



**Universidade Estadual de Campinas**

**Instituto de Química**

**Departamento de Físico Química**



**Efeitos da Administração Orogástrica de S-nitrosotióis  
e Avaliação Cinética da Propensão e Resistência à  
Obesidade Induzida por Dieta**

**Tese de Doutorado**

**Autor: Gabriela Freitas Pereira de Souza**

**Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira**

**Co-orientador: Lício Augusto Velloso**

**15 de julho de 2011  
Campinas – SP – Brasil**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

So89e Souza, Gabriela Freitas Pereira de.  
Efeitos da administração orogástrica de S-nitrosotióis e avaliação cinética da propensão e resistência à obesidade induzida por dieta / Gabriela Freitas Pereira de Souza. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira.  
Coorientador: Lício Augusto Velloso.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Óxido nítrico. 2. S-nitrosotiol. 3. Fluxo sanguíneo gástrico. 4. Obesidade. I. Oliveira, Marcelo Ganzarolli de. II. Velloso, Lício Augusto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Effect of oral administration of S-nitrosothiols and kinetic evaluation of propensity and resistance to diet induced obesity

**Palavras-chaves em inglês:** Nitric oxide, S-nitrosothiol, Gastric blood flow, Obesity

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Prof. Dr Marcelo Ganzarolli de Oliveira (orientador), Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva (ICB-USP), Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (FC-UFC), Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni (FCA-UNICAMP)

**Data de defesa:** 15/07/2011



## **Agradecimentos**

Agradeço ao Prof. Marcelo Ganzarolli de Oliveira pela orientação, pelos valiosos conselhos não apenas sobre os experimentos, mas sobre como fazer Ciência e pelas diversas oportunidades que me proporcionou de aprender.

Agradeço ao Prof. Lício Augusto Velloso por acolher com paciência uma aluna da química que queria saber biologia.

Agradeço à Profa. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo pelo fornecimento dos camundongos ob/ob e pelas discussões sobre o modelo de DGHNA.

Agradeço aos colegas de laboratório, os que já se foram e os que ainda estão presentes nos experimentos do dia a dia.

Agradeço em especial ao Fernando Ganzarolli, Gerson, Elisa, Jacqueline, Joseane, Carina, Cybele, Carol, Dennys, Guilherme, Marília, Lucas e Carla pela ajuda nos experimentos.

Agradeço ao Airton, pelo transporte dos animais, empréstimo de reagentes e discussões de mecanismos.

Agradeço ao Piquerobi e a Elisa por me ajudarem “dando o sangue pela pesquisa”.

Agradeço a todos os funcionários do IQ que tornam possível a realização dos estudos.

Agradeço ao Walker, pelo auxílio no Word.

Agradeço a FAPESP pela bolsa concedida.



*Aos meus pais, meu irmão e à Lolita*



## *Curriculum Vitae*

**Gabriela Freitas Pereira de Souza**

### ***Formação***

**Bacharelado em Química** – Instituto de Química – UNICAMP. 2003- 2007

**Doutorado em Química** – Instituto de Química – UNICAMP. Em andamento.  
2007-atual

### ***Histórico profissional***

#### **Bolsista de Iniciação Científica da FAPESP.**

Título do Projeto: “Biomateriais Doadores de Oxido Nítrico para o Tratamento da Leishmaniose Cutânea”. Orientação: Prof. Marcelo G. de Oliveira. Depto de Físico Química – IQ/UNICAMP

Bolsa: FAPESP. Início: Abril de 2004. Término Março 2007.

#### **Bolsista de Doutorado Direto da FAPESP.**

Título do Projeto: “Doadores de Oxido Nítrico para o Tratamento da Síndrome Metabólica: Mecanismo de Ação e Desenvolvimento de Formulações”.

Orientação: Prof. Marcelo G. de Oliveira. Depto de Físico Química – IQ/UNICAMP

Bolsa: FAPESP. Início: 12/2007

### ***Prêmios.***

*Menção Honrosa* pela apresentação do trabalho "Hidrogéis doadores de óxido nítrico para o tratamento da Leishmaniose Cutânea" no XII Congresso Interno de Iniciação Científica. UNICAMP, Campinas, SP, 22 e 23 de setembro de 2004.

### ***Artigos Publicados.***

1. Cariello, AJ; **de Souza, GFP**; Foronda, AS; Yu, MCZ; Hofling-Lima, AL; de Oliveira, MG. In vitro amoebicidal activity of S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 588-591, 2010.

2. Vercelino, R; Crespo, I; **Souza, GFP**; Cuevas, MJ; Oliveira, MG; Marroni, NP; González-Gallego, J; Tuñón, MJ. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *Journal of Molecular Medicine*, v. 88, p. 401-411, 2010.

3. Fraga, RS; Camacho, VR; **Souza, GF**; Cerski, CTS; de Oliveira, JR; de Oliveira, MG; Álvares-da-Silva, MR. S-Nitroso-N-Acetylcysteine: A Promising Drug for Early

Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Liver. *Transplantation Proceedings*, v. 42, p. 4491-4495, 2010.

4. Simplicio, FI; Seabra, AB; **de Souza, GFP**; de Oliveira, MG. In Vitro Inhibition of Linoleic Acid Peroxidation by Primary S-Nitrosothiols. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, p. 1885-1895, 2010.

5. Andraus, W; **de Souza, GFP**; de Oliveira, MG; Haddad, LB; Coelho, AMM; Galvão FH; Leitão, RMC; Machado MCC. S-Nitroso-N-Acetylcysteine ameliorates Ischemia-Reperfusion Injury. *Clinics*, v. 65, p. 715, 2010.

6. Seabra, AB; da Silva, R; **de Souza, GFP**; de Oliveira, MG. Antithrombogenic Polynitrosated Polyester/Poly(methyl methacrylate) Blend for the Coating of Blood-Contacting Surfaces. *Artificial Organs*, v. 32, p. 262-267, 2008.

7. **de Souza, GFP**; Yokoyama-Yasunaka, JKU; Seabra, AB; Miguel, DC; de Oliveira, MG; Uliana, SRB. Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: Implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Nitric Oxide Biology and Chemistry*, v. 15, p. 209-216, 2006.

8. Seabra, AB; **de Souza, GFP**; da Rocha, LL; Eberlin, MN; de Oliveira MG. S-Nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. *Nitric Oxide Biology and Chemistry*, v. 11, p. 263-272, 2004.

### ***Pedidos de Patentes***

1. de Oliveira MG, Seabra AB, de Souza, GFP. “Dispositivos para a síntese e incorporação de pré-aplicação de doadores de óxido nítrico em composições macromoleculares”. Patente N<sup>o</sup> BR0603802-6/PI0705221-9 A2 - 14/09 (2006).

2. de Oliveira MG, Seabra AB, de Souza GFP, Debom R, Pacheco O. “Process for synthesis and incorporation of nitric oxide donors in macromolecular compositions”. PCT/BR2007/000236-14/09 (2007); WO/2008/031182 A1-20/03 (2008).

3. de Oliveira MG, de Souza GFP, de Oliveira FG, de Oliveira CPMS, Velloso LA. “S-Nitrosothiols-containing compositions for the treatment of fatty liver diseases, obesity and other diseases associated with the metabolic syndrome and the use of such compositions”. Depósito: 20/04 (2007). Certificado de Adição de Invenção C10602397-5 E2. Depósitos em Fase Nacional nos EUA - N<sup>o</sup> US20070226406-20/04 (2007)-US12226406-09/01 (2009)-US2010062059 (A1)-11/03 (2010).

## Resumo

No presente estudo foram investigadas as ações fisiológicas associadas ao óxido nítrico (NO), obtidas topicamente na mucosa gástrica e sistemicamente nas administrações orais de dois S-nitrosotióis (RSNOs) doadores de NO, S-nitrosoglutationa (GSNO) e S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) em modelos animais. A aplicação tópica ex-vivo de soluções de RSNOs na mucosa gástrica de ratos Sprague-Dawley levou ao aumento dose-dependente do fluxo sanguíneo gástrico (FSG), medido por fluxometria por laser-Doppler, com FSG máximo *c.a.* 5 x maior do que os obtidos pela aplicação de soluções equimolares de nitrito ou nitrato. A administração oral de soluções de GSNO e SNAC se refletiu em aumentos tempo e dose-dependentes do nível plasmático de nitrito+nitrato em camundongos Swiss. A administração de SNAC na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) induzida em camundongos ob/ob ou Swiss não levou a alterações significativas na histologia hepática ou no padrão de aumento de massa dos animais. O acompanhamento cinético da estabilidade de soluções aquosas de GSNO e SNAC em função do pH e a identificação de seus produtos de decomposição, permitiram demonstrar que esses RSNOs se decompõem predominantemente através de mecanismos de hidrólise catalisada por ácido ou base com meias vidas máximas em torno do pH fisiológico. Observou-se que camundongos Swiss submetidos à dieta hiperlipídica apresentam um perfil heterogêneo de ganho de massa, que permite estabelecer uma correlação tempo-dependente da propensão e da resistência à obesidade com alterações nas expressões de neuropeptídeos hipotalâmicos e na resistência à insulina e intolerância à glicose.

**Palavras chave:** óxido nítrico; S-nitrosotióis; S-nitrosoglutationa; S-nitroso-N-acetilcisteínas; fluxo sanguíneo gástrico; obesidade induzida por dieta.



## Abstract

In the present study, the nitric oxide (NO)-associated physiological actions obtained topically on the gastric mucosa and systemically in oral administrations of two NO donors-S-nitrosothiols (RSNOs), S-nitrosoglutathione (GSNO) and S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) were investigated in animal models.

The topical *ex vivo* administration of RSNOs solutions on the gastric mucosa of Sprague-Dawley rats led to a dose-dependent increase in the gastric blood flow (GBF), measured by laser-Doppler flowmetry, with maximum GBF value *c.a.* 5 x higher than those obtained by equimolar applications of nitrite and nitrate solutions.

The oral administration of GSNO and SNAC solutions was reflected in a time and dose-dependent increases in the plasma nitrite+nitrate level in Swiss mice. SNAC administration on non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) induced in ob/ob or Swiss mice did not lead to significant changes in liver histology or in the mass gain pattern of the animals. The kinetic monitoring of the stability of aqueous GSNO and SNAC solutions as a function of pH and the identification of their decomposition products allowed to demonstrate that these RSNOs decay predominantly through mechanisms of acid or base-catalyzed hydrolysis, with maximum half-lives around the physiological pH.

It was observed that Swiss mice fed a high-fat diet show an heterogeneous mass gain profile, which allows establishing a time-dependent correlation of obesity propensity and resistance with changes in the expressions of hypothalamic neuropeptides and in insulin resistance and glucose tolerance.

**Key words:** nitric oxide; S-nitrosothiols; S-nitrosoglutathione; S-nitroso-N-acetylcysteine; gastric blood flow; diet induced obesity.



# Sumário

	Pág.
Lista de Abreviaturas	xiv
<b>1. Introdução</b>	1
1.1. Óxido Nítrico	1
1.2. S-nitrosotióis	4
1.3. NO e sistema gástrico	7
1.4. S-nitrosotióis e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica	9
1.5. Propensão e Resistência à obesidade	12
<b>2. Objetivos</b>	13
<b>3. Materiais e Métodos</b>	14
3.1. Animais	14
3.2. Síntese de GSNO e SNAC	14
3.3. Efeitos das aplicações tópicas de soluções de GSNO, SNAC, $\text{NO}_2^-$ e $\text{NO}_3^-$ no fluxo sanguíneo gástrico	15
3.4. Dosagem de Metabólitos de NO após administração orogástrica	16
3.5. Cinética da decomposição de RSNOs em função do pH e caracterização dos produtos de decomposição	19
3.6. Metabolismo de RSNOs em sangue	21
3.7. Metabolismo de RSNOs em tecidos	23
3.8. Administração orogástrica de SNAC e GSNO em modelos animais de doença do fígado gorduroso e obesidade induzida por dieta hiperlipídica	24

3.9. Administração oral de solução de SNAC em modelo animal de esteatose hepática induzida por dieta deficiente em metionina e colina	25
3.10. Propensão e Resistência à obesidade em camundongos Swiss expostos à dieta hiperlipídica	26
3.11. Análise Estatística	27
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>28</b>
4.1. Efeitos das aplicações tópicas de soluções de GSNO, SNAC, $\text{NO}_2^-$ e $\text{NO}_3^-$ no fluxo sanguíneo gástrico	28
4.2. Dosagem de Metabólitos após administração orogástrica	40
4.3. Decomposição de GSNO e SNAC em função do pH	44
4.4. Metabolismo de RSNOs em sangue e tecidos	58
4.5. Efeitos das administrações orogástricas de SNAC e GSNO em modelos animais de doença do fígado gorduroso e obesidade induzida por dieta	74
4.6. Propensão e Resistência à obesidade em camundongos Swiss expostos à dieta hiperlipídica	78
<b>5. Conclusões</b>	<b>86</b>
<b>6. Referências</b>	<b>87</b>

## Lista de Abreviaturas

AgRP: Peptídeo relacionado a agouti.

AINEs: Anti-inflamatórios não esteroidais.

AlbSNO: S-nitroso-albumina.

CART: Transcrito regulado por cocaína e anfetamina.

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, da Universidade Estadual de Campinas.

CiSNO: S-nitroso-cisteína.

DHGNA: Doença hepática gordurosa não alcoólica.

DTNB: Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico.

EDTA: Etilenodiaminotetraacetato de sódio.

FAD: Flavina-adenina dinucleotídeo.

FMN: Tetraidrobiopterina.

FSG: Fluxo sanguíneo gástrico.

GSH: Glutathione.

GSNO: S-nitroso-glutathione.

GSNOR: S-nitroso-glutathione reductase.

GSSG: Glutathione oxidada

GTT: Teste de tolerância à glicose.

HFD: Dieta rica em lipídios.

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência.

IL-6: Interleucina 6.

IL-8: Interleucina 8.

ITT: Teste de tolerância à insulina.

$K_{ITT}$ : Constante de velocidade para o desaparecimento da glicose.

MCD : Dieta deficiente em metionina e colina.

NAC: N-acetilcisteína.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo.

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.

NF- $\kappa$ B: Fator nuclear kappa B.

NO: Óxido Nítrico.

NO<sub>x</sub><sup>-</sup>: SNO, nitritos e nitratos totais.

NOS: Óxido nítrico sintase.

eNOS (ou NOS3): Óxido nítrico sintase endotelial.

iNOS (ou NOS2): Óxido nítrico sintase induzível.

nNOS (ou NOS1): Óxido nítrico sintase neuronal.

NPY: Neuropeptídeo Y.

OP: Propensão à obesidade.

OR: Resistência à obesidade.

PBS: Solução tampão fosfato pH 7,4.

PCysSH: Proteína com resíduo de cisteína.

PCysSNO: Proteína com resíduo de cisteína nitrosada.

POMC: Proopiomelanocortina.

RSH: Tiól.

RSNO: S-nitrosotiól.

RSSR: Tiól oxidado.

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa.

SNAC: S-nitroso-N-acetil-cisteína.

SNAP: S-nitroso-N-acetil-penicilamina.

SNEP: S-nitroso-penicilamina.

TCA: Ácido tricloroacético.

TGF- $\beta$ : Fator de transformação do crescimento beta.

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa.

TPU: *Tissue perfusion units*.

TR: Tioredoxina redutase.

Trx-(SH)<sub>2</sub>: Tioredoxina.

UV-VIS: Radiação ultravioleta e visível.

UPLC: Cromatografia líquida de ultra eficiência.

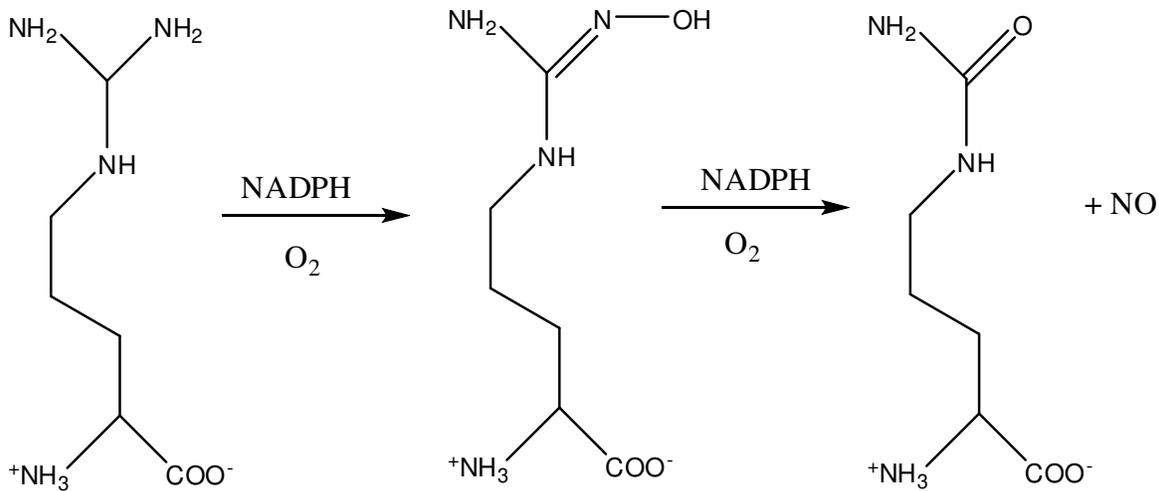


# 1. Introdução

## 1.1. Óxido Nítrico

Em 1998, o prêmio Nobel foi concedido à R. Furchgott, L. Ignarro e F. Murad pelos estudos que levaram à descoberta do óxido nítrico (NO) como mediador biológico produzido por células de mamíferos, destacando a importância desta que é a menor molécula sinalizadora encontrada endogenamente. O NO está envolvido em processos biológicos tão diferentes quanto a regulação da adesão plaquetária (Tymvios 2009), da vasodilatação (Francis 2010), do metabolismo de glicose e ácidos graxos (Jobgen 2006), a neurotransmissão (Vincent 2010) e o piscar dos vagalumes (Trimmer 2001).

A produção endógena de NO é catalisada por uma classe de enzimas conhecida como óxido nítrico sintases (NOS), sendo que três isoformas já foram até agora identificadas: nNOS (também chamada NOS1) predominante no tecido neuronal; iNOS (ou NOS2), a isoforma que é induzida em resposta à estímulos como citocinas e endotoxinas em células como macrófagos, e a eNOS (ou NOS3), encontrada primeiramente no tecido endotelial. Essas 3 isoformas são também diferenciadas por serem constitutivas e dependentes de cálcio (eNOS e nNOS) ou induzível e não dependente de cálcio (iNOS) (Alderton 2001). As NOSs catalisam a reação de um dos nitrogênios guanidino da L-arginina com oxigênio e nicotiamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que é convertida em L-citrulina, com liberação de NO e NADP<sup>+</sup>, conforme esquematizado na Figura 1, na presença dos cofatores flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH4) (Dusse 2003).

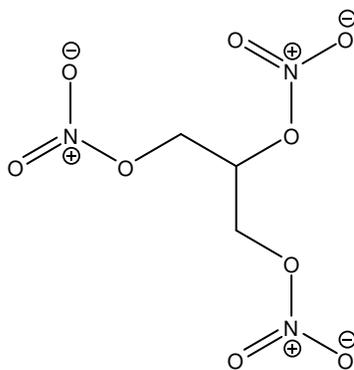


**Figura 1.** Reação de formação de NO a partir da L-arginina, catalisada pela óxido nítrico sintase. Adaptada de (Dusse 2003).

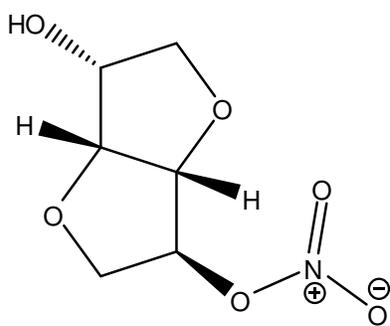
O NO é altamente lábil e reativo e pode tanto apresentar efeitos benéficos, como seu papel na resposta imune (Abu-Soud 2001) e na defesa contra micróbios (Fang 1997), quanto perturbações da regulação do NO podem levar à ativação e amplificação do processo inflamatório (Hollenberg 2009) e a efeitos deletérios em doenças complexas, como a sepse (Fortin 2010) e a falência múltipla de órgãos (Cuzzocrea 1997). Estudos têm demonstrado que essa modulação dos efeitos entre benéficos e deletérios é controlada principalmente pela concentração, localização e cinética da produção de NO (Hollenberg 2009, Hill 2010 e Thomas 2008) e, por isso, a síntese do NO parece ser um processo endógeno finamente regulado, sendo controlado inclusive pelo próprio NO, que exerce um efeito bifásico na transcrição da iNOS: baixas concentrações de NO ativam o fator nuclear kappa B (NF-κB) e aumentam a expressão de iNOS (feedback positivo), enquanto que altas concentrações têm efeito contrário, o que previne a superprodução de NO (Bogdan 2001).

Por causa de sua atividade reguladora do tônus vascular, da pressão sanguínea e ação vasodilatadora, o NO tem enorme potencial na medicina cardiovascular. Entretanto, o fato de ser uma molécula gasosa limita muito sua utilização terapêutica direta e, exceto

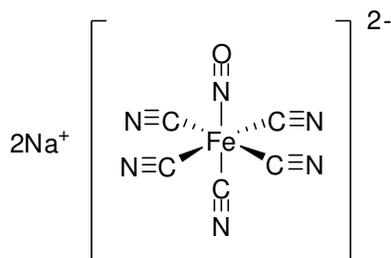
para o tratamento de hipertensão pulmonar (Rossaint 1993), o NO livre não é utilizado e sim moléculas que estabilizam o NO e permitem a sua manipulação e administração terapêutica, os chamados fármacos doadores de óxido nítrico. Existem dois tipos de doadores de NO utilizados comumente em tratamentos clínicos: os nitratos orgânicos, como a nitroglicerina (trinitrato de glicerina) **(1)**, que é usada principalmente no alívio de dores associadas à angina e como o mononitrato de isossorbida **(2)**, usado no tratamento de angina crônica; e o nitroprussiato de sódio **(3)**, utilizado em hospitais para levar à um rápido abaixamento da pressão sanguínea em crises hipertensivas (Miller 2007).



**(1)**



**(2)**



**(3)**

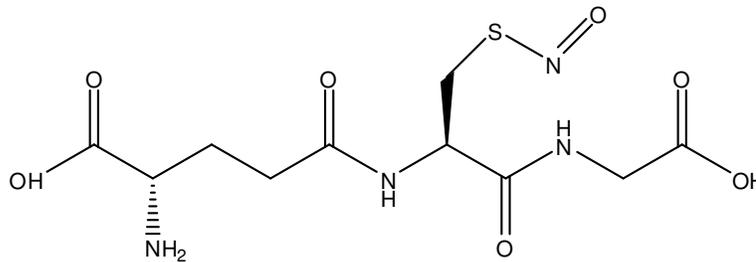
O fato do NO ter uma natureza altamente reativa faz com que a sua esfera de ação endógena seja de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de sua origem de síntese (Miller 2007) e o tempo de vida *in vivo* esteja entre 10 e 100 ms (Thomas 2008), sendo o NO, portanto, uma molécula de sinalização autócrina e parácrina. Diante desse fato, algumas questões surgem quanto aos efeitos fisiológicos do NO: uma vez que esse tem uma natureza tão reativa, como se podem explicar os efeitos endócrinos do NO, distantes de sua fonte (McMahon 2006); como essa molécula é transportada ou armazenada endogenamente e como estabilizá-la para aplicações terapêuticas alternativas ao uso dos nitratos orgânicos e do nitroprussiato? Alguns estudos têm sugerido que uma classe de moléculas possa estar envolvida nessas questões, os chamados S-nitrosotióis.

## 1.2. S-nitrosotióis

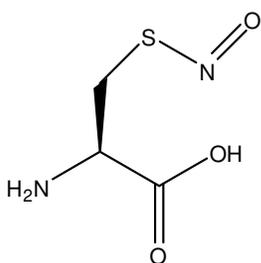
Os S-nitrosotióis (RSNOs) são uma classe de moléculas caracterizada pela ligação simples entre um resíduo tiól e o grupo NO, com estrutura geral R-S-NO, que é encontrada em sistemas biológicos como células (Zhan 2005), plasma de roedores (Liu 2004), e no fluido bronquial de humanos (Que 2009). Os RSNOs têm sido apontados como possíveis metabólitos endógenos do NO, que poderiam transportar e estocar o NO (Hogg 2000 e 2004), como sugere-se que ocorra, por exemplo, nos efeitos extrapulmonares da inalação de óxido nítrico. A inalação de NO resulta em efeitos que atingem cérebro, pâncreas, fígado, entre outros órgãos, que não condizem com o curto tempo de vida do óxido nítrico, mas que estariam sendo intermediados pelo RSNOs plasmáticos, cujos níveis se tornam elevados após a inalação (McMahon 2006). Os RSNOs poderiam então ser formados em decorrência da presença de NO, estabilizando esse radical e prolongando seus efeitos (Alencar 2003), e liberariam o NO em resposta a estímulos diversos, como a luz na região do ultravioleta e acetilcolina (Ng 2007). Entretanto, ainda não está esclarecido como ocorre a formação dos RSNOs endogenamente, uma vez que a reação entre o NO livre e um tiól não gera RSNO. As possibilidades levantadas na literatura apontam para a reação de tíois com o trióxido de

dinitrogênio ( $N_2O_3$ ), que é formado pela oxidação do NO (Keszler 2010) ou pela oxidação do NO seguida de reação com um tiól catalisada por proteínas como a citocromo c (Basu 2010) ou albumina (Rafikova 2002).

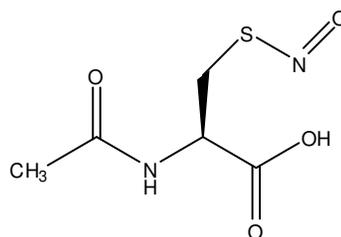
Diversos artigos da literatura recente têm avaliado os efeitos dos RSNOs em sistemas biológicos, e os mais utilizados são: S-nitrosoalbumina (AlbSNO), o correspondente nitrosado da albumina (Marley 2001); a S-nitrosoglutationa (GSNO) (4) que já foi encontrada no plasma humano (Taubert 2007); a S-nitrosocisteína (CiSNO) (5), que possui um sistema de transporte específico na membrana de eritrócitos humanos (Sandmann 2005); a S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) (6) e a S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) (7), sendo que não há relatos, até onde sabemos, da presença endógena da SNAC e da SNAP (Tsikas 1996) mas essas duas moléculas são amplamente utilizadas em experimentos *in vivo* e *in vitro* (Ceron 2001, Terwel 2000, Bocedi 2004, Sandmann 2005, Romão 2006).



