA MARIA; HARTMANN, RENATA MINUZZO; LICKS, FRANCIELLI; SCHEMITT, ELIZÂNGELA GONÇALVES; COLARES, JOSIELI RASKOPF; DO COUTO SOARES, MARIANA; FILLMANN, LUCIO SARUBBI; FILLMANN, HENRIQUE SARUBBI; MARRONI, NORMA POSSA. Antioxidant effect of mesalazine in the experimental colitis model induced by acetic acid. *Journal of coloproctology*. v.36, p.139 - 148, 2016.

GONÇALVES SCHEMITT, ELIZÂNGELA; RASKOPF COLARES, JOSIELI; MINUZZO HARTMANN, RENATA; MORGAN-MARTINS, MARÍA ISABEL;

MARRONI, CLÁUDIO AUGUSTO; TUÑÓN, M. JESÚS; POSSA MARRONI, NORMA. Efecto de la glutamina en el estrés oxidativo y la inflamación en un modelo de rata con insuficiencia hepática fulminante. *Nutricion Hospitalaria*. v.33, p.210 - 219, 2016.

COLARES, JOSIELI RASKOPF; SCHEMITT, ELIZÂNGELA GONÇALVES; HARTMANN, RENATA MINUZZO; MOURA, ROSA MARIA; MORGAN-MARTINS, MARIA ISABEL; FILLMANN, HENRIQUE SARUBBI; FILLMANN, LÚCIO; MARRONI, NORMA POSSA. Effect of lecithin on oxidative stress in an experimental model of rats colitis induced by acetic acid. *Journal of coloproctology*. v.36, p.97 - 103, 2016.

LICKS, FRANCIELLI; HARTMANN, RENATA MINUZZO; SCHEMITT, ELIZÂNGELA; COLARES, JOSIELI RASKOPF; FILLMANN, LÚCIO SARUBBI; FILLMANN, HENRIQUE; MARRONI, NORMA POSSA. Inflammatory bowel and oxidative stress changes in an experimental model of portal hypertension: action of N-acetylcysteine. *Journal of coloproctology*. , v.36, p.231 - 239, 2016.

LICKS, F.; HARTMANN, R. M.; MARQUES, C.M.; SCHEMITT, E.; COLARES, J. R.; Soares, M.C.; REYES, J; FISHER, C; Silva, J.; MARRONI, N. P. N-acetylcysteine modulates angiogenesis and vasodilation in stomach such as DNA damage in blood of portal hypertensive rats. *World Journal of Gastroenterology*. v.21, p.12351 - 12360, 2015.

MARRONI, N.P.; HARTMANN, R.; LICKS, F.; SCHEMITT, E.; COLARES, J.; SOARES, M.; ZABOT, G.; FILLMANN, H. The effect of glutamine in the liver injury resulting from intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Journal of Hepatology*. v.62, p.S294, 2015.

MARRONI, N.P.; LICKS, F.; HARTMANN, R.; MARQUES, C.; SCHEMITT, E.; SOARES, M.; REYS, J.; FISHER, C.; DA SILVA, J. N-acetylcysteine modulates angiogenesis, vasodilation and dna damage in stomach of portal hypertensive rats. *Journal of Hepatology*. v.62, p.S334, 2015.