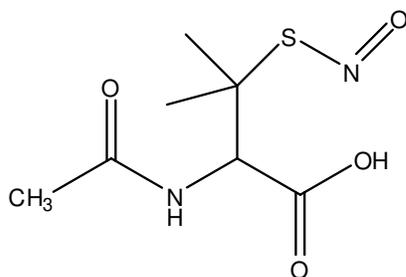
(4)



(5)



(6)



(7)

Os RSNOs exercem ações biológicas semelhantes às do NO (Hogg 2000 e 2004) como inibição da agregação plaquetária (Mellion 1983), ação microbicida (Romão 2006) e vasodilatadora (Askew 1995), entretanto, nem todos os efeitos dos RSNOs observados podem ser atribuídos unicamente à liberação de NO (Ceron 2001), revelando uma química particular desses compostos (Hogg 2000 e 2004). Uma possível explicação para esses efeitos dos RSNOs independentes da liberação de NO seria através da reação de transnitrosação, em que o resíduo  $\text{NO}^+$  do grupamento SNO é passado para um outro grupamento tiól, como o de uma proteína que tenha um resíduo cisteína (PCysSH) passível de ser nitrosado, segundo a equação (1):



Através da transnitrosação, os RSNOs são capazes de inativar proteínas que tenham um resíduo cisteína no sítio ativo ou em algum ponto crítico passível de ser transnitrosado, como ocorre com a proteína papaína (Xian 2000), e esse mecanismo pode ser responsável por diversas ações dos RSNOs, como a ação microbicida, em que os RSNOs podem inativar enzimas chaves com resíduos cisteínas dos parasitas (Bocedi 2004).

Além de seu possível papel como mediador biológico, acredita-se que a relevância dos RSNOs esteja também na possibilidade dessa classe ser uma possível alternativa aos nitratos orgânicos e ao nitroprussiato de sódio como fármaco doador de NO, a ser

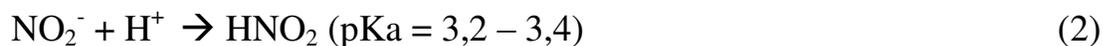
utilizado clinicamente em condições em que se faça necessário o aumento nos níveis de NO (AlSadoni 2000). Como descrito anteriormente, existem atualmente apenas dois tipos de fármacos doadores de NO usados clinicamente, entretanto, existem dificuldades associadas ao uso desses compostos, uma vez que o uso crônico de nitratos orgânicos leva ao desenvolvimento de tolerância a esse tipo de fármaco (Munzel 2005) e o uso do nitroprussiato de sódio está associado a toxicidade por cianeto (Smith 1974). Dado o potencial terapêutico do uso do NO, é de certa forma surpreendente que, desde a descoberta de seu papel como sinalizador biológico em 1980, nenhuma nova classe de moléculas doadoras de NO tenha chegado ao mercado (Miller 2007) e os RSNOs constituem assim uma alternativa de futuro fármaco. Estudos já avaliaram os efeitos fisiológicos da administração intravenosa (Ramsay 1995, Rassaf 2002, Molloy 1998, Kiris 1999) e intraperitoneal (Franceschi 2006, Flamant 2011) de RSNOs em modelos animais, entretanto, a utilização da via oral para a administração de RSNOs é pouco investigada (Richardson 2002b).

### **1.3. NO e sistema gástrico**

O uso oral de nitrosotíóis apresenta-se como uma forma de liberação de óxido nítrico no sistema gástrico, onde o NO exerce diversas funções já conhecidas como a regulação do fluxo sanguíneo gástrico (FSG), a otimização da secreção de muco, a proteção da mucosa gástrica contra agentes irritantes e a promoção da cicatrização de úlceras gástricas (Lanas 2008, Elliott 1995, Muscara 1998, Wallace 1994, Ma 2000). Por essas ações do NO, tem-se proposto o uso de doadores de óxido nítrico para prevenir os danos gástricos causados pelo uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que são medicamentos largamente utilizados no tratamento de gota, artrite reumatóide, entre outras doenças, mas que apresentam como efeito colateral a irritação da mucosa do estômago, que pode evoluir para úlcera gástrica (Wallace 2008). Para essa administração de AINEs com doadores de NO, têm-se investigado duas abordagens: a síntese de

derivados de AINEs contendo resíduos doadores de NO ou simplesmente a administração conjunta do AINE com um doador de NO (Brzozowski 2000); sendo que os RSNOs foram avaliados nessas duas propostas, demonstrando bons resultados. Bandarage et al. (Bandarage 2000) sintetizaram derivados de diclofenaco contendo resíduos de nitrosotióis terciários e esses derivados apresentaram ações analgésicas e antiinflamatórias, como esperado de um pró-fármaco de diclofenaco, sem entretanto, apresentar toxicidade ao trato gastrointestinal e Tam et al. (Tam 2000) administraram conjuntamente GSNO e piroxicam em modelo animal, o que resultou na inibição dose-dependente das lesões gástricas induzidas por piroxicam, sem alterar a farmacocinética nem o efeito farmacológico desse AINE. O mecanismo proposto para a redução do dano associado ao uso dos AINEs pelo NO seria através do aumento no fluxo sanguíneo da mucosa, que permite a remoção de compostos tóxicos, e da produção de muco, que protege a mucosa gástrica contra agentes irritantes (Holm 2002, Wallace 1994). Sendo assim, o uso de RSNOs oralmente poderia ser uma alternativa na prevenção dos danos gástricos associados ao uso dos AINEs.

O estudo dos efeitos gástricos dos RSNOs se faz importante não só pela via oral ser uma possível rota para administração terapêutica, mas também pelo possível papel fisiológico que os RSNOs podem ter na via gastrointestinal. Estudos têm demonstrado que a ingestão de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) na dieta é uma forma de produção de NO independente das NOSs, que leva a efeitos como diminuição da pressão sanguínea, inibição da agregação plaquetária (Webb 2008) e aumento do fluxo sanguíneo gástrico e de secreção de muco (Petersson 2007), sendo que um possível intermediário entre o  $\text{NO}_3^-$  ingerido e os efeitos fisiológicos observados seriam os RSNOs. A via de formação de RSNOs gástricos pela presença de  $\text{NO}_3^-$  na dieta ocorreria da seguinte forma: o  $\text{NO}_3^-$  ingerido é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) pela ação de enzimas bacterianas presentes na cavidade oral, que é, por sua vez, protonado em meio ácido estomacal, formando ácido nitroso (HONO) e trióxido de dinitrogênio ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) que reagem com tióis endógenos, formando RSNOs (Richardson 2002a, Pannala 2003, Lundberg 2008), segundo as equações:



De fato, já foi observada a formação de RSNOs em saliva humana rica em nitrito, derivado da ingestão de nitrato, e a aplicação dessa saliva na mucosa estomacal de ratos levou ao aumento do fluxo sanguíneo gástrico e da formação de muco (Bjorne 2004).

Entretanto, para o avanço do entendimento do papel dos RSNOs na via gastrointestinal e o desenvolvimento de sua aplicação farmacológica pela via oral, é necessário que se estude o destino dos RSNOs quando aplicados em mamíferos, que se conheça a sua meia vida *in vivo*, identifique-se seus metabólitos plasmáticos, e essas são questões pouco investigadas. Além disso, a estabilidade dos RSNOs é motivo de bastante debate na literatura (Bartberger 2001), o que impossibilita a previsão, pelos dados existentes atualmente, da estabilidade dos RSNOs no pH gástrico. No presente estudo, avaliaram-se os efeitos da administração orogástrica de soluções de GSNO e SNAC no fluxo gástrico, a farmacocinética desses RSNOs e caracterizou-se a decomposição de GSNO e SNAC em função do pH.

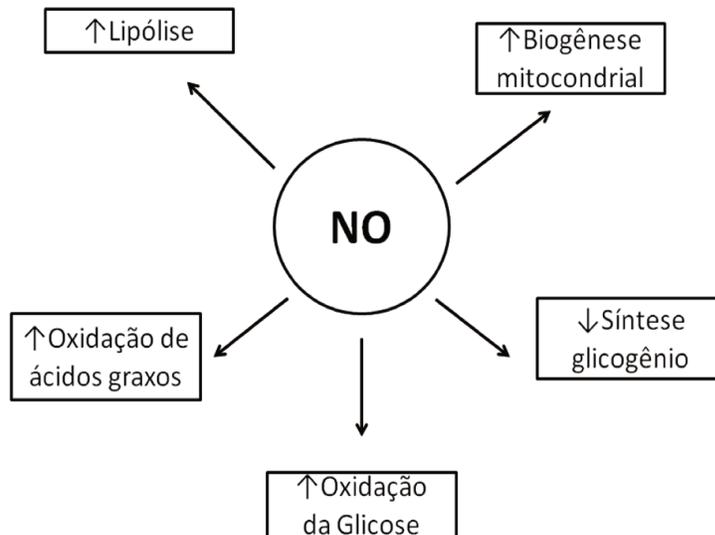
#### **1.4. S-nitrosotióis e Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica**

A via oral como rota de administração de RSNOs foi utilizada não só para avaliação dos efeitos dos RSNOs no sistema gastrointestinal, mas também em estudos para avaliação do efeito dessas moléculas em modelos animais de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA ou NAFLD, do inglês *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) (Oliveira 2006a, 2006b, 2007 e 2008), onde foi possível observar que a administração orogástrica de solução de SNAC pode prevenir e reverter o quadro da DHGNA em modelos animais. A doença hepática gordurosa não alcoólica é uma condição em que os

hepatócitos, que normalmente contém apenas pequenas quantidades de lipídios armazenados, passam a conter quantidades supra-fisiológicas de gordura, e é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (Larter 2010). Apesar da alta prevalência, os fatores patogênicos que determinam a progressão da DHGNA são pobremente entendidos. Evidências fisiológicas levaram ao desenvolvimento de uma teoria em que a patogênese ocorre em dois estágios, conhecida como “two-hit theory”, ou “teoria de duas fases”: a primeira fase é causada pelo excesso de ácidos graxos livres no fígado, que são esterificados a triglicerídeos. Essa lesão inicial torna o fígado vulnerável aos fatores agressores da segunda fase, que é causada pelo stress oxidativo e citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8), o que leva à ocorrência de lesões nos hepatócitos, inflamação e fibrose e, conseqüentemente, à evolução da esteatose hepática (que é o acúmulo de gordura nos hepatócitos) para a esteatohepatite (caracterizada pela presença de inflamação) (Hijona 2010, Tiniakos 2010).

Não há fármacos aprovados atualmente para o tratamento da DHGNA e as atuais formas de terapias, baseadas em antioxidantes ou em dietas alimentares específicas, não têm demonstrado efeitos terapêuticos significativos no tratamento de humanos, na maior parte dos casos os efeitos benéficos são apenas discretos e não inibem a progressão dessas doenças (Marra 2008). Oliveira *et al.* verificaram que a administração por via orogástrica de SNAC em dois modelos animais diferentes de DHGNA não apenas bloqueia o desenvolvimento desta doença, mas a faz regredir após a sua instalação (Oliveira 2006a, 2006b, 2007 e 2008), sendo que os efeitos deste doador de NO se refletiram tanto na obtenção de histologias normais do tecido hepático como na normalização dos marcadores de peroxidação lipídica, e também foi possível observar uma diminuição no ganho de massa dos animais submetidos à dieta hiperlipídica quando tratados com a SNAC (de Oliveira 2008). Os efeitos observados poderiam ser explicados pelas ações do NO no metabolismo: estudos demonstraram que o NO regula o metabolismo de glicose, ácidos graxos e aminoácidos em mamíferos, estimula o transporte de glicose e a oxidação de glicose e ácidos graxos no músculo esquelético,

coração, fígado e tecido adiposo, está envolvido na biogênese mitocondrial (Jobgen 2006, Nisoli 2003), entre outras ações, como esquematizado na Figura 2.



**Figura 2.** Efeitos do óxido nítrico no metabolismo energético. Adaptado de Jobgen 2006. Licença nº 2692641236774.

Diante desses dados, o uso de S-nitrosotióis no tratamento da DHGNA e de alterações metabólicas se apresenta como uma alternativa promissora. Essa aplicação foi investigada no presente estudo, utilizando-se como modelo animal camundongos ob/ob submetidos à dieta hiperlipídica e camundongos Swiss submetidos à dieta hiperlipídica ou à dieta deficiente em metionina e colina. Durante os experimentos, observou-se que os camundongos Swiss, de uma linhagem não isogênica, apresentam um perfil não homogêneo de ganho de massa quando submetidos à dieta hiperlipídica, e essa heterogeneidade foi investigada.

## 1.5. Propensão e Resistência à obesidade

A heterogeneidade no perfil de ganho de massa em animais expostos à dieta hiperlipídica já é conhecida e citada na literatura. Lauterio *et al.* (Lauterio 1994), que desenvolveram uma dieta para modelo de obesidade em ratos Sprague Dawley, relataram que após 15 semanas de dieta, os animais apresentaram um comportamento bimodal de ganho de massa, sendo que metade deles ganham massa com facilidade, e são chamados pelos autores como “ganhadores” ou “propensos” e a outra metade tem menor susceptibilidade ao ganho de massa, os chamados “resistentes” à obesidade induzida por dieta. Esse padrão desigual resulta em um modelo animal de obesidade com vantagens, uma vez que permite estudar separadamente os efeitos da dieta hiperlipídica *per se* (comparando os animais que receberam dieta hiperlipídica e os que receberam dieta padrão) e os efeitos do estado obeso (comparando os animais propensos com os animais resistentes) (Dobrian 2000). Alguns estudos já têm demonstrado que existem diferenças entre os animais propensos e resistentes à obesidade induzida por dieta que podem ser responsáveis por essa diferença no ganho de massa, como diferenças no gasto energético, no quociente respiratório e nos níveis plasmáticos de leptina, insulina e colesterol, além de diferenças nas expressões de neuropeptídeos hipotalâmicos orexigêncios (Gao 2002, Huang 2003a e 2003b). Entretanto, a maioria desses estudos avalia as diferenças entre os grupos propensos e resistentes após um longo período de exposição à dieta, dificultando o esclarecimento de quais fatores são causa e quais são consequência do estado obeso. No presente estudo, foi feita uma avaliação cinética por 4, 8 e 16 semanas dos parâmetros metabólicos de camundongos Swiss propensos e resistentes à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

## 2. Objetivos

Os objetivos gerais desse trabalho foram a caracterização dos efeitos biológicos causados pela administração orogástrica de GSNO e SNAC e a avaliação cinética da propensão e resistência à obesidade induzida por dieta hiperlipídica em modelos animais. Mais especificamente, os objetivos foram:

- (1) a avaliação de mudanças no fluxo sanguíneo gástrico da mucosa estomacal quando exposta a soluções de GSNO e SNAC;
- (2) a caracterização da metabolização da GSNO e SNAC após a administração orogástrica;
- (3) o acompanhamento da decomposição desses RSNOs em função do pH;
- (4) a investigação de um possível efeito da administração orogástrica de SNAC na DHGNA e da administração de GSNO e SNAC no ganho de massa e na expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos induzidos pela ingestão de dieta hiperlipídica e
- (5) a avaliação cinética das alterações metabólicas em modelo animal de propensão e resistência à obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Animais

Todos os experimentos utilizando-se animais foram realizados de acordo com as normas internacionais estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* e aprovados pelo Comitê de Ética da UNICAMP sob o Protocolo N° 1755-1, para o uso de animais de experimentação em pesquisa.

#### 3.2. Síntese da GSNO e SNAC

Para a síntese de GSNO, a glutathiona (GSH) (3,000 g) foram inicialmente dissolvidas em 16 mL de HCl 0,5 M e sobre solução foi adicionado nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) em quantidade equimolar (0,670 g). A solução foi mantida sob agitação magnética, em banho de gelo e protegida da luz por 40 min, de forma a permitir a reação de S-nitrosação da GSH. Foram então adicionados 10 mL de acetona e a solução foi mantida nas mesmas condições por 10 min, a fim de que a GSNO formada fosse precipitada de forma quantitativa. A GSNO sólida foi filtrada, lavada 3 vezes com água deionizada e acetona, liofilizada por 24 h e mantida em freezer.

A SNAC foi sintetizada reagindo-se quantidades equimolares de N-acetilcisteína (NAC) com  $\text{NaNO}_2$  em solução aquosa ácida, por 15 min, protegida da luz com papel alumínio, para permitir a nitrosação completa do tiól. Uma vez que não é possível precipitar a SNAC, diferentemente do que ocorre com a GSNO, as soluções de SNAC obtidas pela reação de S-nitrosação da NAC foram subsequentemente diluídas, até que se atingissem as concentrações desejadas. As soluções de GSNO foram preparadas pela dissolução da GSNO sólida em diferentes tampões. As concentrações das soluções de SNAC e GSNO foram averiguadas com base no espectro de absorbância no UV-VIS, utilizando-se  $\epsilon_{336} = 900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Aleryani 1998). Todas as soluções foram usadas imediatamente após a preparação.

### 3.3. Efeitos das aplicações tópicas de soluções de GSNO, SNAC, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no fluxo sanguíneo gástrico

O efeito da solução de GSNO e SNAC (600 µmol L<sup>-1</sup> e 12 mmol L<sup>-1</sup>) e de NaNO<sub>2</sub> e NaNO<sub>3</sub> (12 mmol L<sup>-1</sup>) no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica foi avaliado pela técnica da câmara gástrica *ex vivo*, sendo que a medição do fluxo sanguíneo gástrico (FSG) foi realizada através do uso de fluxometria por laser-Doppler (Transonic) (Camara 2008 e Ancha 2003). Essa técnica permite a medida de fluxo sanguíneo até uma profundidade de 1 mm de tecido, de forma contínua em unidades de perfusão tecidual (TPUs, do inglês *Tissue Perfusion Unit*). Nessa técnica, a mucosa gástrica é exposta à aplicação tópica de soluções de compostos a serem estudados e a alteração no FSG é avaliada pela fluxometria por laser Doppler, em que a luz laser incide sobre a camada superficial da mucosa e é espalhada pelos eritrócitos circulantes. Dependendo da velocidade dos eritrócitos, a luz laser é deslocada para diferentes comprimentos de onda, gerando um espectro de luz espalhada em oposição à linha única de emissão característica do laser incidente. O instrumento capta a luz espalhada e, de acordo com o espectro obtido, é possível obter uma medida relativa da velocidade dos eritrócitos e, portanto, do fluxo sanguíneo (Holloway 1977, Rajan 2009).

Para tal, foram utilizados ratos Sprague-Dawley (300-400 g), obtidos do biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Os animais foram mantidos em caixas plásticas e tiveram acesso à ração padrão e água *ad libidum*. Os ratos, já em jejum por 12 h (n ≥ 3 para cada grupo experimental), foram anestesiados com halotano, colocados e mantidos em uma cama de acrílico aquecida por cobertor elétrico (Harvard Apparatus) em temperatura de 37 °C controlada por meio de termôstato, durante todo o procedimento. O estômago do animal foi exposto através de laparotomia mediana e o piloro foi ligado com fio de algodão 4-0. Em seguida, o estômago foi tracionado a partir da porção não glandular da grande curvatura com pinça 0.8 mm e aberto através da grande curvatura com o cuidado de evitar secção do suprimento arterial gástrico. O estômago foi então colocado sobre uma plataforma de

acrílico, e fixo com alfinetes sobre essa mesma plataforma. Um cilindro de acrílico foi colocado sobre a mucosa gástrica, o que permite o banho da mucosa gástrica com soluções de RSNOs ou tampão. Essa preparação permite a manutenção do suprimento sanguíneo e controle neural e motor gástrico.

Após a preparação do animal na câmara gástrica *ex vivo*, a mucosa gástrica foi lavada três vezes com solução tampão pH 7,4, a 37 °C, e então colocou-se 5 mL de solução tampão no banho da mucosa. A sonda do laser foi fixada sobre o corpo gástrico, na camada glandular, mediante o uso de micromanipulador mecânico (Harvard Apparatus). Após 10 min de equilíbrio da preparação, foi dado início à gravação dos dados, em intervalos de 30 s. O fluxo sanguíneo da mucosa com o banho de solução tampão foi gravado por 5 min, e então o tampão foi retirado e substituído por solução de RSNO, NaNO<sub>2</sub> ou NaNO<sub>3</sub> tamponada (600 µmol L<sup>-1</sup> ou 12 mmol L<sup>-1</sup>), pH 7,4, a 37 °C. O FSG sob efeito da solução foi registrado por mais 10 min. Após esse intervalo, a solução foi retirada e substituída novamente por solução tampão e o FSG foi gravado por 20 min ou até que o FSG voltasse ao seu valor basal.

A partir dos dados obtidos, as respostas de FSG foram analisadas como variação sobre o fluxo sanguíneo basal obtido nos 5 min iniciais, uma vez que a técnica de medição do fluxo sanguíneo por laser Doppler é útil para o monitoramento de mudanças no fluxo por tempo, não sendo adequada para medição de fluxo sanguíneo absoluto. A normalização do fluxo pelo valor basal permite desprezar as variações entre indivíduos e, assim, a comparação entre os grupos.

### **3.4. Dosagem de Metabólitos de NO após administração orogástrica**

Camundongos Swiss obtidos do CEMIB da UNICAMP (n = 5) com 12 semanas foram deixados em jejum por 6-9 h, com acesso *ad libidum* à água desionizada, e então amostras de sangue (100 µL) foram retiradas por um pequeno corte na ponta da cauda e colocadas em tubos heparinizados.

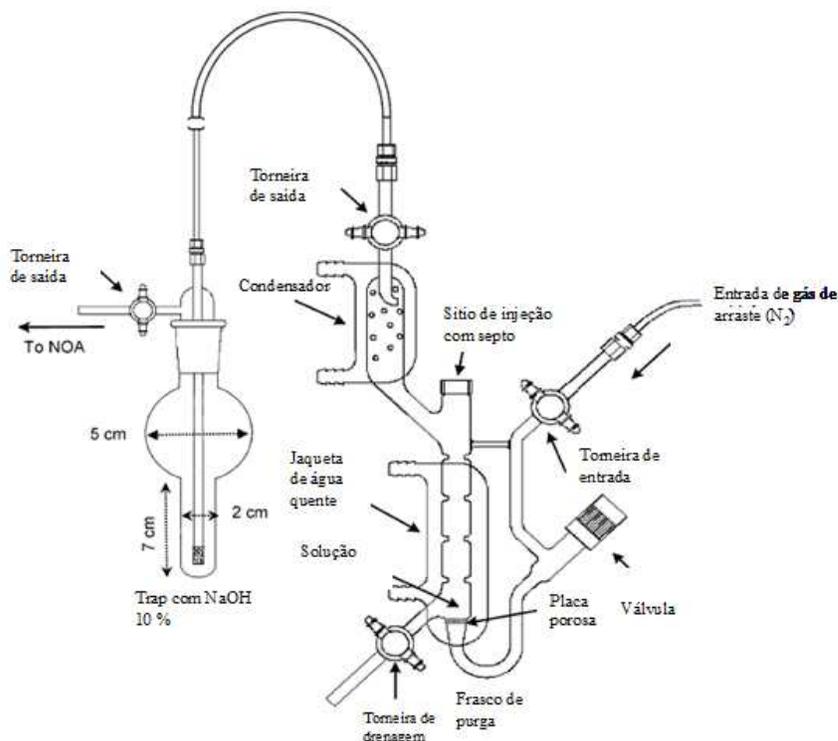
Para o experimento de cinética de aumento nos níveis plasmáticos de metabólitos de NO em função do tempo, os animais receberam por gavagem uma alíquota de solução de SNAC 60 mmol L<sup>-1</sup>, de forma a atingir a dose de 365 µmol/kg e foram mantidos em suas gaiolas, ainda em jejum. Novas amostras de sangue foram colhidas, de forma semelhante ao descrito anteriormente, por 3 h, em intervalos de 30 min ou 1 h.

Para o experimento de dose resposta, camundongos Swiss (n = 28) foram separados em 7 grupos: controle (animais receberam gavagem de tampão fosfato); SNAC 365 µmol (animais que receberam gavagem de solução de SNAC 60,0 mmol L<sup>-1</sup>, de forma a atingir a dose de 365,0 µmol/kg); SNAC 73 µmol (animais que receberam gavagem de solução de SNAC 12,0 mmol L<sup>-1</sup>, de forma a atingir a dose de 73,0 µmol/kg); SNAC 7,3 µmol (animais que receberam gavagem de solução de SNAC 1,2 mmol L<sup>-1</sup>, de forma a atingir a dose de 7,3 µmol/kg); e 3 grupos nas mesmas concentrações de SNAC 365, 73 e 7,3 µmol/kg, porém utilizando-se GSNO no lugar de SNAC. Os procedimentos de gavagem e coleta de amostras de sangue foram realizados da mesma forma que descrita acima, com a diferença de que foram coletadas amostras de sangue apenas uma vez, após 1 h da gavagem.

As amostras de sangue foram submetidas à centrifugação por 15 min, a 4 °C e 3500 rpm, em centrífuga refrigerada (Eppendorf) imediatamente após a coleta. O plasma foi retirado com pipeta, transferido para tubos tipo eppendorf e mantido em freezer para posterior quantificação.

As concentrações de SNO, nitritos e nitratos totais (NO<sub>x</sub><sup>-</sup>) presentes no plasma foram medidas por quimiluminescência, utilizando-se o método do cloreto de vanádio, que reduz NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e RSNOs a NO (Bateman 2002), em um analisador de NO (NO Analyzer, Sievers). O funcionamento do instrumento consiste em, primeiramente, converter as espécies a serem analisadas a NO por meio de uma solução redutora. Após a reação, o NO gasoso liberado é arrastado do frasco de reação do instrumento por fluxo de nitrogênio até a câmara de reação. Antes de chegar à câmara de reação, há um

condensador e um trap com solução de NaOH, para condensar o vapor de água e neutralizar vapores ácidos. A Figura 3 ilustra os elementos externos do analisador.



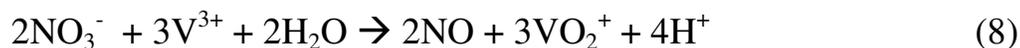
**Figura 3** - Ilustração dos componentes externos do analisador de NO. Adaptado do manual do instrumento – NO Analyzer (modelo NOATM 280i, Sievers).

Na câmara de reação, há geração de ozônio ( $O_3$ ), que reage com o NO arrastado, formando dióxido de nitrogênio no estado excitado ( $NO_2^*$ ), que retorna ao estado fundamental, emitindo radiação num comprimento de onda de 600 nm, que é detectada através de um tubo fotomultiplicador (Yang 1997). A reação de quimiluminescência responsável pela detecção é descrita pelas equações 6 e 7:



No método do cloreto de vanádio, a solução redutora é preparada pela dissolução de cloreto de vanádio (III) em solução de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>, resultando em uma solução

saturada, que é filtrada à vácuo em funil de Buchner com papel de filtro. A solução foi mantida em geladeira e utilizada no máximo 4 d após o preparo. A redução do  $\text{NO}_3^-$  a NO é descrita na equação 8 (Vassilakopoulos 2007):



Essa solução também é capaz de reduzir  $\text{NO}_2^-$  e RSNOs a NO, e, portanto, a solução de cloreto de vanádio (III) é utilizada para quantificação do *pool* total de espécies de NO.

No dia das análises, a solução de cloreto de vanádio foi colocada no frasco de reação do instrumento, esse foi aquecido a 95 °C por jaqueta termostatzada, e esperou-se a estabilização da linha base por *c.a.* 30 min. A curva de calibração foi obtida com injeções de solução padrão de  $\text{NaNO}_3$  na concentração de 9,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Para a análise de plasmas, foram injetadas alíquotas no volume de 1  $\mu\text{L}$ , em triplicata. As áreas dos picos obtidos foram interpoladas nos dados da curva de calibração construída utilizando-se o software do instrumento.

### **3.5. Cinética da decomposição de RSNOs em função do pH e caracterização dos produtos de decomposição**

As cinéticas de decomposição de soluções de GSNO e SNAC (1  $\text{mmol L}^{-1}$ ), em soluções tampão contendo etilenodiaminotetraacetato de sódio (EDTA) (3,4  $\text{mmol L}^{-1}$ ) em pHs 3, 5, 7, 9 11 e 13, a 25 °C, em triplicata, mantidas ao abrigo da luz, foram avaliadas pelo monitoramento do espectro de absorbância das soluções na faixa de 220-1100 nm referenciado contra o ar, usando um espectrofotômetro de arranjo de diodos (Hewlett–Packard, Modelo 8453). Como controle de decomposição térmica, uma parte da solução de GSNO de pH 7 foi mantida a 40 °C. A concentração de GSNO e SNAC nas soluções foi calculada a partir da banda de absorção característica, na região de 336 nm, com o uso de uma cubeta de quartzo de caminho ótico de 10 mm.

As soluções tampão foram preparadas da seguinte forma: para 20 mL de solução de pH 3,0 utilizou-se 4,0 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e 16,0 mL de solução de ácido cítrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . A obtenção de solução de pH 5,0 foi feita a partir das soluções anteriores, nas quantidades de 10,3 mL e 9,7 mL, respectivamente, ao passo que para o pH 7,0 utilizou-se 16,5 mL e 3,5 mL, respectivamente. Já os tampões de pH 9,0, 11,0 e 13 foram preparados a partir de soluções de glicocol  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Para cada 10 mL de tampão de pH 9,0, utilizou-se 9,0 mL de solução de glicocol e 1 mL de solução de  $\text{NaOH}$ . Para o pH 11,0, utilizou-se 5,0 mL e 5,0 mL, respectivamente e para o pH 13, 1,0 mL e 9,0 mL respectivamente. Os pHs das soluções foram aferidos através de eletrodo de pH (Orion). As absorvâncias iniciais foram normalizadas e as velocidades iniciais de decomposição da GSNO e SNAC nas diferentes condições de análise foram calculadas com base na inclinação das retas obtidas através da regressão linear dos pontos experimentais da seção inicial (menos de 10% da reação) das curvas cinéticas de decomposição.

Para a solução de GSNO em pH 13, analisou-se a formação do ânion  $\text{NO}_2^-$  através da técnica de quimiluminescência, no mesmo instrumento (NO Analyzer -Sievers), pelo método do ácido ascórbico em ácido acético glacial, que garante a quantificação seletiva de  $\text{NO}_2^-$  sem interferência de RSNOs ou nitratos (Nagababu 2007). Para tal, colocou-se no frasco de purga 1 mL de ácido ascórbico  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e 7 mL de ácido acético glacial, em temperatura ambiente. A curva de calibração foi obtida com injeções de soluções com concentrações conhecidas de  $\text{NaNO}_2$ . Para se determinar a quantidade inicial de  $\text{NO}_2^-$  presente na GSNO, resultante de resíduos de sua síntese, injetou-se  $4 \mu\text{L}$  de uma solução aquosa de GSNO  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . A seguir, após o preparo da solução de GSNO em tampão de pH 13, injetou-se, a cada 15 min,  $4 \mu\text{L}$  desta no frasco de purga, a fim de se quantificar o nitrito formado como produto da reação de decomposição. Esse procedimento foi realizado até se completar 2 h de reação, tempo necessário para o decaimento total da banda de absorção da ligação S-NO em 336 nm, em triplicata. As

áreas dos picos obtidos foram interpoladas nos dados da curva de calibração construída utilizando-se o software do instrumento.

As quantificações de glutathiona na forma reduzida (GSH), da GSH oxidada (GSSG) e da GSNO foram feitas utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência- HPLC (Shimadzu). Os parâmetros utilizados foram: coluna Polaris C18 (4,5 x 150 mm - 3 µm); fluxo: 1,0 mL/min; temperatura da coluna: 25°C; volume de injeção: 20 µL; detector: UV em 220 nm; fase móvel: mistura de 900 mL de solução de ácido trifluoroacético 0,1 % (v/v), de pH = 2,2 com 100 mL de solução aquosa de acetonitrila 40 % (v/v).

Para a quantificação de GSH e GSSG como produtos de decomposição, as soluções de GSNO em pH 3 e 13 foram mantidas a 25 °C, ao abrigo da luz, por 3 d e 1 h, respectivamente; e a solução de GSNO em pH 7 foi mantida a 40 °C, ao abrigo da luz, por 3 dias. Alíquotas foram retiradas e analisadas por HPLC. Como padrões, foram utilizadas GSH e GSSG obtidas da Sigma Aldrich, utilizadas sem prévia purificação, e GSNO sintetizada em nosso laboratório, conforme descrito acima.

### **3.6. Metabolismo de RSNOs em sangue**

A quantificação de GSNO em plasma e em sangue foi feita utilizando-se cromatografia líquida de ultra eficiência- UPLC (Waters). Os parâmetros utilizados foram: coluna Acute UPLC BEHC18 (2,1 x 50 mm – 1,7 µm); fluxo: 0,08 mL/min; temperatura da coluna: 25 °C; volume de injeção: 10 µL; detector: 334 nm; fase móvel: mistura de 900 mL de solução de ácido trifluoroacético 0,1 % (v/v), de pH = 2,2 com 100 mL de solução aquosa de acetonitrila 40 % (v/v) (fase A) e metanol (fase B).

Foram retiradas amostras de sangue de voluntários saudáveis em tubos contendo EDTA e essas foram utilizadas no período máximo de 30 min, sendo mantidas em banho de gelo até o início dos experimentos e ao abrigo da luz durante todo o experimento. Para o uso de plasma, o sangue foi centrifugado por 15 min, a 4 °C, 3500 rpm, e o plasma foi retirado e imediatamente utilizado. Antes de todas as análises, a curva de calibração foi obtida pela injeção de plasma e solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 contendo GSNO

adicionada em concentrações conhecidas (de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $10 \text{mmol L}^{-1}$ ). O controle foi feito pela injeção de plasma desproteínizado sem adição de GSNO e de ácido tricloroacético (TCA) usado no processo de desproteínização. O limite de detecção foi avaliado injetando-se soluções de GSNO em diferentes concentrações e foi atribuído à menor concentração cuja variação entre a área das triplicatas fosse menor do que 5%.

Para os ensaios de estabilidade, as amostras de sangue ou plasma ( $n = 3$ ) receberam a adição de solução tamponada de GSNO (pH 7,4) de forma a atingir as concentrações finais de  $10 \text{mmol L}^{-1}$ ,  $40$  ou  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  e foram mantidas em banho a  $37^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz. Alíquotas de plasma ou sangue foram retiradas imediatamente após a adição de GSNO e 1 ou 2 h depois. As amostras de sangue foram centrifugadas como descrito acima para a separação do plasma. O plasma foi desproteínizado pela adição de  $100 \mu\text{L}$  de TCA  $200 \text{mmol L}^{-1}$  à  $400 \mu\text{L}$  de plasma, seguido de centrifugação por 10 min, a  $4^\circ\text{C}$ ,  $11000 \text{rpm}$  (Schott 2007). O sobrenadante foi retirado, filtrado com filtros para seringa  $0,2 \mu\text{m}$  (Millipore) e injetado no UPLC, segundo as condições descritas acima.

A quantificação de GSNO no plasma de camundongos após a administração orogástrica foi feita através da gavagem de camundongos Swiss obtidos do CEMIB da UNICAMP ( $n = 5$ ) com 12 semanas, que foram deixados em jejum por 6 h, com acesso *ad libitum* à água desionizada. Os animais receberam uma alíquota de solução de PBS pH 7,4 (grupo controle) ou GSNO  $60,0 \text{mmol L}^{-1}$  (grupo GSNO) por via orogástrica, de forma a atingir a dose de  $365 \mu\text{mol/kg}$  e foram mantidos em suas gaiolas, ainda em jejum, por 1 h. Após esse intervalo, os animais foram anestesiados com halotano, mortos por deslocamento cervical e o sangue foi retirado imediatamente por punção cardíaca e colocado em tubo heparinizado. O plasma foi separado, desproteínizado, filtrado e analisado por UPLC conforme descrito acima.

### 3.7. Metabolismo de RSNOs em tecidos

Para a avaliação da decomposição da GSNO em lisados de estômagos e fígados, ratos Sprague-Dawley (300-400 g), obtidos do biotério do CEMIB da UNICAMP foram postos em jejum por 12 h ( $n = 4$ ), anestesiados com halotano, mortos por deslocamento cervical, o estômago e o fígado foram expostos através de laparotomia mediana e retirados. O estômago foi aberto pela grande curvatura e as paredes interna e externa foram lavadas suavemente com PBS, para retirar resquícios do bolo alimentar. Amostras do estômago ou fígado (0,2 g) foram extraídas em 10 ml de PBS pH 7,4 contendo EDTA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  utilizando-se homogeneizador de alta frequência (IKA) e receberam alíquotas de solução de GSNO em PBS pH 7,4, de forma a atingir a concentração final de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Alíquotas dos lisados contendo GSNO foram retiradas imediatamente após a adição de GSNO e 1 e 2 h depois. As alíquotas foram centrifugadas por 15 min, a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 11000 rpm e o sobrenadante foi retirado e congelado para posterior análise. As amostras foram descongeladas no dia da análise, receberam alíquota de N-etilmaleimida (NEM), em concentração final  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , para alquilar grupos tióis livres e prevenir a transnitroação (Bramanti 2011) e foram desproteinizadas pela adição de TCA conforme realizado com as amostras de plasma.

A concentração de GSNO remanescente nos sobrenadantes foi avaliada por quimiluminescência, pela técnica de redução do grupo SNO por ácido ascórbico em pH 11, baseado no método de Nagababu (Nagababu 2006). Nestas condições o ânion  $\text{NO}_2^-$  não é reduzido a NO livre, portanto, a condição de redução é específica para S-nitrosotióis. Para a realização das análises, colocou-se no frasco de purga solução aquosa de ácido ascórbico  $160 \text{ mmol L}^{-1}$  em pH 11 (o pH foi corrigido utilizando-se solução de NaOH  $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e a curva de calibração foi obtida pela injeção de alíquotas de concentrações conhecidas de GSNO. Os sobrenadantes foram injetados no instrumento, e as áreas dos picos obtidos foram interpoladas na curva de calibração construída, utilizando-se o software do instrumento.

### **3.8. Administração orogástrica de SNAC e GSNO em modelos animais de doença do fígado gorduroso e obesidade induzida por dieta hiperlipídica**

O efeito do tratamento com SNAC no desenvolvimento da DGHNA foi investigado em camundongos ob/ob e camundongos Swiss alimentados com dieta hiperlipídica (HFD), cuja fonte principal de lipídios é banha de porco. Camundongos ob/ob de 15 semanas fornecidos pela Profa. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira, do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, foram mantidos em grupos de 2 ou 3 por gaiola com acesso à dieta e água *ad libidum*, em temperatura controlada (20 °C) e submetidos a ciclo de claro:escuro de 12h. Os animais foram mantidos por 1 semana para aclimatização no biotério do Laboratório de Sinalização Celular da UNICAMP e foram então randomicamente divididos em 2 grupos: controle HFD (n = 5), (animais alimentados *ad libidum* com dieta hiperlipídica (20% proteína, 35% carboidrato, 45% lipídio) e que receberam diariamente 200 µl de PBS pH 7,4 por gavagem); e grupo tratado com SNAC (n = 6), (animais alimentados *ad libidum* com HFD e que receberam administração oral de solução tamponada de SNAC (1 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,4) por gavagem, diariamente). A alíquota administrada da solução de SNAC foi calculada de forma que a dose diária fosse 7,3 µmol/kg/dia. Após 4 semanas de tratamento, os animais foram anestesiados com mistura de ketamina e xilazina, e fragmentos de fígado foram retirados, fixados em paraformaldeído, seccionados e as lâminas foram coradas com hematoxilina - eosina. O grau de esteatose hepática nas lâminas foi avaliado por um patologista cegado em relação à identidade dos animais.

Camundongos machos Swiss (Unib:SW) de 4 semanas foram obtidos do CEMIB e mantidos em grupos até completarem 7 semanas, quando foram então separados em gaiolas individuais e mantidos por 1 semana para aclimatização. Os animais foram então randomicamente divididos em 4 grupos (n = 8): controle dieta padrão, (animais alimentados *ad libidum* com ração padrão (20% proteína, 70% carboidrato, 10% lipídio)); controle HFD, (animais alimentados *ad libidum* com HFD); tratados com SNAC, (animais alimentados *ad libidum* com HFD que receberam administração oral de

solução de SNAC por gavagem, diariamente, na dose de 7,3  $\mu\text{mol/kg/dia}$ ); e tratados com GSNO, (animais alimentados *ad libidum* com HFD que receberam administração oral de solução de GSNO por gavagem, diariamente, na dose de 7,3  $\mu\text{mol/kg/dia}$ ). A massa dos animais foi medida semanalmente após o início da dieta e do tratamento. Após 8 semanas de tratamento, os animais tratados com GSNO foram anestesiados com halotano e mortos por deslocamento cervical. Após 12 semanas de tratamento, os animais restantes foram anestesiados com mistura de ketamina e xilazina, e fragmentos de fígado foram retirados, fixados em paraformaldeído, seccionados e as lâminas foram coradas com hematoxilina - eosina. O grau de esteatose hepática nas lâminas foi avaliado por um patologista cegado em relação à identidade dos animais.

### **3.9. Administração oral de solução de SNAC em modelo animal de esteatose hepática induzida por dieta deficiente em metionina e colina**

Camundongos Swiss obtidos do CEMIB da UNICAMP foram mantidos em gaiolas individuais, com acesso a dieta e água *ad libidum* e submetidos a ciclo de claro:escuro de 12h. Os animais, então com 8 semanas, foram randomicamente divididos em 3 grupos (n = 8): controle dieta padrão, animais alimentados *ad libidum* com ração padrão; controle dieta deficiente em metionina e colina (MCD), alimentados *ad libidum* com MCD (Tabela 1) e que receberam gavagem com veículo diariamente; e tratados com SNAC, (animais alimentados *ad libidum* com dieta MCD, que receberam administração oral de solução tamponada de SNAC por gavagem, diariamente, na dose de 7,3  $\mu\text{mol/kg/dia}$ ). Após 12 semanas de tratamento, os animais foram anestesiados com mistura de ketamina e xilazina, e fragmentos de fígado foram retirados, fixados em paraformaldeído, seccionados e as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. O grau de esteatose hepática nas lâminas foi avaliado por um patologista cegado em relação à identidade dos animais.

**Tabela 1.** Composição da dieta deficiente em metionina e colina. Informação do fabricante.

<b>Ingredientes</b>	<b>g/kg</b>
Sacarose	500
Caseína	200
Amido	155
Celulose	50
Óleo de milho	50
Mistura mineral	35
Mistura vitamínica	10
DL-metionina	0
Bitartarato de colina	0
Tertbutilhidroquinona (TBH)	~ 0,01

### **3.10. Propensão e Resistência à obesidade em camundongos Swiss expostos à dieta hiperlipídica**

Camundongos machos Swiss (n = 60) de 8 semanas, com diferenças de massa menores que 10% entre eles, foram alimentados com HFD *ad libidum* por até 16 semanas e foram separados quanto a massa após as 4 primeiras semanas: os 15 animais com maior massa foram chamados de “propensos” e os quinze com menor massa foram chamados de “resistentes”. Após 4, 8 e 16 semanas de dieta, cinco animais de cada grupo foram mortos e fragmentos do hipotálamo foram retirados e extraídos para posterior quantificação de mRNA de neuropeptídeos reguladores da fome - proopiomelanocortina (POMC), transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), peptídeo relacionado a agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY) - pela técnica de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR), corrigido pelo controle endógeno

gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase (GAPDH), conforme já descrito (Moraes 2009). (Ensaio feito pela doutoranda Joseane Morari, do Laboratório de Sinalização Celular, sob orientação do Prof. Lício A. Velloso – FCM-Unicamp). Testes de tolerância à insulina e à glicose foram realizados 4 e 2 dias antes da morte dos animais, respectivamente.

Para a realização do teste de tolerância à insulina (ITT), os animais foram colocados em jejum por 6 h e submetidos à administração intraperitoneal de solução de insulina (1.5 U/kg). Amostras de sangue foram coletadas antes e depois da aplicação de insulina em intervalos de 5 min por um período total de 30 min. A quantidade de glicose nessas amostras foi determinada utilizando-se glicosímetro (Abbott). Os valores de glicose foram plotados e a constante de velocidade para o desaparecimento da glicose ( $K_{ITT}$ ) foi calculada (Zecchin 2005).

Para a realização do teste de tolerância à glicose (GTT), os animais foram colocados em jejum por 6 h e submetidos à administração intraperitoneal de solução de glicose (25% m/m), sendo que cada animal recebeu 4 ml/kg. Amostras de sangue foram coletadas antes e depois da aplicação de glicose em intervalos de 30 min, por um período total de 2 h. A quantidade de glicose nessas amostras foi determinada utilizando-se glicosímetro (Abbott). Os valores de glicose foram plotados e a área sob a curva resultante foi calculada (de Souza 2007).

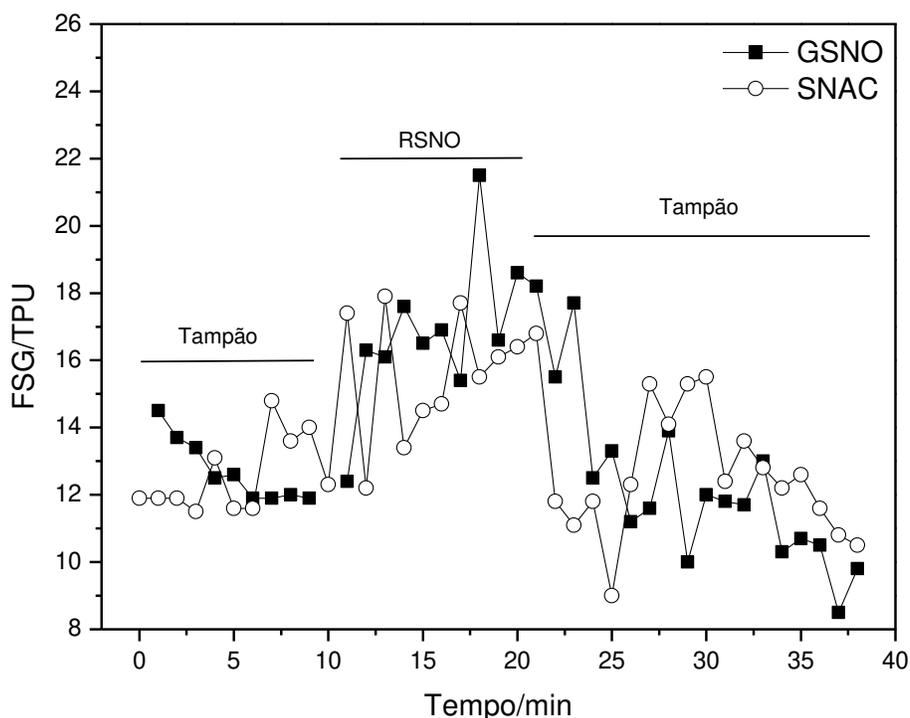
### **3.11. Análise Estatística**

Os experimentos foram realizados estudando-se os grupos de animais em paralelo. Para comparação do efeito da aplicação de solução de GSNO,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  no fluxo sanguíneo gástrico, foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon; para todas as outras comparações, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. As análises foram feitas através dos softwares Minitab 15 e InStat. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Os dados são expressos com o erro padrão.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Efeitos das aplicações tópicas de soluções de GSNO, SNAC, $\text{NO}_2^-$ e $\text{NO}_3^-$ no fluxo sanguíneo gástrico

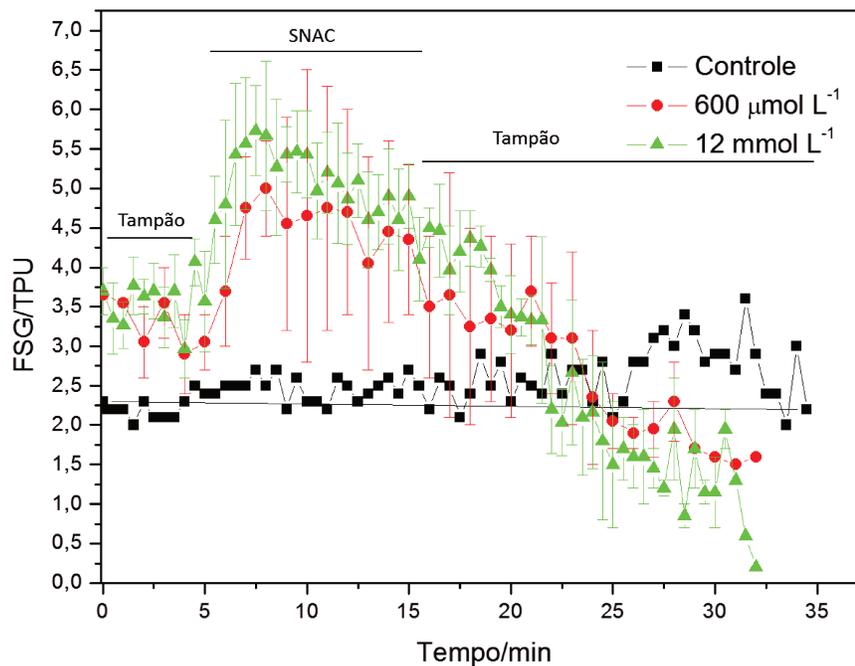
Os efeitos das aplicações tópicas de soluções de RSNOs,  $\text{NaNO}_2$  e  $\text{NaNO}_3$  no FSG em ratos Sprague-Dawley foram avaliados utilizando-se o método da câmara gástrica *ex vivo* e a fluxometria por laser Doppler. A Figura 4 apresenta os dados de FSG obtidos para a aplicação de SNAC e GSNO ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).



**Figura 4.** Efeito da aplicação de soluções tamponadas de SNAC e GSNO ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), pH 7,4, no fluxo sanguíneo gástrico, expresso em unidades de perfusão tecidual (TPU), em ratos Sprague-Dawley.

Como pode ser observado a partir da Figura 4, a aplicação das soluções de GSNO ou SNAC levou a um aumento no FSG, com pico em *c.a.* 7 min após a aplicação (tempo total de *c.a.* 17 min) e, com a substituição do RSNO pelo tampão, o FSG voltou ao seu valor basal após *c.a.* 5 min (tempo total de *c.a.* 25 min). Também é possível perceber que os efeitos da GSNO e da SNAC são bastante similares tanto no perfil de aumento de FSG, quanto no retorno ao fluxo basal e também nos valores máximos de FSG alcançados.

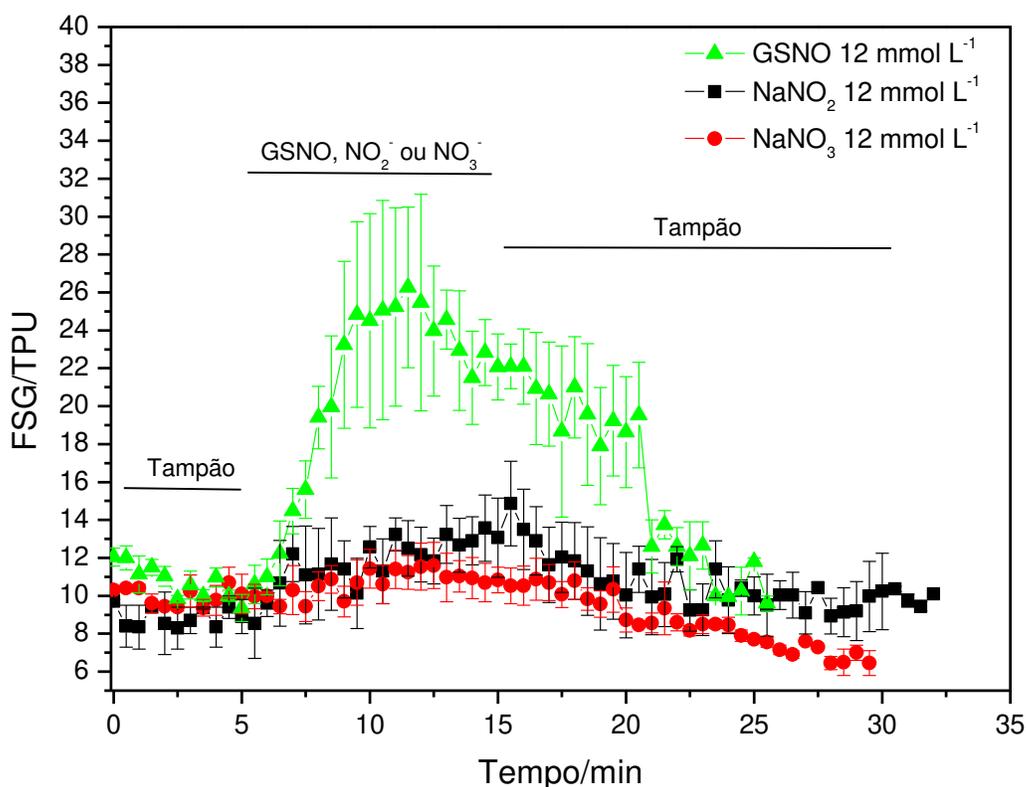
Esses resultados indicam que as diferenças estruturais entre essas duas moléculas não influenciam suas ações vasodilatadoras no FSG. Avaliou-se então o efeito da concentração do RSNO sobre as alterações do FSG. Os dados obtidos para a aplicação com SNAC em duas concentrações diferentes ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $12 \text{ mmol L}^{-1}$ ) estão apresentados na Figura 5.



**Figura 5.** Efeito da aplicação de soluções tamponadas de SNAC ( $600 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $12 \text{ mmol L}^{-1}$ ) ( $n=3$ ) e de solução tampão pH 7 (controle) no fluxo sanguíneo gástrico.

Como pode ser observado na Figura 5, a aplicação de SNAC ( $t = 5$  min) resultou no aumento significativo do fluxo sanguíneo em relação ao controle nas duas concentrações utilizadas ( $p < 0,001$ , para controle versus SNAC  $12 \text{ mmol L}^{-1}$ ; e  $p = 0,0403$  para controle versus SNAC  $600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Esse aumento atinge o seu máximo aproximadamente 3 min após a exposição (tempo total de *c.a.* 7,5 min) e, quando a solução de RSNO é substituída por solução tampão (tempo total = 10 min), o fluxo retorna ao seu valor basal em aproximadamente 13 min (tempo total de *c.a.* 23 min). As duas concentrações diferem quanto ao efeito no FSG em relação ao controle ( $p < 0,001$ ), entretanto, a diferença entre as respostas obtidas com as soluções  $600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  foi menor do que esperada, uma vez que um aumento de 20 x na concentração levou a apenas um leve aumento no FSG. A baixa correlação entre concentração e efeito no FSG observada pode se dever às variações entre os animais, que devem responder de formas diferentes ao estímulo. Assim, o uso de um número maior de animais para cada concentração poderia levar a uma dose resposta mais significativa. Outra hipótese que poderia ser considerada é a de que a dose de  $600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  já causa um relaxamento quase máximo da musculatura lisa, limitado por questões mecânicas, resultando no aumento próximo ao máximo no FSG; sendo assim, o aumento para a concentração de  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  não alteraria de forma relevante o aumento no fluxo sanguíneo gástrico.

O efeito da GSNO no FSG foi comparado ao causado pela aplicação de soluções de  $\text{NaNO}_2$  e  $\text{NaNO}_3$ , nas mesmas concentrações e os dados obtidos estão apresentados na Figura 6.



**Figura 6.** Efeito da aplicação de soluções tamponadas de GSNO, NaNO<sub>2</sub> e NaNO<sub>3</sub> (12 mmol L<sup>-1</sup>) (n=4) no fluxo sanguíneo gástrico.

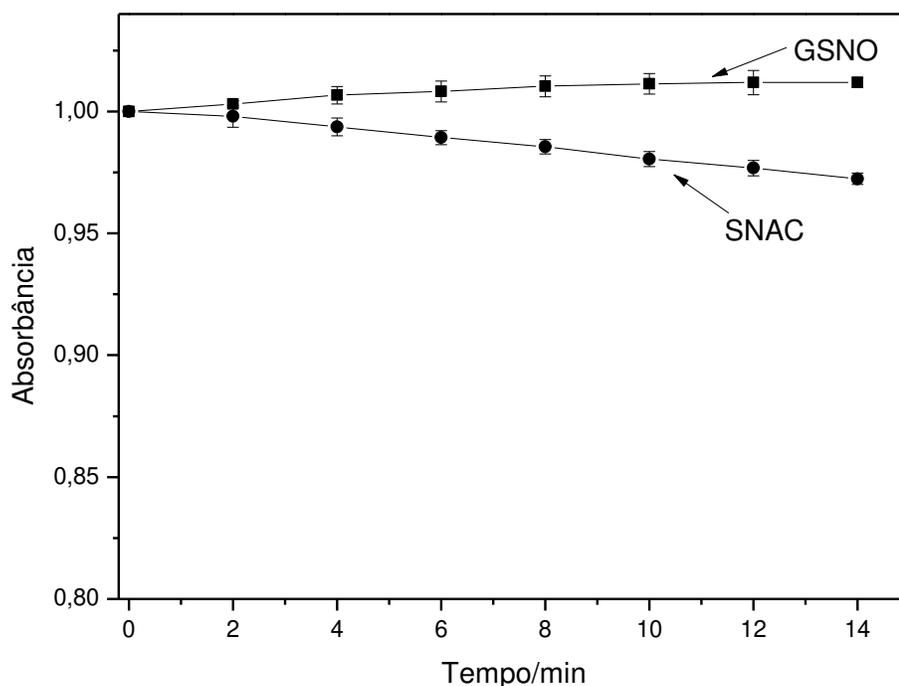
Como pode ser observado a partir da Figura 6, as aplicações das soluções de GSNO, NaNO<sub>2</sub> e NaNO<sub>3</sub> levaram ao aumento do FSG em relação ao fluxo controle nos 5 min iniciais ( $p = 0,004$ , para controle versus GSNO;  $p = 0,004$  para controle versus NaNO<sub>2</sub> e  $p = 0,006$  para controle versus NaNO<sub>3</sub>). A solução de GSNO levou a um aumento máximo no FSG bem mais pronunciado do que o observado para o NaNO<sub>2</sub> e NaNO<sub>3</sub> ( $p < 0,001$ ), com valor máximo *c.a.* de 5 x maior do que os obtidos pela aplicação de soluções equimolares de nitrito ou nitrato, e a solução de NaNO<sub>2</sub> apresentou diferença em relação a solução de NaNO<sub>3</sub> ( $p < 0,001$ ). O perfil de variação no FSG foi também diferente entre o GSNO e os ânions NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, uma vez que o pico máximo de aumento no FSG causado pela exposição ao NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi atingido após *c.a.* 10 min da

aplicação (tempo total de *c.a.* 15 min), enquanto que o aumento resultante da exposição a GSNO ocorreu *c.a.* de 7 min (tempo total de *c.a.* 10 min).

O aumento de fluxo sanguíneo causado pela exposição aos RSNOs pode ser entendido como resultado da quebra da ligação S-NO da GSNO ou SNAC, com liberação do NO, que ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs), iniciando assim a cascata de sinalização para o relaxamento muscular (Francis 2010). A quebra da ligação S-NO pode ocorrer por dois mecanismos distintos: a redução do RSNO por um agente redutor; ou a decomposição catalisada térmica ou fotoquimicamente. Esse último mecanismo leva à formação do dímero do tiól (RSSR) e liberação de NO (Oliveira 2002), segundo a equação (9):



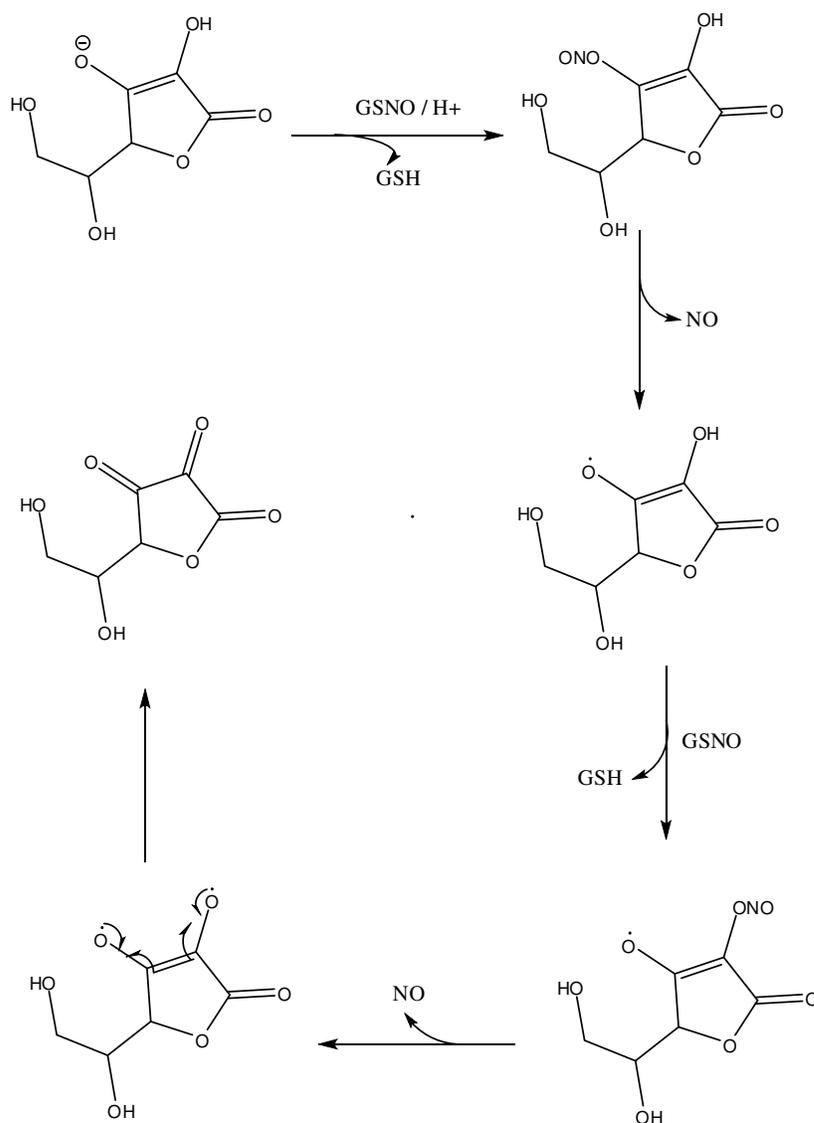
A decomposição térmica de soluções de GSNO e SNAC no escuro na concentração utilizada nos experimentos foi avaliada e está apresentada na Figura 7.



**Figura 7.** Curvas cinéticas de decomposição de GSNO e SNAC ( $12 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em pH 7,4,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz, baseadas na variação espectral da banda característica dos RSNOs em 336 nm.

Como pode ser observado a partir da Figura 7, no período em que o fluxo sanguíneo se encontra em seu valor máximo (tempo total de *c.a.* 10 min), a decomposição térmica da GSNO não é significativa e a da SNAC é menor do que 5%. Desta forma, a concentração de NO livre na solução, resultante apenas da decomposição térmica espontânea dos RSNOs neste período deve ser muito baixa e é pouco provável que ela seja a responsável pelos aumentos de FSG observados. Uma vez que a decomposição fotoquímica de RSNOs requer intensidades de radiação UV-VIS muito maiores que as presentes na luz ambiente (Hogg 2002) para ocorrer em uma extensão significativa, a catálise pela luz ambiente neste intervalo de tempo é também pouco provável como causa da liberação de NO. Estas considerações permitem propor que a liberação de NO a partir dos RSNOs utilizados deve estar associada à ação de agentes redutores encontrados

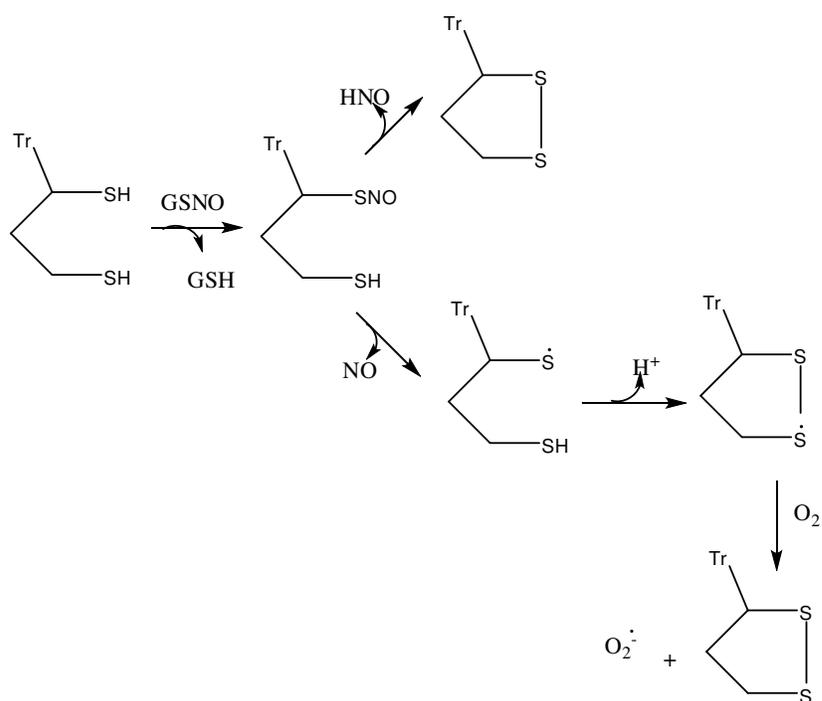
endogenamente, como o ácido ascórbico. O ácido ascórbico pode reduzir RSNOs, com subsequente liberação de NO, através do ataque nucleofílico pelo oxigênio do ascorbato ao átomo de nitrogênio da ligação SNO, levando à liberação do tiól e à formação do *O*-nitrosoascorbato, que se decompõe por um mecanismo radicalar, gerando ácido dehidroascórbico e NO, segundo o Esquema 1 (Smith 2000, Holmes 2000).



Esquema 1

Um outro possível agente redutor é o sistema tioredoxina (Trx-(SH)<sub>2</sub>)-tioredoxina redutase (TR). A função endógena da proteína Trx-(SH)<sub>2</sub> é a regulação de proteínas que contém tióis, pela redução das ligações S-S das proteínas alvos através da oxidação de seus próprios grupamentos SH, gerando Trx-S<sub>2</sub>, que são novamente reduzidos à Trx-

(SH)<sub>2</sub> pela atividade da TR dependente de NADPH (Nikitovic 1996, Stoyanovsky 2005, Sengupta 2007). Já foi reportado na literatura que a Trx-(SH)<sub>2</sub> desnitrosa RSNOs (Nikitovic 1996, Sengupta 2007); entretanto, o mecanismo dessa reação ainda não está completamente elucidado, sendo que alguns autores apontam que ocorra liberação de nitroxila (NO<sup>-</sup>), que também apresenta ação vasodilatadora (Favaloro 2007, Irvine 2008), enquanto outros estudos apontam que a reação libera NO (Stoyanovsky 2005, Nikitovic 1996, Sengupta 2007, Arai 2008), conforme demonstrado no Esquema 2.



Esquema 2

Com os dados obtidos no presente estudo, não foi possível afirmar qual ou quais agentes redutores estariam agindo na desnitrosação da GSNO e da SNAC, levando aos efeitos de aumento do fluxo sanguíneo gástrico observados e mais estudos serão necessários para a elucidação desse mecanismo.

O fato da aplicação de solução de GSNO ter apresentado ação vasodilatadora mais potente que as soluções de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pode ser entendido como consequência de uma maior facilidade de redução da GSNO a GSH e NO do que de redução dos íons NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e

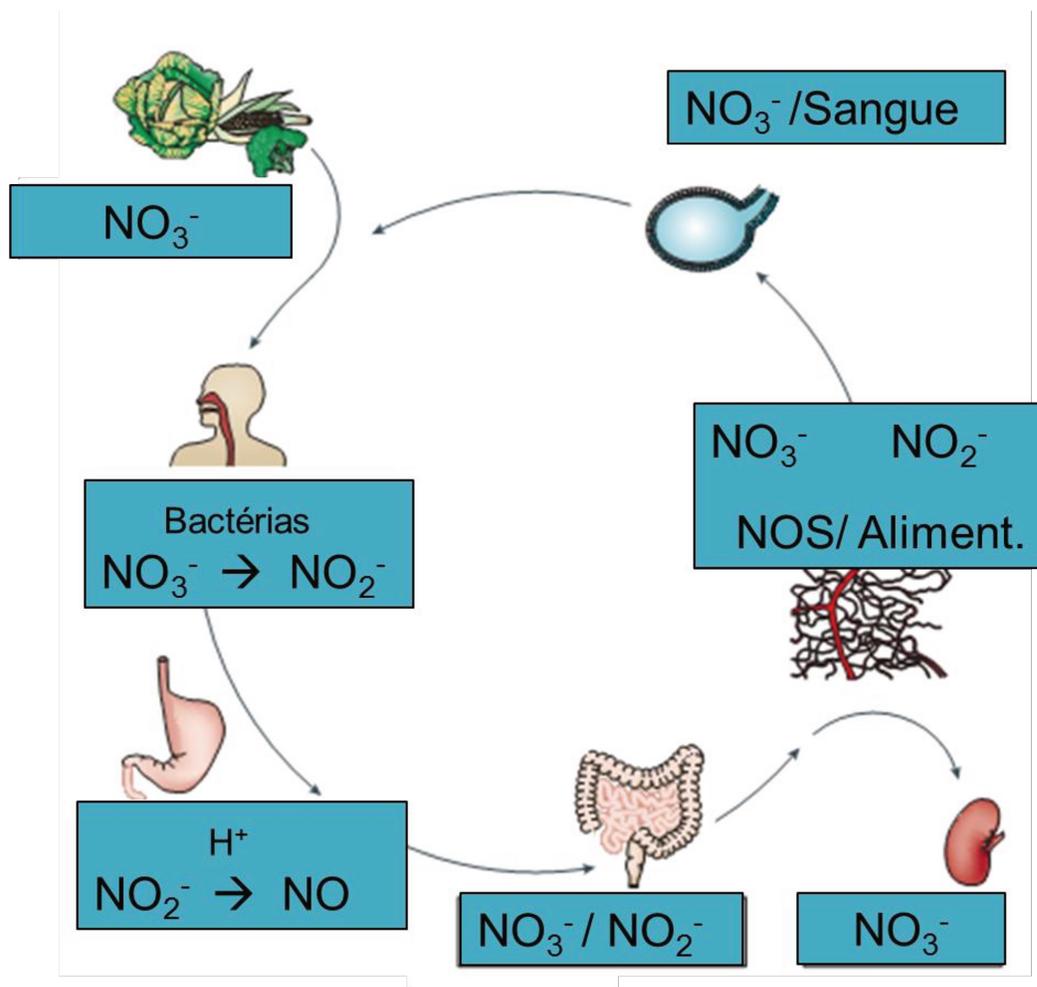
$\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}$ . Deve-se considerar também que a redução da GSNO pode estar associada à presença de proteínas específicas desta reação.

Esses resultados têm implicações tanto para a aplicação terapêutica dos RSNOs quanto para a bioquímica do  $\text{NO}$  no sistema gástrico. Para a terapêutica, os dados demonstram que os RSNOs levam a um aumento no FSG mais intenso e mais rápido do que os atingidos com a aplicação de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , fato a ser considerado na abordagem que propõe a administração de nitritos e nitratos para a prevenção das úlceras gástricas causadas pelo uso crônico de AINEs. Os AINEs são inibidores de prostaglandinas, moléculas que estimulam as células epiteliais a liberar muco e bicarbonato, que são potentes vasodilatadoras e que, portanto, protegem a mucosa gástrica de danos, já que um rápido aumento no FSG da mucosa depois da exposição a um agente irritante permite a remoção do composto tóxico, e o muco protege a mucosa do agente irritante (Wallace 2008). Conseqüentemente, a inibição dessas propriedades pelo uso de AINEs leva a danos na mucosa gástrica. Uma vez que existem propostas terapêuticas para a administração de nitritos e nitratos conjuntamente com os AINEs para diminuir os efeitos colaterais desses fármacos (Lundberg 2008 e 2010), os dados obtidos sugerem que os RSNOs poderiam ter efeito mais potente no FSG e, conseqüentemente, melhor efeito na prevenção dos danos causados pelo uso crônico de AINEs.

Para a bioquímica do  $\text{NO}$  no sistema gástrico, o fato de que os RSNOs apresentam efeito mais pronunciado do que o  $\text{NO}_2^-$  no FSG nas condições estudadas se soma à suposição de que os RSNOs formados no estômago a partir do nitrito possam exercer ações fisiológicas na mucosa gástrica. Como citado na introdução, a produção endógena de  $\text{NO}$  ocorre através de uma classe de enzimas, as NOSs, e a oxidação do  $\text{NO}$  formado gera nitrito e nitrato. A ingestão de nitrato presente na dieta é outra fonte de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  para os mamíferos, sendo que essa via dietética pode fornecer quantidades relevantes desses óxidos de nitrogênio, uma vez que muitos vegetais são particularmente ricos em  $\text{NO}_3^-$ : um prato de vegetais de folhas verdes, como alface ou espinafre por exemplo,

contêm mais nitrato do que é formado endogenamente pelas três isoformas de NOS combinadas em um dia (Lundberg 2008).

A via do  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  proveniente da dieta inicia-se com a ingestão de componentes contendo nitrato, que é reduzido à  $\text{NO}_2^-$  enzimaticamente pela flora comensal da cavidade oral, uma vez que não há nos mamíferos uma enzima para a redução de  $\text{NO}_3^-$ . Quando a saliva contendo nitrito chega ao estômago, grande parte do  $\text{NO}_2^-$  é protonado à ácido nitroso ( $\text{pK}_a = 3,2-3,4$ ), que se decompõe a NO e outros óxidos de nitrogênio, segundo as equações (2) e (3). A redução de  $\text{NO}_2^-$  a NO é aumentada por compostos redutores como vitamina C e polifenóis. O nitrato e o nitrito restantes são absorvidos pelo intestino delgado e vão para a circulação sistêmica. Uma parte do nitrato é excretado na urina e aproximadamente 25% é extraído pelas glândulas salivares e concentrado na saliva, onde o ciclo reinicia (Lundberg 2008), conforme esquematizado na Figura 8.



**Figura 8.** Ciclo entérico salivar do nitrito, nitrato e óxido nítrico em humanos. Adaptado de (Lundberg 2008). Licença n.º 2692620744352.

Estudos recentes demonstram que a via do nitrato de fonte dietética parece ter efeitos sistêmicos como diminuição da pressão sanguínea e inibição da agregação plaquetária, e efeitos gástricos como inibição dos danos causados por AINEs. Webb *et al.* (Webb 2008) administraram suco de beterraba, que contém altas doses de nitrato, a humanos saudáveis e 3 h depois da ingestão a pressão sanguínea foi reduzida significativamente, o que se correlacionou com o pico do aumento da concentração plasmática de nitrito. Quando a conversão entero-salivar de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , que ocorre através do intermédio de bactérias presentes na superfície da língua, foi interrompida (os voluntários cuspiram a saliva antes e durante a ingestão do suco), não foi possível

observar alterações nos níveis de nitrito plasmático nem efeitos na pressão sanguínea. Jansson *et al.* (Jansson 2007) administraram nitrato de sódio oralmente a ratos, em uma dose equivalente à encontrada em uma dieta rica em vegetais, e cloreto de sódio como controle, por uma semana e induziram lesões gástricas por administração aguda de diclofenaco. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com nitrato diminuiu as lesões causadas por diclofenaco, e aumentou a espessura do muco.

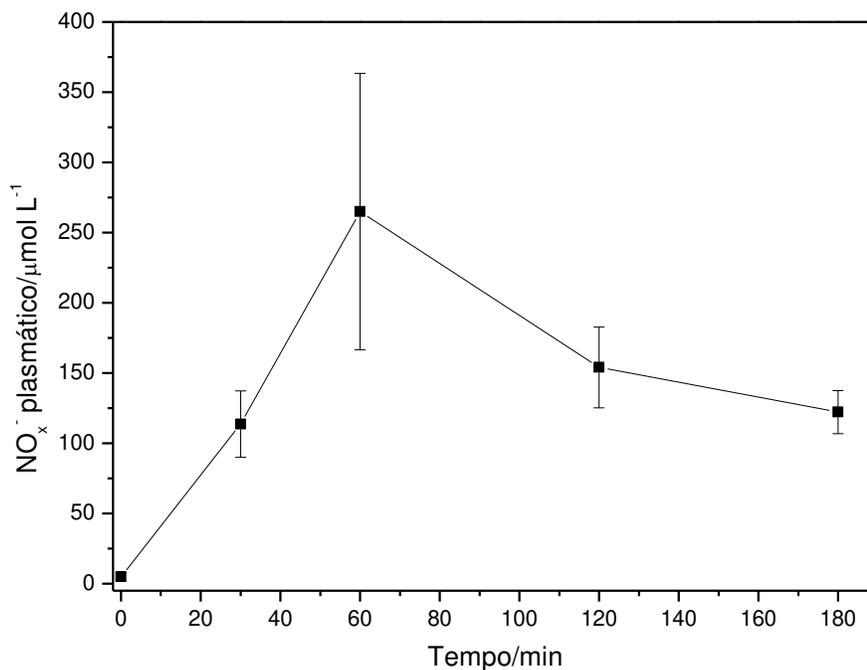
Entretanto, além da formação de NO no estômago, o  $\text{NO}_3^-$  dietético pode levar também à formação de RSNOs, segundo as equações (4) e (5), e essas espécies seriam responsáveis, ao menos em parte, pelas ações fisiológicas observadas com a administração oral do nitrato. De fato, a administração de  $\text{KNO}_3$  oralmente à humanos saudáveis levou a uma inibição significativa na agregação plaquetária, concomitantemente com um aumento nos níveis de RSNOs no suco gástrico (Richardson 2002a), sugerindo então que os S-nitrosotióis estariam envolvidos na ação anti-agregação plaquetária e no efeito gástrico do nitrato. Bjorne *et al.* (Bjorne 2004) coletaram saliva de voluntários humanos saudáveis em jejum (baixo teor de nitrito) e depois da ingestão de nitrato (alto teor de nitrito) e aplicaram essa saliva sobre a mucosa gástrica de ratos, utilizando o modelo de câmara gástrica *ex vivo*, semelhantemente aos experimentos realizados no presente estudo. O FSG da mucosa e a espessura do muco aumentaram depois da aplicação da saliva rica em nitrito enquanto que a saliva de jejum não teve efeito na mucosa. Além disso, a acidificação da saliva rica em  $\text{NO}_2^-$ , para mimetizar o ambiente ácido do estômago resultou na formação de RSNOs. A aplicação de solução de SNAP na mucosa gástrica também levou a um aumento do FSG. Diante dos resultados obtidos, os autores concluíram que não é possível afirmar se os efeitos do nitrito acidificado são causados pelo NO diretamente ou através da geração de RSNOs, que fariam o transporte do NO através do muco e da mucosa gástrica.

Os dados obtidos no presente estudo permitem concluir que as soluções de SNAC e GSNO apresentam efeito mais potente no FSG do que os íons  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ . O esclarecimento dos mecanismos de ação vasodilatadora dos RSNOs na mucosa gástrica

não fez parte do escopo deste trabalho e deve ser investigado em trabalhos subsequentes do grupo de pesquisa.

#### 4.2. Dosagem de Metabólitos após administração orogástrica

A dosagem de nitritos e nitratos totais ( $\text{NO}_x^-$ ) circulantes no plasma é uma medida amplamente adotada como marcador da concentração de NO no organismo (Tsikas 2006), uma vez que o NO produzido é oxidado a  $\text{NO}_2^-$  e subsequentemente, a  $\text{NO}_3^-$ . O efeito da administração orogástrica de soluções de SNAC e GSNO nos níveis de  $\text{NO}_x^-$  plasmáticos de camundongos Swiss foi analisado utilizando-se o método de quimiluminescência. Inicialmente, avaliou-se a curva de aumento de  $\text{NO}_x^-$  plasmático em função do tempo em resposta à administração de  $365 \mu\text{mol/kg}$  de SNAC, conforme apresentado na Figura 9.



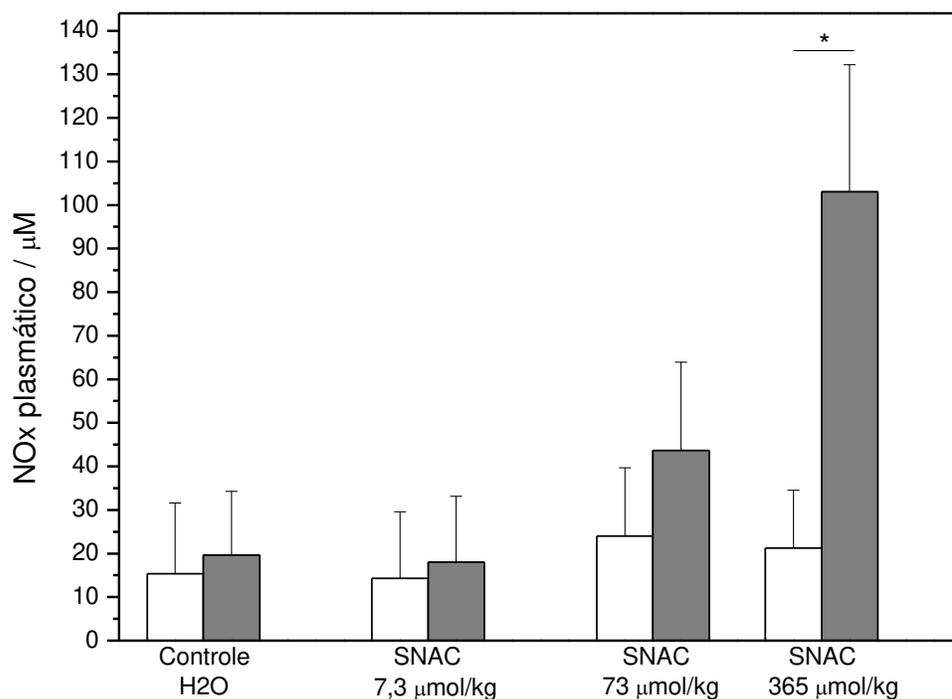
**Figura 9.** Efeito da administração oral de  $365 \mu\text{mol/kg}$  de SNAC nos níveis plasmáticos de  $\text{NO}_x^-$  de camundongos Swiss, em função do tempo, avaliados por quimiluminescência.

Como pode ser observado a partir da Figura 9, a administração oral de SNAC levou a um aumento significativo nos níveis de  $\text{NO}_x^-$  plasmáticos em relação ao tempo zero em todos os intervalos observados ( $p = 0,0079$ ), sendo que o pico de aumento ocorreu após 1 h da administração, voltando a cair após esse intervalo, possivelmente devido ao processo de excreção desses ânions na urina. O intervalo de aproximadamente 60 min para que se atinja o pico plasmático de  $\text{NO}_x^-$  está de acordo com o estudo de Cortas *et al.* (Cortas 1991), que avaliaram a farmacocinética de  $\text{NO}_3^-$  em humanos e observaram que o pico de  $\text{NO}_3^-$  no plasma ocorreu de 40 a 60 min após administração oral de  $\text{NaNO}_3$ . Lundberg *et al.* (Lundberg 2004) também estudaram a ingestão de  $\text{NaNO}_3$  em humanos e observaram que os níveis de  $\text{NO}_3^-$  plasmáticos começaram a se elevar após 15 min da ingestão, atingiram o máximo após 30 min, tiveram uma leve queda após 90 min, mas permaneceram altos até 150 min após a ingestão, que é o tempo máximo por eles observado. Semelhantemente, Pannala *et al.* (Pannala 2003) administraram refeições ricas ou pobres em nitrato a voluntários humanos e observaram que o consumo de uma dieta rica em  $\text{NO}_3^-$  levou a um aumento desse ânion no plasma após 1 h da ingestão, com excreção pela urina após 4 a 6 h, sendo que o nitrato ingerido foi completamente excretado após 24 h da administração.

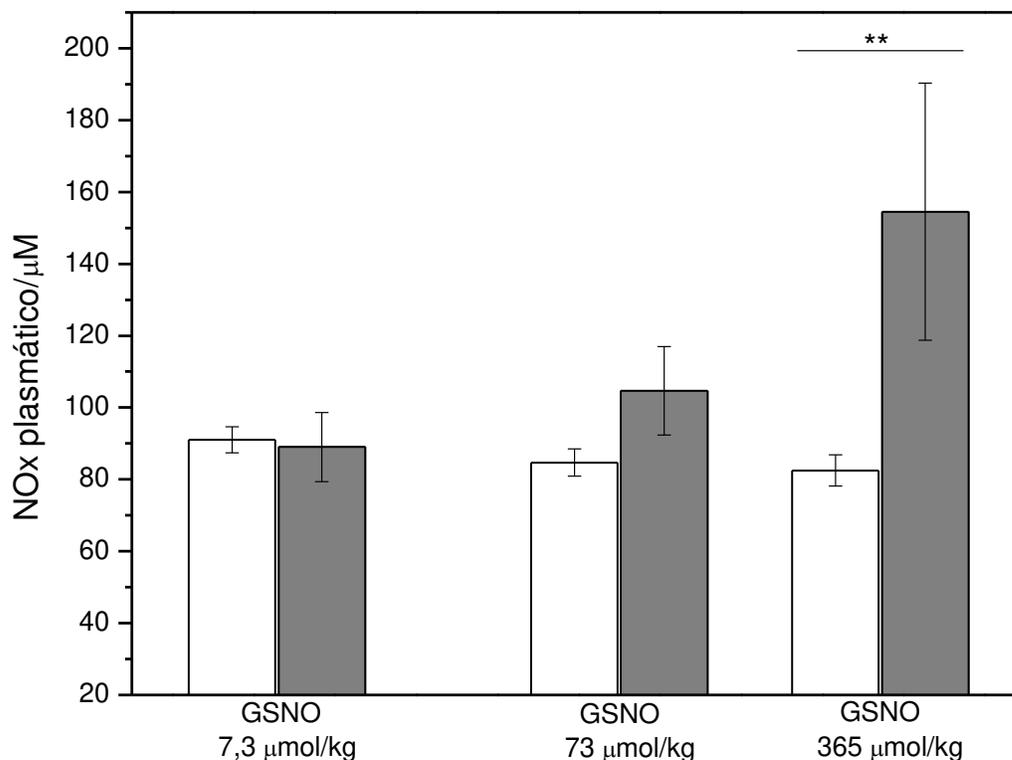
Os dados obtidos utilizando-se camundongos no presente estudo e os reportados na literatura utilizando humanos diferem no intervalo necessário para que os níveis plasmáticos de  $\text{NO}_x^-$  comecem a diminuir, e essa diferença deve ser resultado das diferenças entre o metabolismo de camundongos e de humanos. Entretanto, o pico plasmático após aproximadamente 60 min da administração do doador de NO é similar entre os resultados obtidos no presente estudo e os estudos realizados em humanos, sugerindo um mecanismo de absorção semelhante.

Diante dos dados obtidos, estabeleceu-se que o tempo mais apropriado para a coleta de amostras de sangue para dosagem de  $\text{NO}_x^-$  seria 1 h após a administração oral do RSNO. O efeito da concentração das soluções nos níveis de  $\text{NO}_x^-$  plasmáticos foi avaliado através da administração de solução de SNAC ou GSNO nas doses de 7,3; 73,0

e 365,0  $\mu\text{mol/kg}$  (utilizando-se soluções nas concentrações de 1,2; 12,0 e 60,0 mM, respectivamente). Essas doses foram escolhidas porque 7,3  $\mu\text{mol/kg}$  foi a dose utilizada nos estudos com modelos animais de DHGNA (de Oliveira 2006a, 2006b, 2007 e 2008). A dose de 365  $\mu\text{mol/kg}$  foi estabelecida como dose máxima porque, após a administração dessa dose, observou-se uma mudança de comportamento no estado de vigília dos animais, que sugeria uma queda de pressão sanguínea ocasionada por uma vasodilatação sistêmica. Os dados obtidos estão apresentados nas Figuras 10 e 11.



**Figura 10.** Níveis plasmáticos de  $\text{NO}_x^-$  de camundongos Swiss, antes e 1 h após a administração por gavagem de soluções de SNAC em diferentes concentrações. \*  $p = 0,03$ .



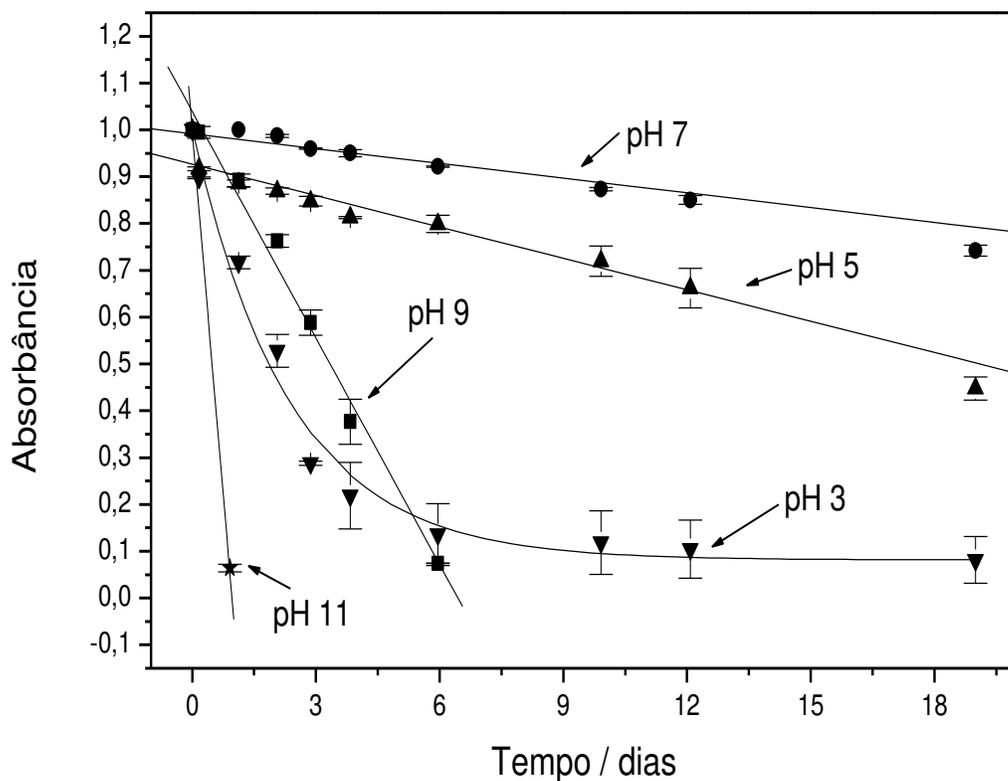
**Figura 11.** Níveis plasmáticos de  $\text{NO}_x^-$  de camundongos Swiss, antes e 1 h após a administração por gavagem de soluções de GSNO em diferentes concentrações. \*\*  $p = 0,03$

Como pode ser observado a partir das Figuras 10 e 11, a administração de SNAC ou GSNO na dose de  $7,3 \mu\text{mol/kg}$  não apresentou alteração significativa nos níveis de  $\text{NO}_x^-$ . A dose de  $73 \mu\text{mol/kg}$  apresentou uma tendência de aumento nos níveis de  $\text{NO}_x^-$ , mas não de forma estatisticamente significativa, enquanto que a dose de  $365 \mu\text{mol/kg}$  apresentou um aumento significativo nos níveis plasmáticos de  $\text{NO}_x^-$ . O procedimento de gavagem *per se* não apresenta nenhum efeito nos níveis de  $\text{NO}_x^-$ , uma vez que não houve diferença nos valores de  $\text{NO}_x^-$  do plasma dos animais gavados com tampão (grupo controle).

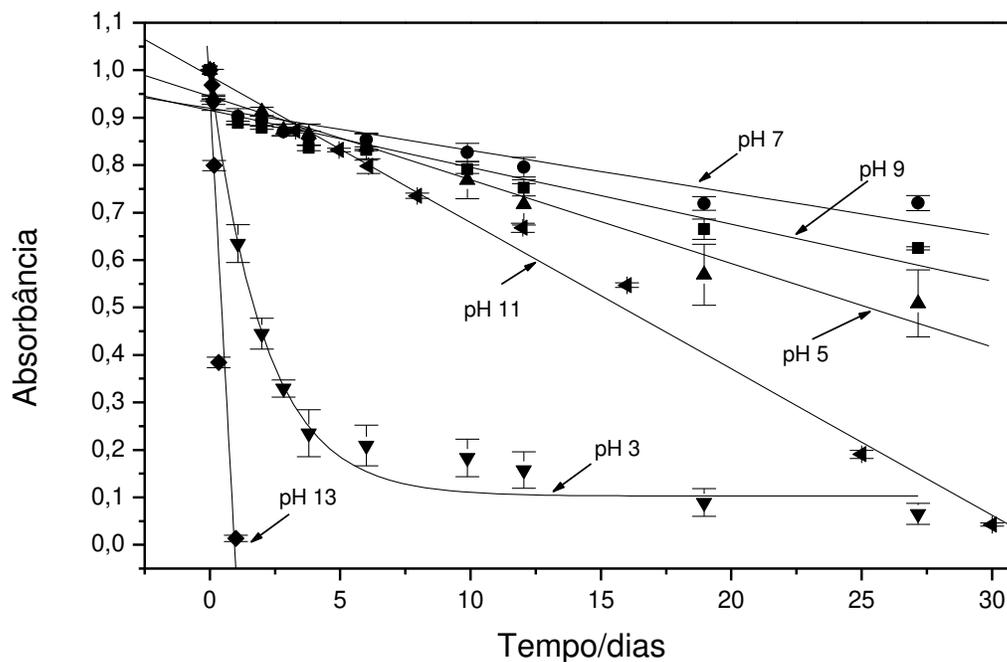
Em trabalhos anteriores, foi demonstrado que a administração oral de doses de SNAC na ordem de 6 a 7,3  $\mu\text{mol/kg}$  apresenta efeitos benéficos em modelos de esteatose hepática (Oliveira 2006a, 2006b, 2007 e 2008) e de fibrose hepática (Vercelino 2010) e doses de GSNO entre 20 e 100  $\mu\text{mol/kg}$  inibem as lesões gástricas induzidas por piroxicam (Tam 2000). Dessa forma, pode-se concluir que para que o RSNO tenha algum efeito fisiológico, não é necessário que a dose administrada interfira de forma drástica nos níveis basais de  $\text{NO}_x^-$ , o que permite supor que os efeitos colaterais, se houverem, não serão devidos a uma alteração sistêmica dos níveis de nitritos e nitratos.

### **4.3. Decomposição de GSNO e SNAC em função do pH**

Uma vez que os dados obtidos com a câmara gástrica e com a avaliação de  $\text{NO}_x^-$  no plasma mostraram que a GSNO e SNAC apresentam atividade sobre o FSG e que os metabólitos de NO atingem a circulação sistêmica, as questões que surgem são: 1) o efeito sobre a mucosa gástrica é causado pelo RSNO ou pelo NO liberado por eles? 2) quem atravessa a mucosa gástrica e/ ou intestinal para atingir a circulação sistêmica é o RSNO intacto ou um metabólito, como nitrito e nitrato? Para responder a essas questões, é necessário conhecer-se o perfil de decomposição dos RSNOs nas condições estomacais. Entretanto, essa informação não pode ser obtida a partir dos dados da literatura, uma vez que a meia vida dos RSNOs varia grandemente entre os estudos publicados (Singh 1996, Bartberger 2001). Esta variação se deve principalmente ao fato de que a presença de traços de íons metálicos – especialmente cobre e ferro, a luz e a temperatura aumentam a decomposição dos RSNOs (Hogg 2000 e 2004). Sendo assim, dependendo da pureza do tampão utilizado e das condições de estocagem da solução de RSNO, a meia vida calculada pode ser bastante afetada por artefatos (Hogg 2000). Uma vez que o pH do sistema gastrointestinal varia grandemente, indo de pHs baixos, como pH 1,3 no estômago vazio, até pH 7,5 no íleo (Horter 2001), a cinética de decomposição da GSNO e da SNAC em função do pH foi avaliada e os dados obtidos estão apresentados nas Figuras 12 e 13.

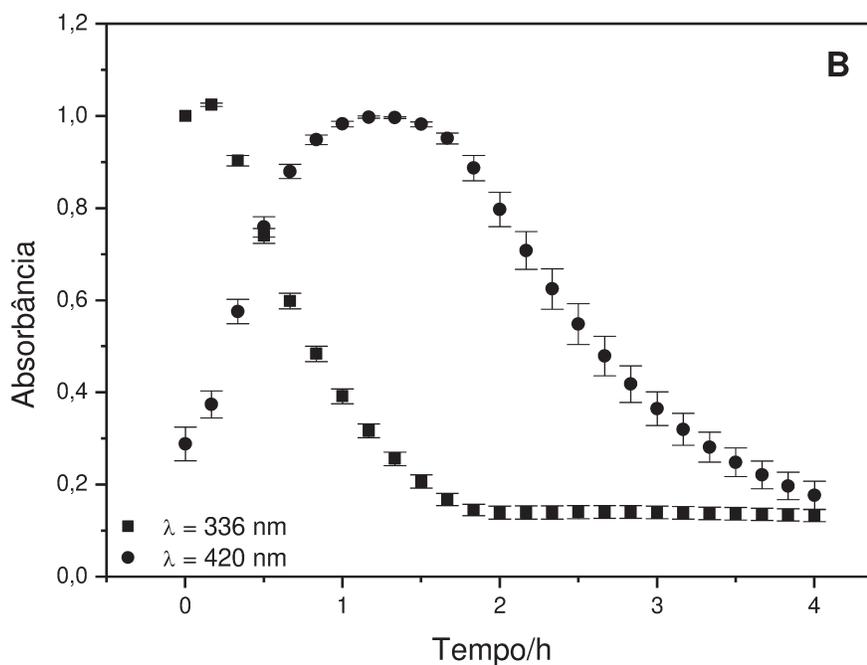
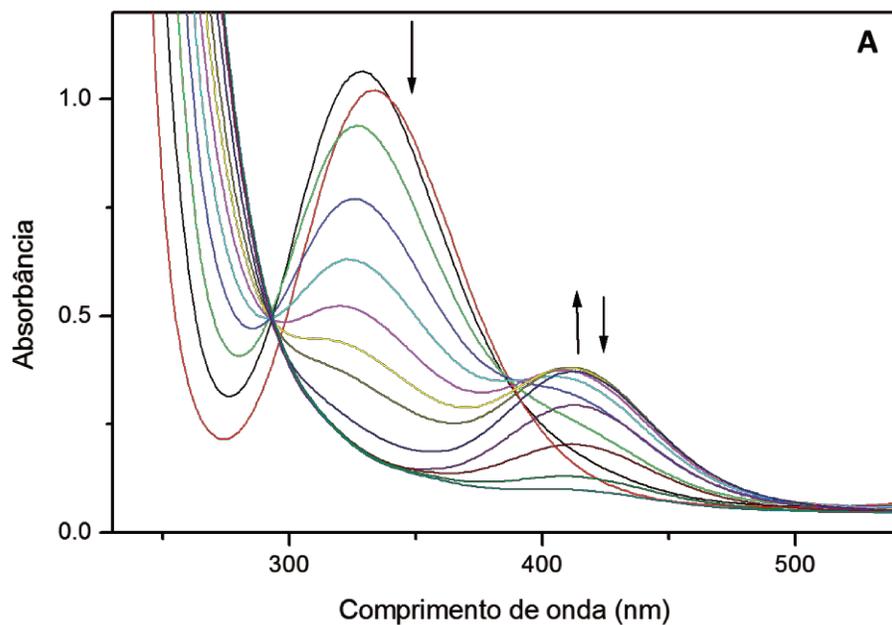


**Figura 12.** Curvas cinéticas da decomposição de soluções de GSNO ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , no escuro, em presença de EDTA 0.1%) em função do pH, monitoradas em 336 nm.



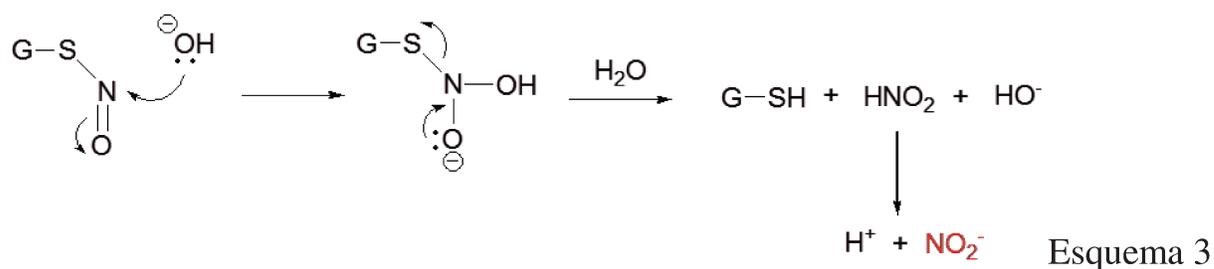
**Figura 13.** Curvas cinéticas da decomposição de soluções de SNAC ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , no escuro, em presença de EDTA 0.1%) em função do pH, monitoradas em 336 nm.

Como pode ser observado a partir dos dados das Figuras 12 e 13, há uma tendência de diminuição da velocidade de decomposição conforme o pH se aproxima de pH 7, sendo que meios ácidos ou básicos aceleram a decomposição da GSNO e da SNAC. Para a solução de GSNO em pH 13, foi observado o aparecimento de uma banda de absorção em 420 nm no espectro durante a decomposição, conforme apresentado na Figura 14A. As curvas de variação da intensidade dessa banda, juntamente com a de desaparecimento da banda em 336 nm, referente a ligação S-NO, estão apresentadas na Figura 14B.

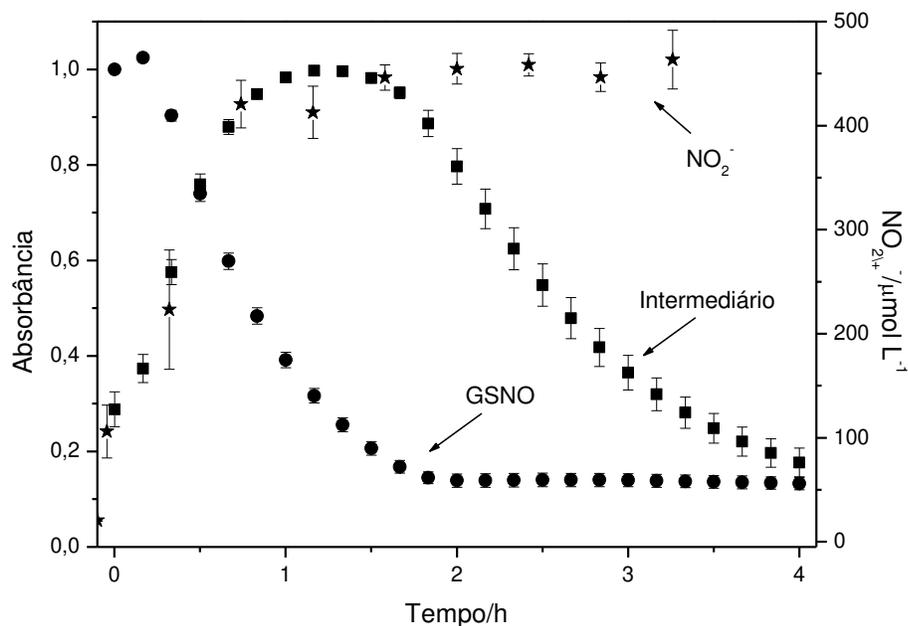


**Figura 14.** (A) Variações espectrais da solução de GSNO (1 mmol L<sup>-1</sup>, 25 °C, no escuro, em presença de EDTA 0.1%) em pH 13 e (B) curvas cinéticas de variação de intensidade das bandas monitoradas nos comprimentos de onda de 336 nm (quadrados) e em 420 nm (círculos).

Como pode ser observado a partir da Figura 14, a banda em 420 nm apareceu imediatamente após o início da reação e seu crescimento está associado com o crescimento da absorção em  $\lambda < 290$  nm e com o concomitante desaparecimento da banda de absorção da GSNO em  $\lambda = 336$  nm, como se confirma pela existência de 2 pontos isobésticos em  $\lambda \cong 290$  e 390 nm. Esta banda transiente atingiu o máximo após 2 h do início da reação e desapareceu 2 h depois (tempo total = 4 h). Uma possível explicação para esse efeito em pH 13 envolve um ataque nucleofílico do ânion  $\text{OH}^-$  ao átomo de nitrogênio do NO da GSNO, gerando um intermediário ( $\text{RS-NO}_2\text{H}^-$ ), onde o grupo nitrito ligado ao átomo de enxofre é o responsável pela banda em 420 nm. Esse intermediário se decompõe formando o íon nitrito e a glutatona reduzida (GSH) (Esquema 3):



Essa hipótese foi investigada coletando-se alíquotas da solução de GSNO em pH 13 por 2 h, em intervalos de 15 min, e o  $\text{NO}_2^-$  presente foi quantificado por quimiluminescência como descrito anteriormente. Os resultados estão apresentados na Figura 15, onde as curvas cinéticas das bandas em 336 e 420 nm apresentadas na Figura 14 foram incluídas novamente para comparação.

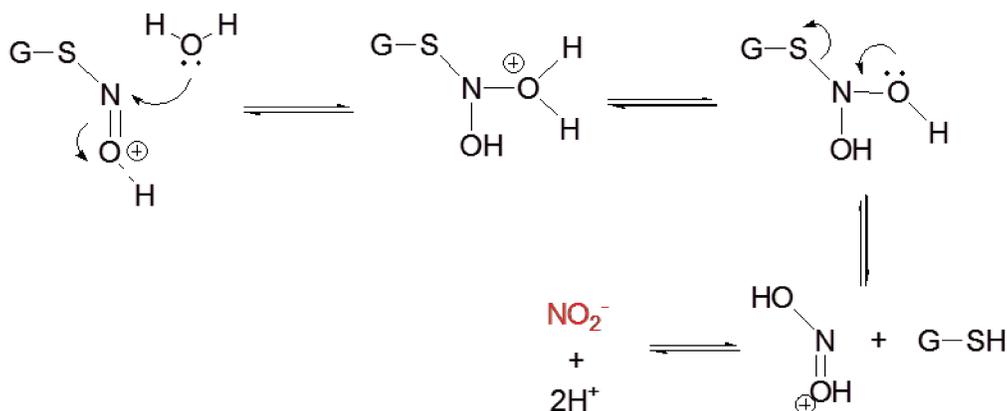


**Figura 15.** Curvas cinéticas de variação de intensidade das bandas monitoradas nos comprimentos de onda de 336 nm (GSNO) e 420 nm (intermediário) e de aumento da concentração de nitrito durante a decomposição de solução de GSNO (1 mmol L<sup>-1</sup>, 25 °C, no escuro, em presença de EDTA 0.1%) em pH 13.

Como pode ser visto a partir dos dados apresentados na Figura 15, os resultados corroboram a hipótese da formação de um intermediário que se decompõe a nitrito, uma vez que a concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> é baixa no início da reação, quando a decomposição da GSNO ainda é pequena e, portanto, os níveis do intermediário ainda são baixos, mas aumenta progressivamente, até atingir um platô após 1 h do início da reação, quando o nível de intermediário atinge seu máximo e começa a decair. Pode-se levantar a hipótese de que o platô na concentração de nitrito observado a partir de 1 h até 2 h deve ser resultado da velocidade de decomposição do intermediário à NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ser próxima à velocidade da oxidação do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mantendo-se assim a concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> constante, entretanto, com os dados obtidos no presente estudo não é possível afirmar que esse fenômeno esteja ocorrendo. Em suma, o ataque nucleofílico do ânion hidroxila

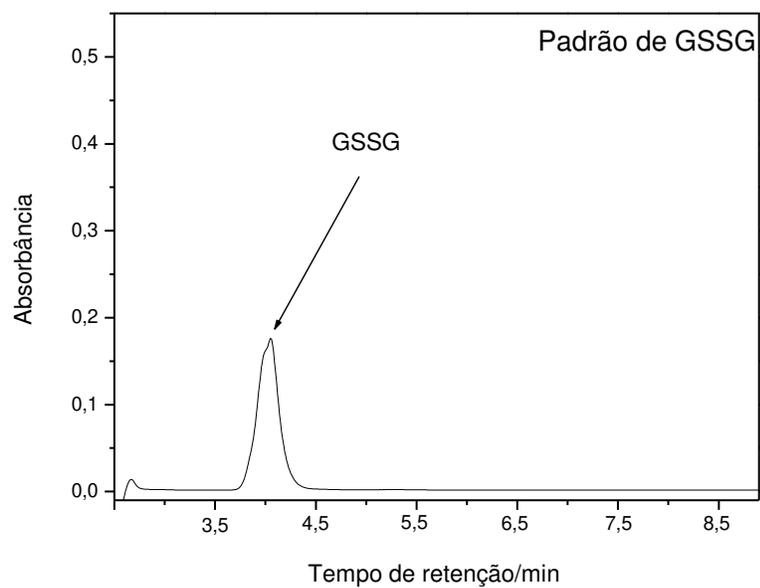
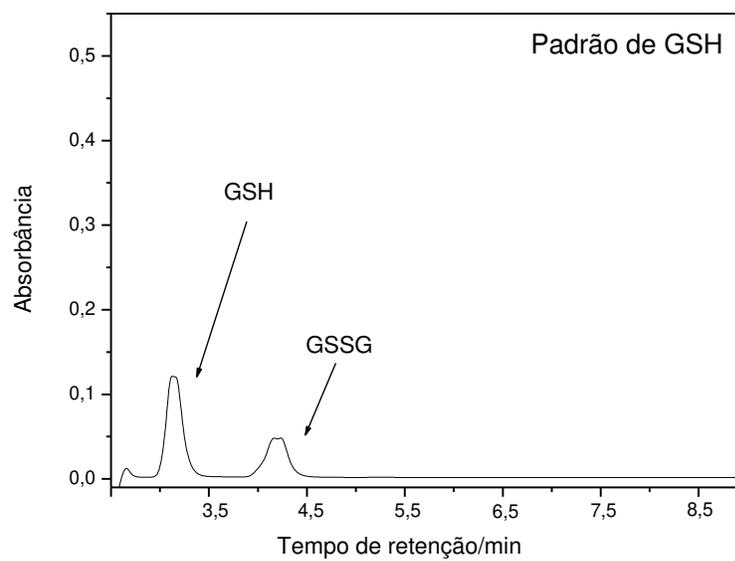
deve ser o responsável pela rápida decomposição da GSNO em pHs elevados, conforme observado.

Em meios ácidos, o cátion  $H^+$  pode protonar o enxofre ligado ao NO, enfraquecendo a ligação S-NO e favorecendo o ataque pelo oxigênio da água ao átomo de nitrogênio do NO da GSNO, com a conseqüente quebra da ligação e liberação de GSH e ácido nitroso (Esquema 4):

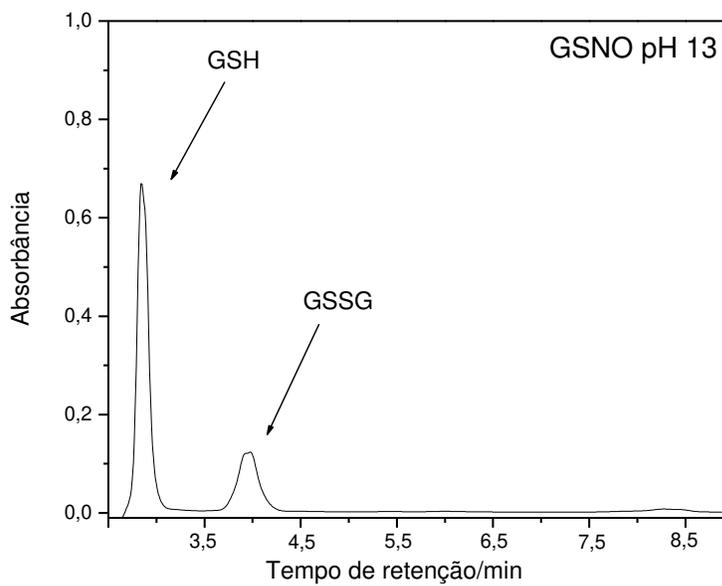
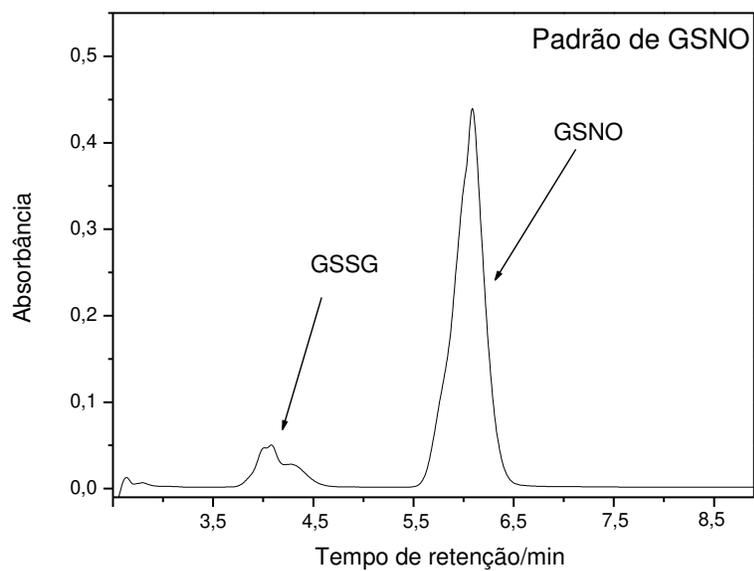


Esquema 4

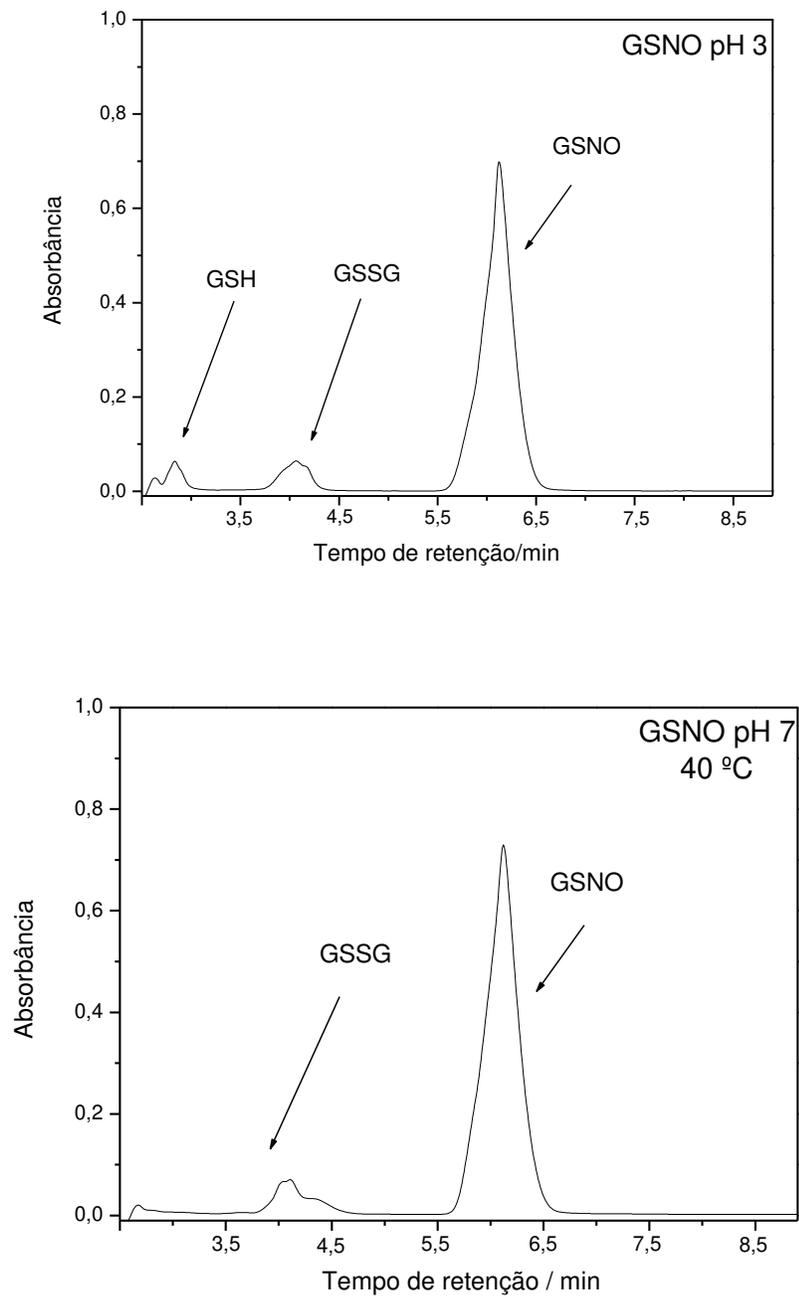
Para verificar a ocorrência dos mecanismos apresentados nos Esquemas 3 e 4, investigou-se a formação de GSH como produto comum destas hidrólises básica e ácida. A presença de GSH na solução de GSNO mantida em pH 13 por 1 h e em pH 3 por 3 dias foi analisada por HPLC e esses intervalos de tempo foram escolhidos porque a GSNO se decompõe quase inteiramente após 1 h em pH 13, mas em pH 3 leva em torno de 12 dias para decompôr 90%. Dessa forma, para termos níveis quantificáveis de produtos de decomposição em pH 3, foi necessário o uso de um maior intervalo de tempo em pH 3. Para comparação, foi analisada também uma solução de GSNO em pH 7, mantida a 40 °C por 3 dias, ao abrigo da luz. Os dados são apresentados na Figura 16.



**Figura 16A.** Cromatogramas de padrões de GSH (superior) e GSSG (inferior).



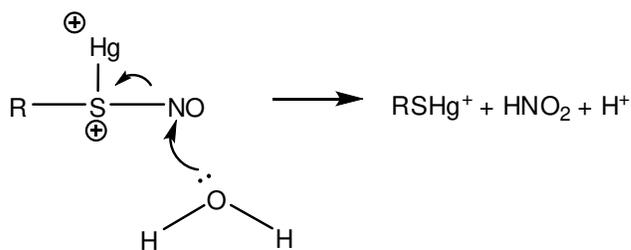
**Figura 16B.** Cromatogramas de padrão de GSNO (superior) e de solução de GSNO mantida em pH 13, a 25 °C, por 1 h (inferior).



**Figura 16C.** Cromatogramas de solução de GSNO mantida em pH 3, a 25 °C, por 3 dias (superior) e em pH 7, a 40 °C, por 3 dias (inferior).

Como pode ser observado a partir das Figuras 16 (A), (B) e (C), o método cromatográfico utilizado foi eficiente para a separação das espécies. É possível também observar que o padrão de GSH já contém GSSG como contaminante, e isso pode ser entendido pelo fato de que a oxidação de GSH a GSSG ocorre de forma espontânea. O padrão de GSNO também apresenta GSSG, que deve ser oriunda da GSSG já presente na GSH utilizada na síntese de GSNO. A presença de GSSG em solução de GSNO devido à presença prévia de GSSG na GSH já foi observada em estudos anteriores (Moran 2011). A Figura 16 (B) permite constatar a formação de GSH na solução de GSNO em pH 13, corroborando o mecanismo proposto no Esquema 3. Na Figura 16 (C) é possível observar um pico relativamente baixo de GSH na solução de pH 3, que corrobora o mecanismo proposto no Esquema 4. O fato do pico de GSH ter baixa intensidade em pH 3 pode ser explicado pela baixa decomposição da GSNO no período estudado de 3 dias, como pode ser constatado pela presença de um intenso pico relativo à GSNO. Diferentemente, a decomposição térmica parece ocorrer por um mecanismo distinto, já que o sinal de GSH não é detectado e apenas ocorre um pequeno aumento no pico de GSSG, conforme apresentado na Figura 16 (C). Essa formação de GSSG vai de encontro ao mecanismo proposto de decomposição térmica (de Oliveira 2002) que ocorre com a quebra homolítica da ligação S-NO, com liberação de NO gasoso e formação do dímero GSSG, segundo a equação (9). A decomposição térmica deve ocorrer também nas soluções de pH 3 e 13, mantidas a 25 °C, entretanto, em pHs diferentes de pH 7, o mecanismo de decomposição através de hidrólise deve ser majoritário, sobrepondo-se à contribuição da decomposição térmica. O mecanismo de quebra da ligação S-NO catalisada pela presença de íons  $H_3O^+$  já foi proposto para a SNAP: Al-Kaabi *et al.* (Al-Kaabi 1982) mostraram que a decomposição da SNAP é mais rápida em pHs ácidos e propõem que ocorra uma protonação rápida do nitrosotiól, provavelmente no átomo de enxofre, facilitando o ataque do nucleófilo e, portanto, catalisando a decomposição. Essa proposição pôde ser corroborada pelo mecanismo proposto para decomposição de SNAP catalisada por sais de mercúrio, apresentado por Swift (Swift 1997). Nesse artigo,

propõe-se que a decomposição de RSNO catalisada por mercúrio ocorre pela rápida formação de um complexo enxofre-mercúrio, que permite uma molécula de água atacar o complexo no átomo de nitrogênio, gerando ácido nitroso (Esquema 5), de forma semelhante ao que aconteceria na protonação do enxofre.

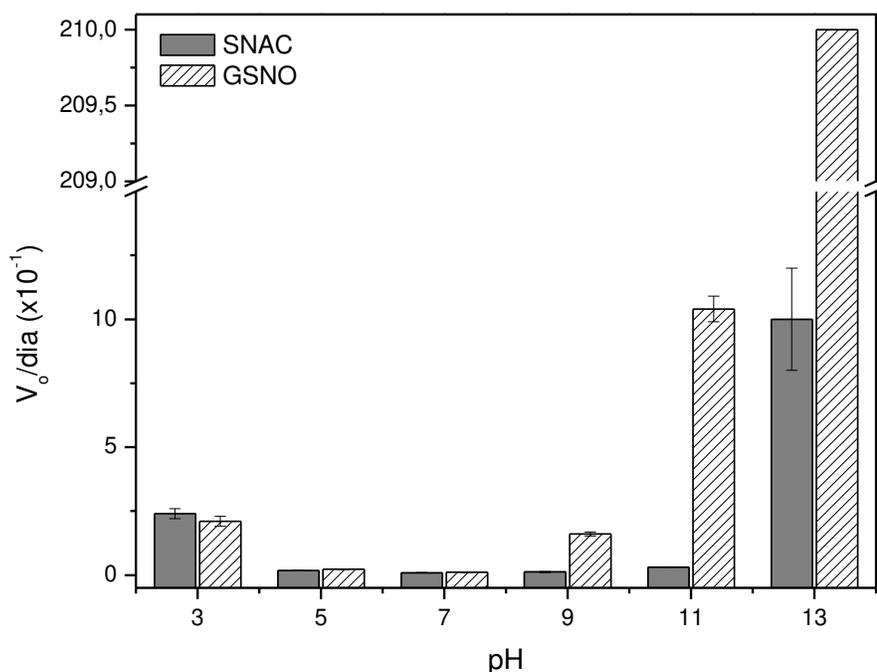


Esquema 5

Em estudo recente, Moran *et al.* (Moran 2011) investigaram o mecanismo de hidrólise ácido catalisado de GSNO, SNAC, CysNO, SNAP e S-nitroso-penicilamina (SNEP), o correspondente não acetilado da SNAP. As cinéticas de decomposição dos RSNOs foram seguidas em presença de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,75 M) e NaN<sub>3</sub>, um trap de ácido nitroso e, semelhantemente ao presente estudo, identificaram, através de HPLC, que o principal produto da hidrólise (mais de 90%) é o tiól correspondente do RSNO. Além disso, Moran *et al.* realizaram estudos computacionais e esses mostraram que a protonação do enxofre leva à formação de um complexo MeSH---NO<sup>+</sup>, que torna o NO altamente susceptível ao ataque nucleofílico e propõem que o ataque da água ocorre no nitrogênio do grupo SNO (Moran 2011), como proposto no presente estudo e em (Al-Kaabi 1982). Entretanto, os autores afirmam que o uso do trap de ácido nitroso é necessário para prevenir a re-nitrosação do RSH (Al-Kaabi 1982, Moran 2011). No presente estudo, não foi necessária a utilização de trap para a observação da hidrólise, e essa diferença deve ser resultado da diferença no intervalo de tempo seguido: Moran *et al.* seguiram as cinéticas de decomposição por 3 h, enquanto que no presente estudo o intervalo foi de até 18 d. Em um intervalo maior, o nitrito poderia ser oxidado à nitrato, o que

impossibilitaria a renitrosação do tiol e permitiria o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação do tiól.

Os três estudos citados (Al-Kaabi 1982, Swift 1997 e Moran 2011) propõem mecanismos bastante semelhantes ao proposto no presente estudo, em que a protonação do enxofre facilitaria o ataque pela molécula de água. Entretanto, nenhum estudo anterior, até onde sabemos, havia proposto que o meio básico poderia catalisar a decomposição de RSNOs pelo mecanismo de hidrólise e nenhum havia seguido a cinética de decomposição por intervalos tão longos. Os dados obtidos levam a concluir que o pH influencia a velocidade de decomposição tanto da GSNO quanto da SNAC, sendo que a estabilidade destes RSNOs é maior em meio neutro. A decomposição se torna mais rápida conforme o pH se afasta da neutralidade, conforme demonstrado no perfil de variação da velocidade inicial de decomposição em função do pH da solução, apresentado na Figura 17.



**Figura 17.** Velocidades iniciais de decomposição de soluções de GSNO e SNAC ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , no escuro, em presença de EDTA 0.1%) em função do pH.

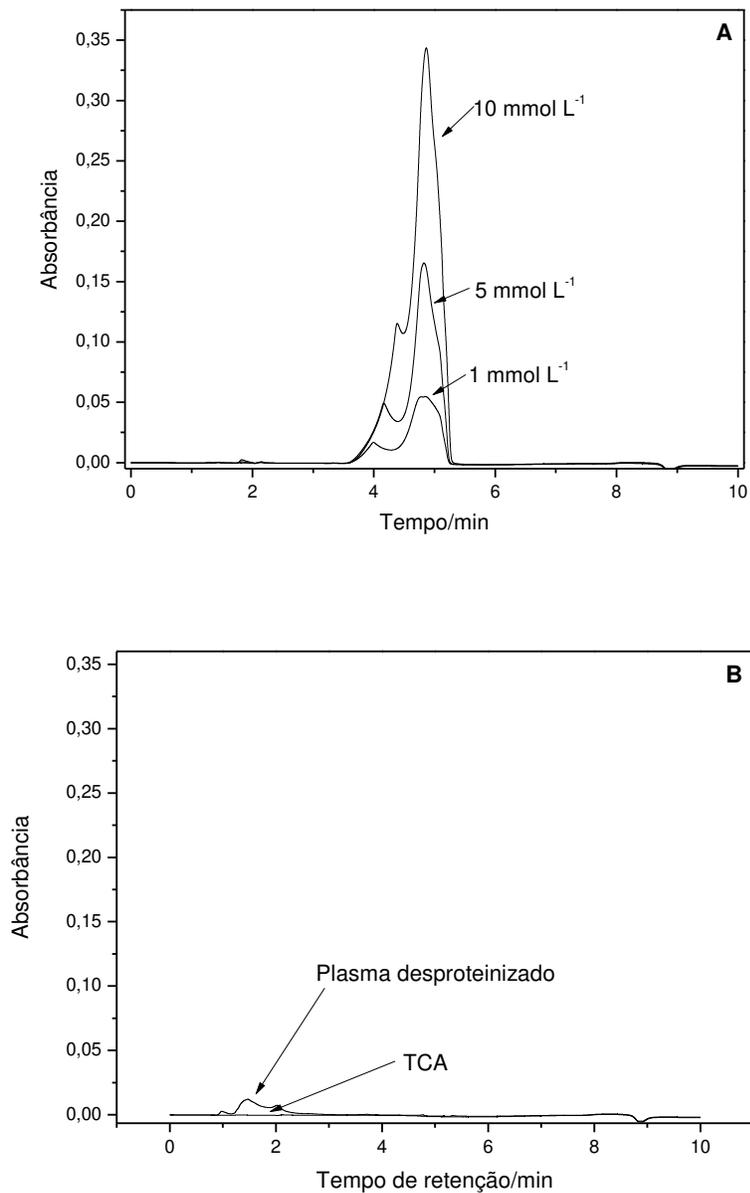
Apesar de não ter sido observada a formação do intermediário com banda de absorção em  $420 \text{ nm}$  para a solução de SNAC, os dados cinéticos levam a crer que a GSNO e SNAC se decompõem através de mecanismos similares nos diferentes pHs. A não observação do intermediário para a SNAC pode ser explicada pela decomposição mais lenta da SNAC em pH 13 (a velocidade inicial de decomposição de GSNO em pH 13 é aproximadamente 20 vezes maior do que para SNAC no mesmo pH – Figura 17), o que pode fazer com que o intermediário não se acumule em concentração suficiente para ser observado. Da mesma forma, o intermediário da GSNO não é observado em pH 11 ou 9, possivelmente pelo mesmo motivo, já que em pH 11 a velocidade inicial de decomposição é, semelhantemente à velocidade inicial de decomposição da SNAC em pH 13), 20 vezes menor do que a velocidade inicial da GSNO em pH 13.

Os dados obtidos permitem afirmar que em pH neutro, a GSNO e a SNAC são relativamente estáveis e que a hidrólise da ligação S-NO é um fator mais importante na decomposição da GSNO e SNAC, do que a quebra homolítica da ligação S-NO. Essa constatação vai de encontro com o estudo de Bartberger *et al.* (Bartberger 2001), que calcularam a energia de dissociação da ligação S-NO teoricamente e mostraram que os parâmetros de ativação previstos são muito altos e proibitivos para que a quebra homolítica espontânea pudesse ocorrer em condições biológicas relevantes. A partir das energias livres de ativação para a homólise de nitrosotióis primários, a meia vida prevista para a ligação S-N é de 15,3 anos a 25 °C e 2,1 anos a 37 °C, refutando a sugestão de que vias homolíticas poderiam estar envolvidas na decomposição de RSNOs em condições fisiológicas (Bartberger 2001).

De acordo com os dados obtidos pôde-se concluir que, durante o período do experimento de câmara gástrica (10 min de aplicação) e de dosagem de metabólitos plasmáticos (1 h entre a administração e a retirada de sangue), os níveis de decomposição de GSNO e SNAC são irrelevantes, se apenas o mecanismo de hidrólise ou decomposição térmica fossem levados em consideração. Desta forma, uma próxima questão a ser abordada é se os RSNOs administrados por via orogástrica atingem a circulação sistêmica como moléculas íntegras ou se apenas seus metabólitos entram na circulação sistêmica. Para abordar esta questão neste trabalho, foram feitos estudos da estabilidade de RSNOs na presença de sangue e tecidos.

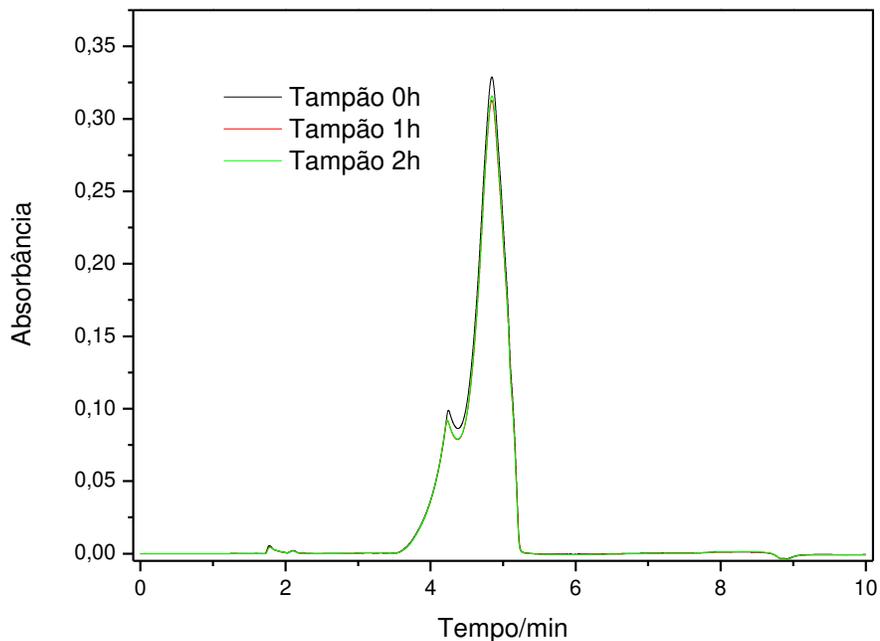
#### **4.4. Metabolismo de RSNOs em sangue e tecidos**

Para a dosagem de GSNO no plasma, desenvolveu-se um método de detecção de GSNO utilizando-se UPLC. A curva de calibração foi obtida adicionando-se concentrações conhecidas de GSNO em amostra de plasma humano e os controles foram feitos com o plasma desproteínizado sem adição de GSNO e com o ácido tricloroacético usado no processo de desproteínização, conforme apresentado na Figura 18.

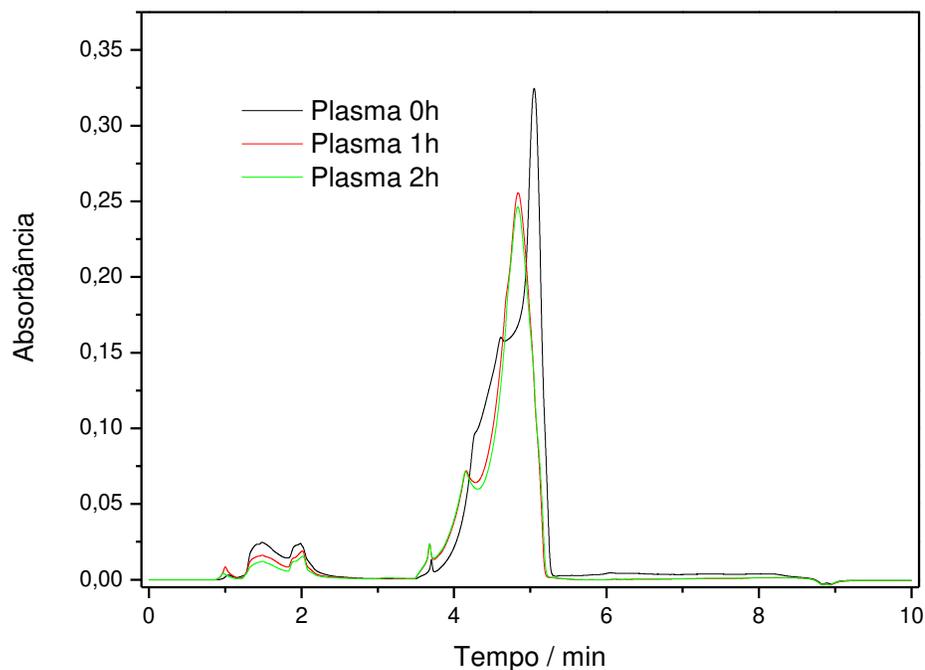


**Figura 18.** Cromatogramas obtidos para a curva de calibração de GSNO em plasma humano: o plasma recebeu alíquotas de solução de GSNO de forma a atingir as concentrações de 1, 5 e 10 mmol L<sup>-1</sup>, e foi desproteínizado com adição de TCA (A); e cromatogramas dos controles: solução de TCA utilizada para na desproteínização e plasma humano sem adição de GSNO (as setas têm apenas a finalidade de indicar os traços dos dois cromatogramas) (B).

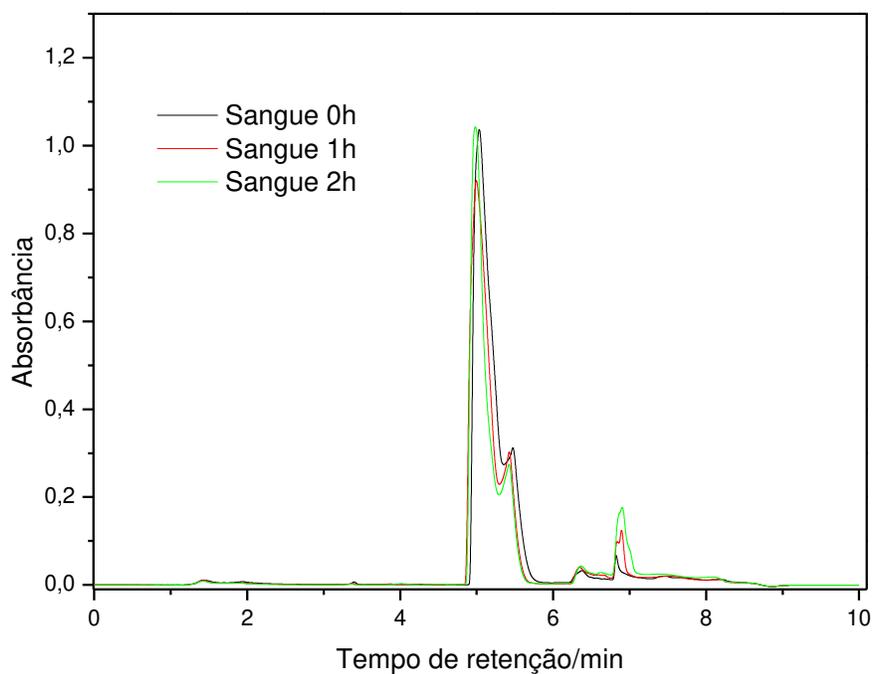
Como pode ser observado a partir da Figura 18, o método desenvolvido permite a detecção de GSNO sem interferência dos componentes do plasma. Uma vez que diversos fatores podem influenciar a decomposição de RSNOs, avaliou-se a estabilidade de GSNO em plasma e em sangue por um intervalo de 2 h, para o desenvolvimento de um protocolo que permitisse a manipulação das amostras sem perda da GSNO durante esse processo. Amostras de tampão fosfato pH 7 (controle), plasma e sangue humano receberam quantidades conhecidas de GSNO e foram analisadas por UPLC. Os dados são apresentados nas Figuras 19, 20, 21 e 22.



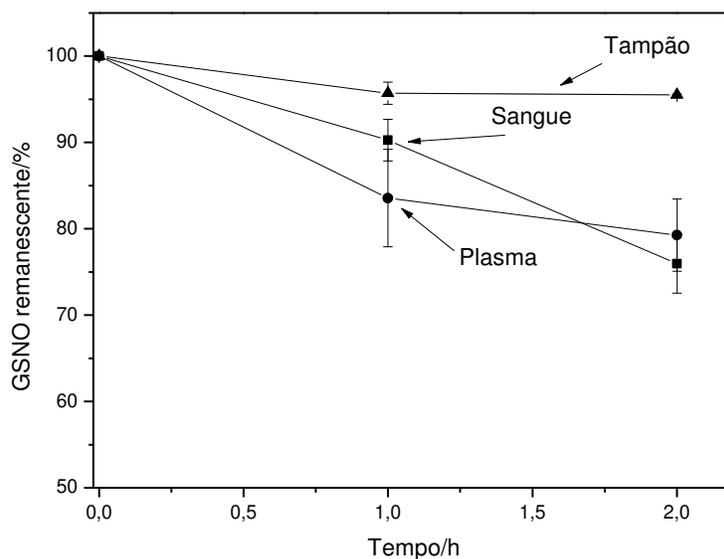
**Figura 19.** Cromatogramas representativos obtidos durante o ensaio de estabilidade da GSNO ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) mantida em tampão fosfato a  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 h. Essa amostra recebeu adição de TCA na hora da leitura e foi centrifugada, para simular as operações seguidas para a desproteinização das amostras de plasma e sangue total.



**Figura 20.** Cromatogramas representativos obtidos durante o ensaio de estabilidade da GSNO ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) mantida em plasma humano a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h. O plasma humano foi separado e recebeu alíquota de solução de GSNO de forma a atingir a concentração de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , e foi desproteíndizado com adição de TCA antes da medida por UPLC.



**Figura 21.** Cromatogramas representativos obtidos durante o ensaio de estabilidade da GSNO ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) mantida em sangue humano a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h. O sangue humano recebeu alíquota de solução de GSNO de forma a atingir a concentração de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , e após 0, 1 e 2 h, o plasma foi separado e desproteinizado com adição de TCA antes da medida por UPLC.

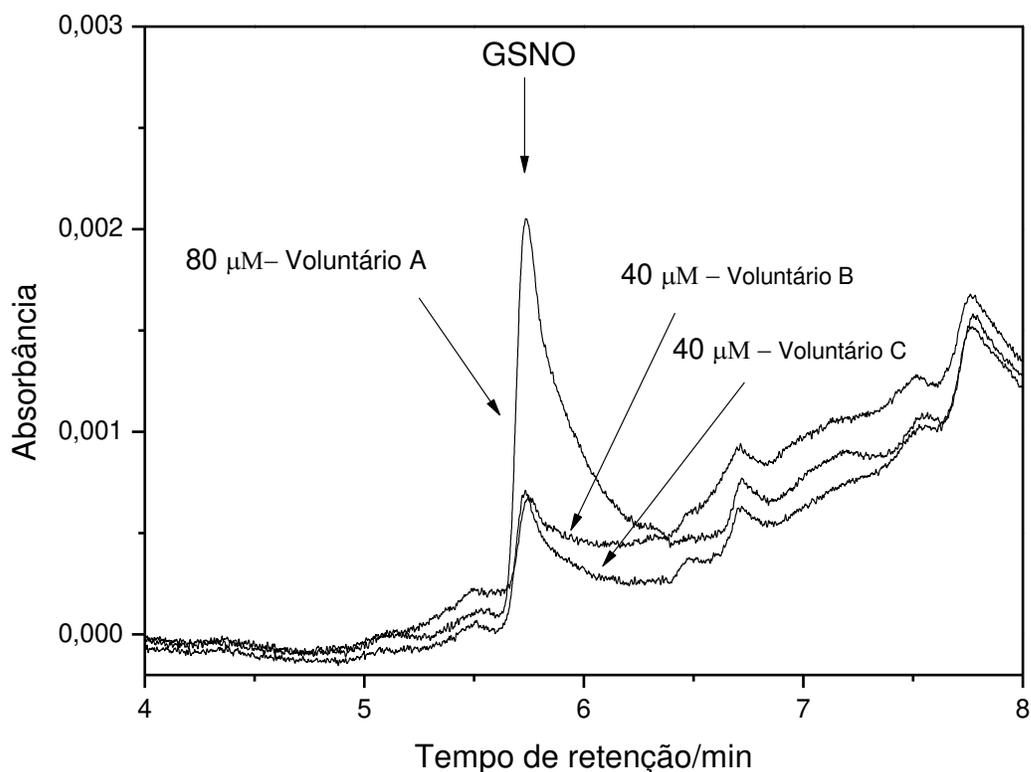


**Figura 22.** Estabilidade de GSNO em tampão fosfato, sangue e plasma humano, mantidos a 37 °C, quantificada por UPLC.

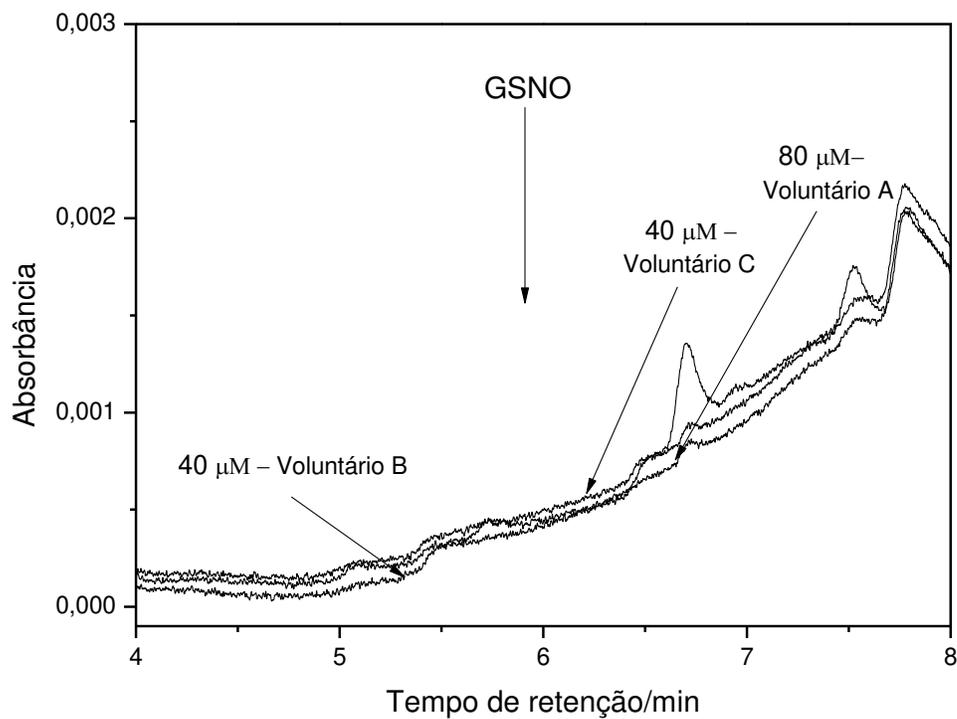
Como pode ser observado a partir das Figuras 19, 20, 21 e 22, a decomposição da GSNO foi maior em sangue e em plasma quando comparada ao tampão. Entretanto, os dados permitem concluir que ainda assim é possível manipular as amostras de sangue e plasma sem perder uma proporção relevante do sinal de GSNO, uma vez que a manipulação das amostras para a detecção em UPLC leva em torno de 15 min, e a decomposição de GSNO em sangue ou plasma é aproximadamente 10% após 1 h. Avaliou-se também o limite de detecção da GSNO no plasma e em sangue na técnica de UPLC e o valor mínimo encontrado foi de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . De acordo com os dados da Figura 10, o aumento nos níveis plasmáticos de  $\text{NO}_x^-$  obtido com a administração de GSNO na dose de 365  $\mu\text{mol/kg}$  foi em torno de 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Uma vez que o limite de detecção da técnica observado foi 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , pode-se concluir que, se pelo menos 13%

do aumento nos níveis plasmáticos de  $\text{NO}_x^-$  observado fosse causado pela presença de GSNO no sangue, a técnica de UPLC seria capaz de detectar essa mudança nos níveis de GSNO.

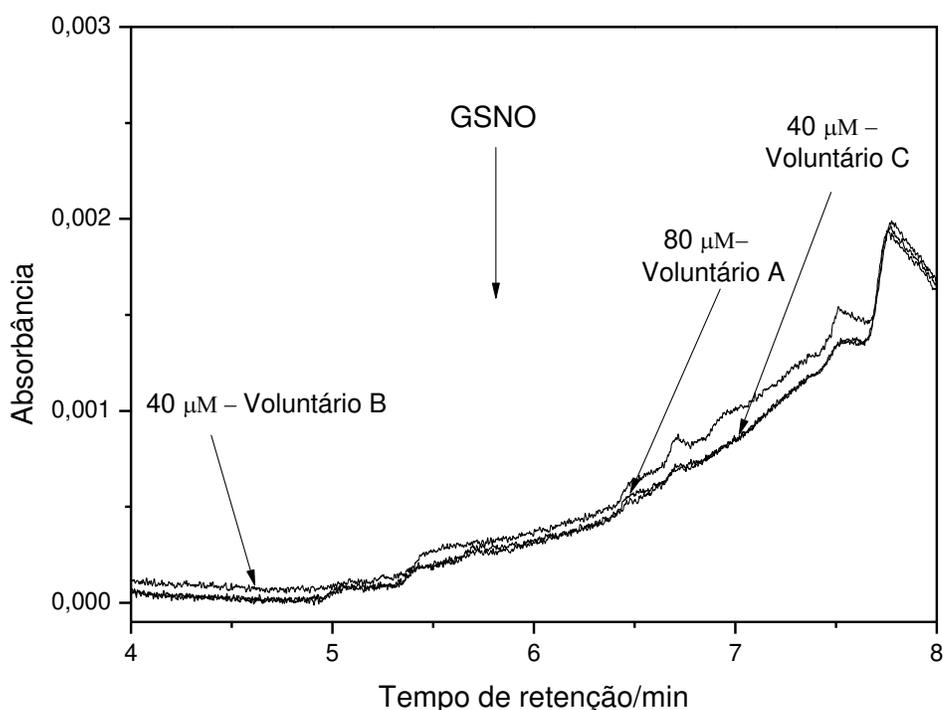
Para avaliar-se se a GSNO administrada pela via orogátrica atingiria a circulação sistêmica, administrou-se por gavagem  $365 \mu\text{mol/kg}$  de GSNO a camundongos Swiss ( $n = 5$ ) e após 1 h da administração, amostras de sangue foram retiradas e imediatamente analisadas. Não foi possível observar sinal detectável de GSNO em nenhuma das amostras analisadas, sugerindo que a quantidade de GSNO, se presente nas amostras, era menor do que  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  e que o aumento de  $\text{NO}_x^-$  plasmático observado na Figura 10 deve ser resultado da presença de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  e não de GSNO, ou que a GSNO teria se decompôs no sangue durante a manipulação. Os dados apresentados na Figura 22 mostram que apenas aproximadamente 10% da GSNO foi perdida quando incubada em plasma ou sangue por 1 h, o que contraria a hipótese de decomposição durante a manipulação. Entretanto, esses dados foram obtidos para a GSNO na concentração  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ . Supôs-se então que essa concentração de GSNO utilizada nos ensaios de estabilidade ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) pode estar muito acima dos níveis fisiológicos e os possíveis fatores responsáveis pela decomposição da GSNO no sangue ou plasma, como enzimas, podem estar saturados e assim não serem capazes decompor a GSNO, levando à conclusão errônea de que a GSNO é estável em plasma ou sangue. De fato, a concentração de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  é em torno de 50 vezes mais alta do que os níveis de  $\text{NO}_x^-$  encontrados no plasma dos roedores após a administração de GSNO (Figura 10). Desta forma, o ensaio de estabilidade foi repetido para GSNO nas concentrações de 80 e  $40 \mu\text{mol L}^{-1}$  e os cromatogramas obtidos imediatamente após, 1 e 2h depois da adição de GSNO são apresentados nas Figuras 23, 24 e 25, respectivamente.



**Figura 23.** Cromatogramas de sangue humano contendo GSNO ( $40$  e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). As amostras de sangue humano receberam alíquotas de solução de GSNO de forma a atingir as concentrações de  $40$  e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  e, imediatamente após a adição, o plasma foi separado e desproteínezado com adição de TCA antes da medida por UPLC.



**Figura 24.** Cromatogramas de sangue humano contendo GSNO ( $40$  e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), mantidos a  $37^\circ\text{C}$  por  $1$  h. As amostras de sangue humano receberam alíquotas de solução de GSNO de forma a atingir as concentrações de  $40$  e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  e, após  $1$ h, o plasma foi separado e desproteinizado com adição de TCA antes da medida por UPLC.



**Figura 25.** Cromatogramas de sangue humano contendo GSNO (40 e 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), mantidos a 37 °C por 2 h. As amostras de sangue humano receberam alíquotas de solução de GSNO de forma a atingir as concentrações de 40 e 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e, após 2h, o plasma foi separado e desproteinizado com adição de TCA antes da medida por UPLC.

Como pode ser observado a partir da Figura 23, o sinal da GSNO nas concentrações 40 e 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  no tempo zero é intenso e tem uma relação sinal-ruído que possibilita o acompanhamento do pico. Entretanto, a partir de 1 h de incubação, não há mais sinal de GSNO (Figura 24) e, conseqüentemente, também não há depois de 2 h (Figura 25). Esses dados mostram que, considerando os limites de detecção, pelo menos 87% da GSNO adicionada sobre o sangue nas concentrações 40 e 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi consumida em 1 h, diferentemente do que foi observado nos experimentos que utilizavam GSNO na concentração alta de 10  $\text{mmol L}^{-1}$  (Figura 22). A comparação das cinéticas de decomposição da GSNO em sangue nos dois experimentos realizados sugere que existe uma via de decomposição desse RSNO no sangue que tem efeito em concentrações

micromolares, mas que perde a relevância em concentrações milimolares, possivelmente pela saturação das espécies responsáveis pela decomposição, como enzimas. Sendo assim, conclui-se que, se a GSNO administrada oralmente passar íntegra pela mucosa do estômago, ao entrar em contato com o sangue na circulação, ela deve ser decomposta praticamente por completo em, pelo menos, 1h.

Essa dificuldade em aferir os níveis plasmáticos de GSNO e sua estabilidade em fluídos biológicos encontrada no presente estudo soma-se à discussão na literatura sobre a possível presença de GSNO ou outros RSNOs de baixa massa molar em condições fisiológicas, suas estabilidades, especialmente em sangue, e seus papéis como transportadores de NO. Apesar de diversos estudos já terem sido realizados sobre as ações fisiológicas dos RSNOs, a determinação desses compostos em amostras biológicas ainda representa um desafio analítico, uma vez que não há procedimentos validados para a coleta e preservação das amostras nem material de referência certificado; os RSNOs podem ser intrinsecamente instáveis. Assim a presença de RSNOs em fluidos biológicos em concentrações nanomolares (MacArthur 2007, Tsikas 2008, Bramanti 2011), pode explicar a ocorrência dos dados conflitantes na literatura. Os RSNOs já foram quantificados por diversas técnicas como quimiluminescência, espectrofotometria, HPLC, cromatografia gasosa ou líquida associada a espectrometria de massa, fluorimetria, e métodos imunológicos em fluidos biológicos; entretanto, nenhum estudo conseguiu estabelecer definitivamente os níveis de ocorrência de RSNOs - em plasma humano, por exemplo, já foram reportados valores de RSNOs tão dispares quanto  $7 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $28 \text{ nmol L}^{-1}$  (Giustarini 2007, MacArthur 2007) – e frequentemente, se pode encontrar estudos suportando a tese de que as publicações anteriores foram afetadas por artefatos ou pelo uso de métodos não apropriados (Wu 2008, Giustarini 2007).

Apesar de alguns autores responsabilizarem a instabilidade intrínseca dos RSNOs (Tsikas 2008), esse não deve ser o único fator responsável pelos problemas de detecção dessas moléculas, uma vez que, conforme demonstrado no item 4.3, a GSNO é estável quando controlados fatores como pH, presença de íons metálicos e luz, apresentando um

nível de decomposição menor do que 5% após 3 dias (Figura 12). Então, a rápida decomposição da GSNO no sangue deve ser resultado de algum processo característico dos meios biológicos. De fato, estudos anteriores reportaram altas velocidades de decomposição para RSNOs quando em sangue ou plasma ou em presença de células. Shah *et al.* (Shah 2003) avaliaram o efeito da exposição de plaquetas à GSNO e observaram que a agregação plaquetária induzida por trombina foi inibida, mas, em apenas 30 s de exposição, de 66 a 75% da GSNO foi consumida e apenas 20-25% dessa perda pôde ser correlacionada com a liberação de NO. O uso de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), um bloqueador de tiol impermeável à célula, bloqueou totalmente essa decomposição mediada pelas plaquetas, sugerindo que a sinalização de RSNOs ocorre via transferência de grupos nitroso de RSNOs para tióis celulares exofaciais (Shah 2003). Além da transnitrosação de tióis superficiais celulares, uma outra hipótese para o rápido decaimento de RSNOs de baixa massa molar em sangue ou plasma seria pela transnitrosação da albumina, formando a AlbsNO. Jourd *et al.* (Jourd 2000) mostraram que a incubação de CySNO ou GSNO ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com plasma humano por 10-15 min levou à decomposição de mais de 90 % do RSNO e praticamente todo o NO pôde ser recuperado como AlbsNO, sugerindo o envolvimento de uma reação de transnitrosação direta. De fato, a decomposição da GSNO foi inibida em mais de 80% pela ultra-filtração das amostras de plasma por um filtro de 10.000 Da de massa molecular antes da adição de GSNO (Jourd 2000).

A formação de nitrosotióis de alta massa molar também foi observada por Zhang *et al.* (Zhang 2004), que trataram macrófagos com lipopolissacarídeo (LPS) para estimular a formação de NO e espécies relacionadas, e averiguaram que mais de 90% dos RSNOs formados tinham massa molecular superior a 3.000 Da. Esse dado poderia ser resultado de duas vias, a saber: ou os RSNOs estavam na sua maioria associados a tióis de grande massa molar, ou os RSNOs de baixa massa estavam sendo perdidos durante o processo de lisagem da célula. Para averiguar qual dessas vias seria a responsável pelos resultados obtidos, eles expuseram GSNO, SNAP e AlbsNO ao conteúdo da lisagem

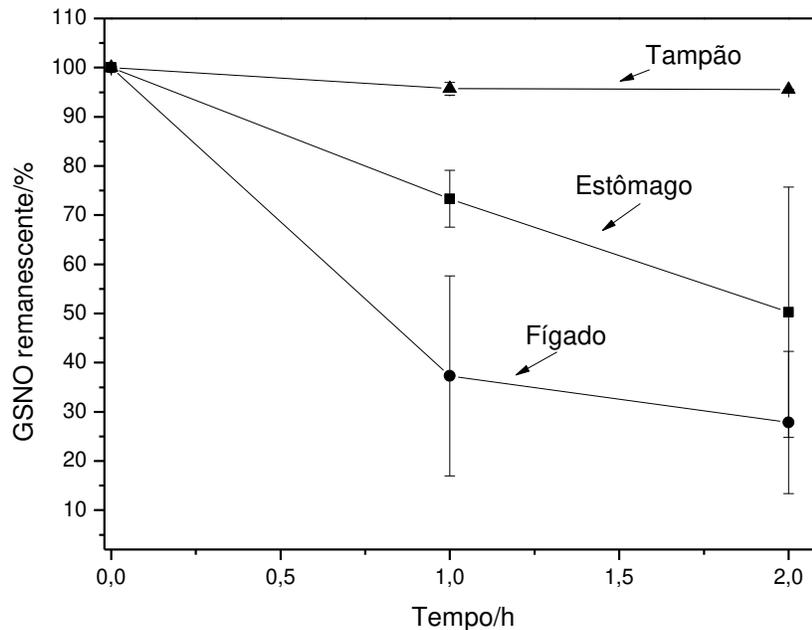
celular no intervalo do procedimento para a lise celular e conseguiram recuperar 72% de SNAP e 100% de ALbSNO, enquanto que os níveis recuperados de GSNO variaram entre 30 a 80% por experimento. Diante desses dados, os autores concluíram que a GSNO é variavelmente instável em lisado celular e que a presença de uma atividade de decomposição eficiente torna pouco provável que as células possam manter um nível de GSNO detectável (Zhang 2004).

De fato, existem enzimas que poderiam ser responsáveis por essa alta decomposição da GSNO, de forma paralela à decomposição por transnitrosação da albumina (Hedberg 2003, Liu 2001). Liu *et al.* (Liu 2001) identificaram uma enzima que consome GSNO de forma dependente de nicotiamida adenina dinucleotídeo (NADH), a GSNO reductase (GSNOR), altamente específica para esse RSNO. Essa enzima parece ter importância fisiológica, uma vez que alterações genéticas na GSNOR estariam associadas à asma infantil e atopia em humanos (Wu 2007), e a deleção do gene dessa enzima em camundongos resultou em significativa diminuição de linfócitos T e B (Yang 2010) e em aumento substancial nos danos teciduais e mortalidade após desafio endotóxico (Liu 2004).

Esses estudos sugerem que a GSNO, e outros RSNOs de baixa massa molar, não são estáveis quando em fluidos biológicos, podendo impossibilitar até mesmo sua detecção. Entretanto, outros estudos defendem a existência de estoques de RSNOs, como a GSNO, em humanos, onde teriam papéis fisiológicos (Taubert 2007, Ng 2007).

A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que o tempo de permanência da GSNO no sangue, em concentrações micromolares, não passa de 1 h. Entretanto, mesmo com baixa estabilidade em sangue, seria possível que a GSNO administrada por gavagem aos camundongos tivesse permanecido como RSNO durante o seu transporte pela mucosa gástrica, atingido a corrente sanguínea como GSNO e sido decomposta no sangue; ou que tivesse já sido decomposta em contato com a mucosa estomacal e apenas os seus metabólitos tivessem atingido a corrente sanguínea; ou ainda que a GSNO tivesse atingido a corrente sanguínea pela permeação paracelular da mucosa intestinal e chegado

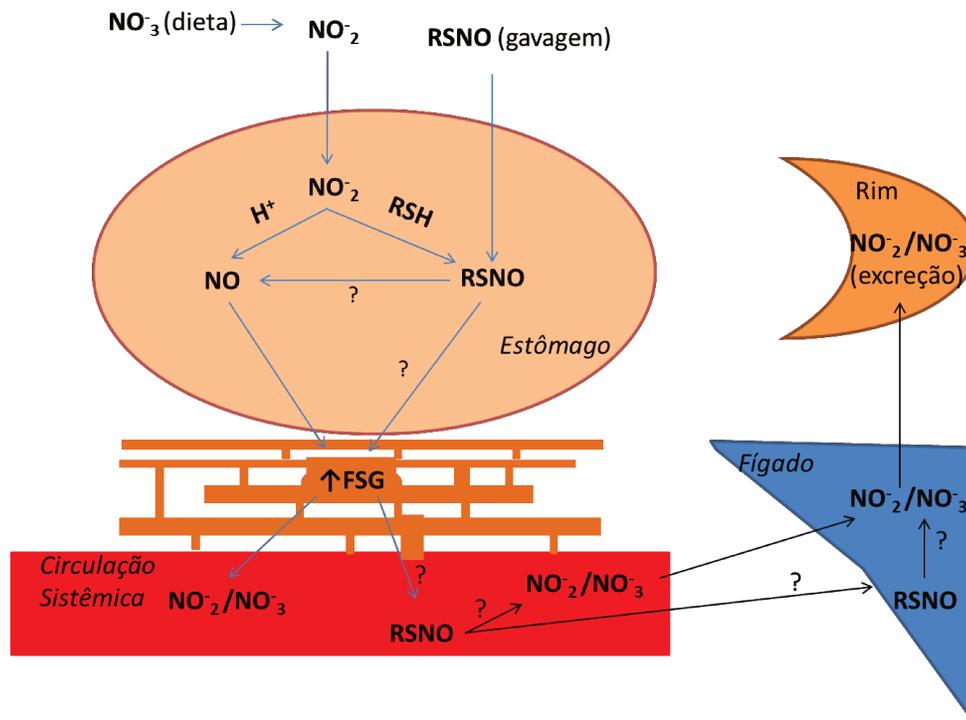
até o fígado, onde teria sido decomposta. Para investigar a relevância dessas vias de decomposição, avaliou-se a decomposição de GSNO em lisados de estômago e fígado de ratos, e os dados são apresentados na Fig 26.



**Figura 26.** Perfil de decomposição da GSNO em lisado de estomago, fígado e em tampão de extração (controle), quantificada por quimiluminescência.

Como pode ser observado a partir da Figura 26, a decomposição da GSNO ocorre mais rapidamente em presença do lisado de fígado e de estômago do que apenas no tampão de extração. Mas, ainda que a decomposição seja acelerada na presença das células estomacais, os dados sugerem que a GSNO pode exercer o seu efeito na mucosa gástrica como molécula íntegra e não através de seus metabolitos, uma vez que o tempo necessário para que o efeito da GSNO no FSG seja máximo é de aproximadamente 7 min (Figura 6) e, nesse período, ter-se-ia mais de 80% de GSNO remanescente (Figura 26). Após a administração gástrica, uma fração da GSNO administrada poderia ter passado para o intestino sem decompor, como pode ser inferido a partir dos dados apresentados

na Figura 26, uma vez que o tempo médio de esvaziamento do estômago varia entre 0,5-2 h (Collins 1983) e, nesse intervalo de tempo, ainda há presença de GSNO. No intestino delgado, onde o pH é em torno de 6,5 (Horter 2001), a maior parte da GSNO estaria com carga negativa (-1) (Krezel 2004) e, apesar de estar carregada negativamente, a GSNO poderia ter permeado o intestino através das junções aquosas entre células adjacentes (paracelular), por ser uma molécula relativamente pequena (Egan 2002), atingindo a circulação. A GSNO poderia então ter sido decomposta no sangue ou ter atingido o fígado ainda intacta e ter sido decomposta nesse órgão, uma vez que esse parece ter maior efeito sobre a decomposição da GSNO do que o estômago, conforme observado na Figura 26. Os dados obtidos permitem supor que a estabilidade da GSNO é bem maior quando em contato com as células estomacais do que quando em contato com o sangue, entretanto, não é possível concluir se o aumento nos níveis plasmáticos observados após a administração orogástrica de GSNO (Figura 11) é causado pela permeação da GSNO pela mucosa gástrica com subsequente decomposição dessa a  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  no sangue ou no fígado, ou se a GSNO se decompõe a  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  durante o aumento do FSG e apenas esses ânions atingem a circulação sanguínea. Essas mesmas questões podem ser aplicadas ao destino dos RSNOs formados endogenamente no ambiente gástrico após a ingestão de nitrato na dieta (Figura 27).



**Figura 27.** Esquema das possíveis vias de absorção gástrica, metabolização e distribuição sistêmica de RSNOs e seus metabólitos. O RSNO, administrado exogenamente pela via orogástrica ou formada endogenamente no estômago pela reação do RSH com o nitrito proveniente do nitrato dietético, atinge o estômago onde provoca o aumento do fluxo sanguíneo gástrico por ação direta ou através da liberação de NO. O RSNO pode atravessar a mucosa gástrica intacta ou sofrer decomposição, atingindo a circulação sistêmica como RSNO ou já na forma metabolizada de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ . Em presença de sangue, o RSNO pode ser metabolizado a  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  ou atingir o fígado, onde é metabolizado. O  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  resultante da decomposição circula pelo corpo através da circulação e é excretado pelos rins.

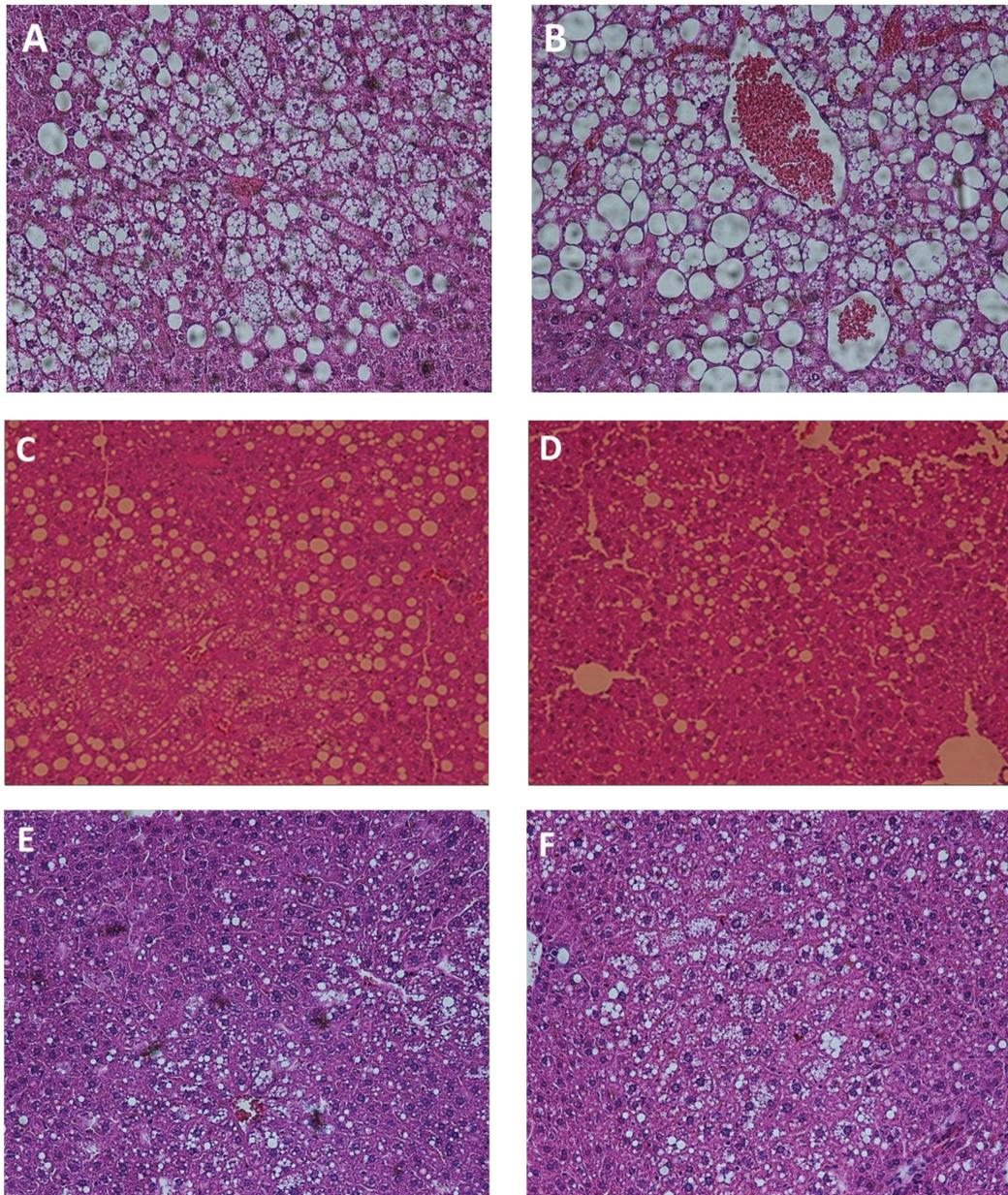
Os dados obtidos sugerem que, ainda que a GSNO atinja a circulação sanguínea após a administração oral ou após a sua formação no meio gástrico, o tempo de vida desse RSNO em sangue é menor do que 1 h, o que limita muito o seu espectro de ação sistêmica. Sendo assim, é provável que GSNO administrada pela via orogástrica se mantenha íntegra para exercer suas ações apenas na mucosa estomacal, sem ter

relevância sistêmica. Ainda assim, a presença de RSNOs no sistema gástrico pode ter uma relevância fisiológica, uma vez que a administração de nitrato leva a aumento de RSNO na saliva (Lundberg 2004) e no fluido gástrico (Richardson 2002a) e resulta na diminuição da pressão sanguínea e na diminuição da agregação plaquetária (Webb 2008 e Richardson 2002a) sem levar a alteração nos níveis plasmáticos de SNO (Lundberg 2004 e Richardson 2000a).

Esses dados sugerem que as ações de RSNOs administrados pela via orogástrica podem ocorrer sem resultar em alterações plasmáticas detectáveis; então, o efeito do tratamento com SNAC e GSNO na dose de 7  $\mu\text{mol/kg/dia}$  pela via orogástrica no ganho de massa e na DHGNA em modelos animais foi investigado.

#### **4.5. Efeitos das administrações orogástricas de SNAC e GSNO em modelos animais de doença do fígado gorduroso e obesidade induzida por dieta**

Foram utilizados 3 modelos animais de esteatose hepática: camundongos Swiss submetidos à dieta hiperlipídica (Cintra 2008), camundongos ob/ob submetidos à dieta hiperlipídica (de Oliveira 2008), e camundongos Swiss submetidos à dieta deficiente em metionina e colina (Rinella 2008). A Figura 28 apresenta figuras representativas das histologias dos animais dos grupos controle e tratado com administração orogástrica de SNAC na dose de 7  $\mu\text{mol/kg/dia}$ .



**Figura 28.** Histologias representativas dos fígados de camundongos ob/ob alimentados com dieta HFD controle (A) e tratado com SNAC (B); camundongos Swiss alimentados com HFD controle (C) e tratado com SNAC (D); e camundongos Swiss alimentados com dieta MCD controle (E) e tratado com SNAC (F). Aumento 200X.

A partir da Figura 28, pode-se observar que não há diferença no grau de esteatose dos grupos de animais controle e tratado. As lâminas foram examinadas por um

pesquisador cegado em relação à identidade dos animais, e concluiu-se que não há diferença entre os grupos. A dose utilizada foi baseada nos artigos anteriores que demonstravam efeito do tratamento com SNAC na prevenção da esteatose hepática (de Oliveira 2006a, 2006b, 2007 e 2008).

Uma possível explicação para a não observação de efeitos protetores da administração de SNAC em relação aos estudos publicados por de Oliveira é a diferença nos modelos animais utilizados no presente estudo e nos utilizados por de Oliveira (Tabela 2).

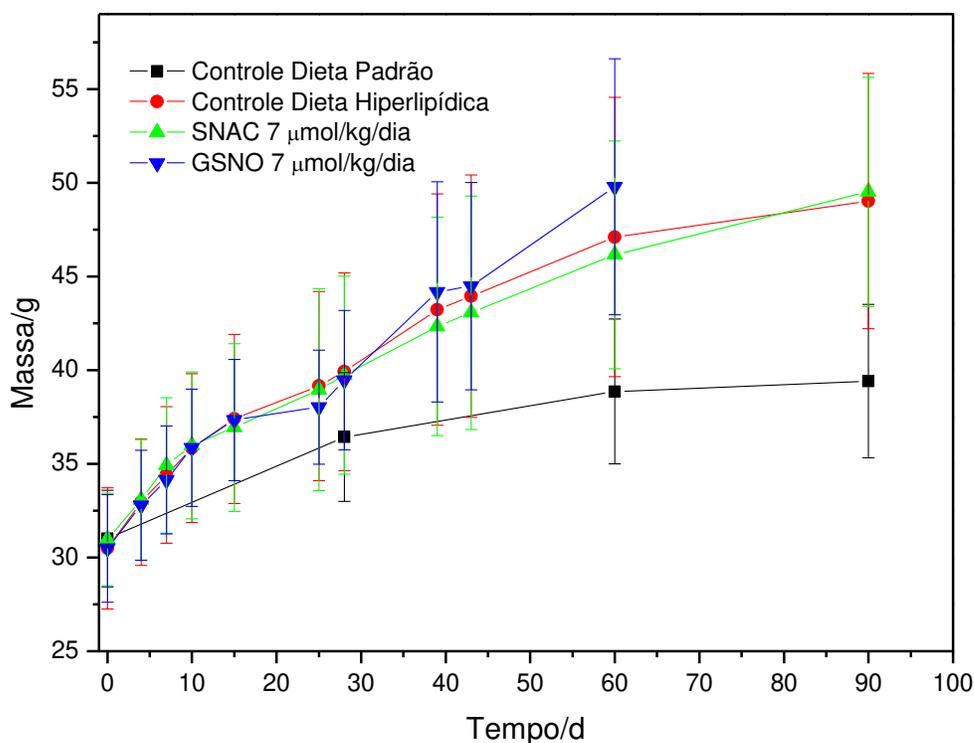
**Tabela 2.** Comparação entre os experimentos realizados em relação ao modelo animal e dieta utilizada no presente estudo (Experimentos 1, 2 e 3) e os experimentos realizados em estudos anteriores, referidos na tabela pelo autor e ano da publicação.

	Animal	Dieta
Experimento 1	Camundongos Swiss	HFD (banha de porco)
Experimento 2	Camundongos ob/ob	HFD (banha de porco)
Oliveira 2007	Camundongos ob/ob	MCD
Oliveira 2008	Camundongos ob/ob	HFD (banha de porco e gema de ovo) e MCD
Experimento 3	Camundongos Swiss	MCD
Oliveira 2006	Ratos Wistar	Deficiente em colina

Como pode ser observado a partir dos dados da Tabela 2, no presente estudo realizaram-se 3 experimentos, sendo que em todos pelo menos um parâmetro (linhagem de animal ou tipo de dieta) foi alterado em relação aos relatos da literatura, o que poderia ser responsável pela diferença nos resultados. É possível que os efeitos protetores no

desenvolvimento da DHGNA observados por de Oliveira *et al.* sejam associados estritamente aos modelos utilizados nos estudos publicados (de Oliveira 2006a, 2006b, 2007 e 2008).

Além do desenvolvimento da DHGNA, foi reportado também que o tratamento com administração de SNAC a camundongos ob/ob alimentados com HFD ou MCD levou a um menor ganho de massa desses animais em relação aos animais controle (Oliveira 2008). Assim, a massa dos camundongos Swiss submetidos à HFD tratados oralmente com GSNO ou SNAC e os animais controles alimentados com HFD ou dieta padrão foi acompanhada (Figura 29).



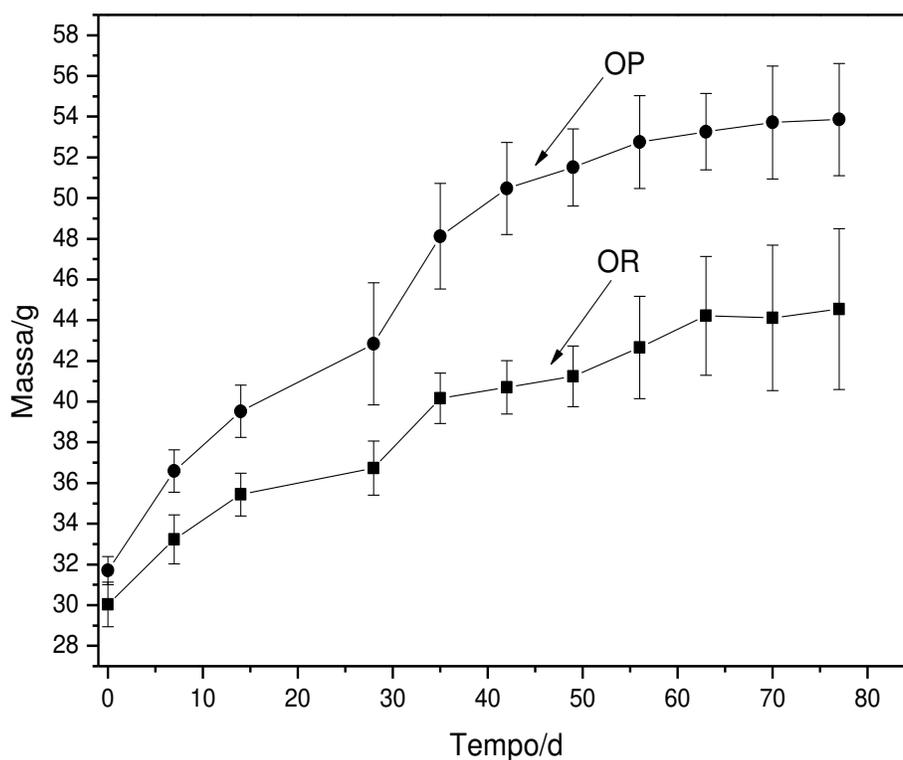
**Figura 29.** Massa dos camundongos Swiss submetidos à dieta hiperlipídica tratados com solução de GSNO ou SNAC (7,3 µmol/kg/dia) ou com tampão (controle).

Como pode ser observado a partir da Figura 29, o tratamento com GSNO ou SNAC não apresentou efeito no ganho de massa durante o experimento ( $p = 0,9485$ ). Em estudo anterior, de Oliveira *et al.* haviam observado diminuição na massa com o tratamento em camundongos ob/ob, que são de uma linhagem isogênica (Oliveira 2008), e no presente estudo foram utilizados camundongos Swiss, que são de uma linhagem heterogênica. Essa mudança no uso das linhagens pode ter influenciado os resultados, impossibilitando a observação de algum efeito da SNAC ou da GSNO no ganho de massa, uma vez que, conforme sugeriu-se ocorreu nos experimentos com DHGNA, os resultados observados por de Oliveira *et al.* poderiam estar associados estritamente aos modelos utilizados nos estudos publicados.

Durante o experimento com os camundongos Swiss observou-se que esses animais apresentavam um perfil de ganho de massa quando expostos à dieta hiperlipídica não homogêneo, o que pode ser entendido pelo fato da linhagem ser não isogênica e essa heterogeneidade foi investigada.

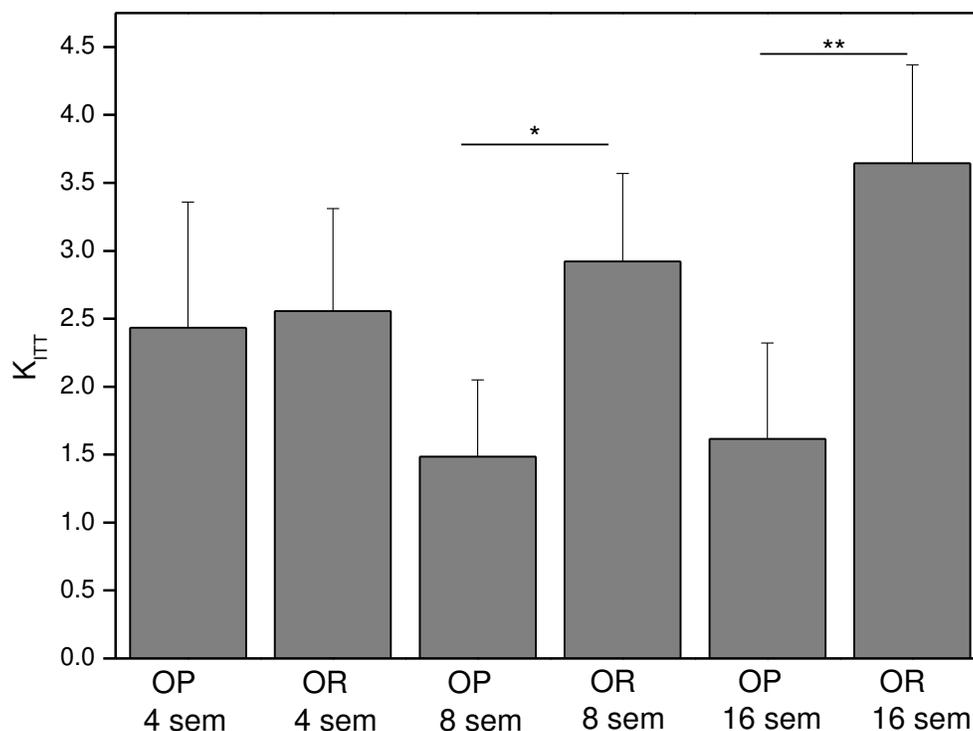
#### **4.6. Propensão e Resistência à obesidade em camundongos Swiss expostos à dieta hiperlipídica**

A exposição de camundongos Swiss à dieta hiperlipídica revelou um perfil de ganho de massa heterogêneo, onde é possível distinguir animais que ganham mais massa, chamados “propensos” ao desenvolvimento da obesidade (OP), e animais que ganham menos massa, chamados “resistentes” ao desenvolvimento da obesidade (OR). A Figura 30 apresenta a curva de ganho de massa durante 11 semanas de dieta para estes dois grupos.



**Figura 30.** Variação da massa de camundongos Swiss propensos (OP) e resistentes (OR) à obesidade induzida por dieta hiperlipídica durante 11 semanas (77 dias).

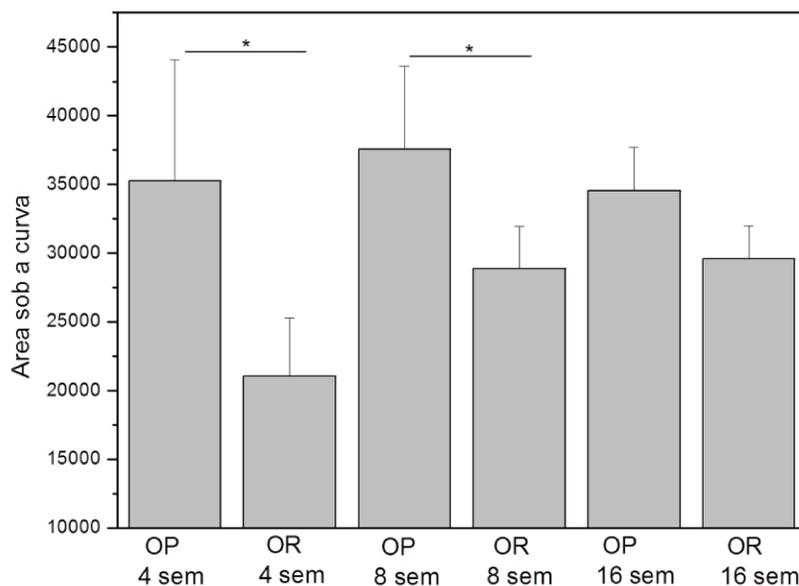
Como pode ser observado na Figura 30, os animais propensos ganham mais massa do que os animais resistentes desde a primeira semana, e essa diferença tende a se estabilizar após 8 semanas (56 dias), mantendo-se até 11 semanas (77 dias) após o início da dieta hiperlipídica. A cinética das alterações metabólicas que ocorrem nesses dois grupos de animais durante o desenvolvimento da obesidade foi avaliada através de parâmetros de sensibilidade à insulina e glicose e expressão de neuropeptídeos que regulam a saciedade após 4, 8 e 16 semanas de HFD. A Figura 31 apresenta os resultados do teste de resistência à insulina (ITT).



**Figura 31.** Constante de velocidade do desaparecimento de glicose após administração de insulina para os camundongos Swiss propensos (OP) e resistentes (OR), com 4, 8 e 16 semanas de dieta hiperlipídica. \*  $p = 0,0159$  e \*\*  $p = 0,0079$ .

Como pode ser observado a partir da Figura 31, após 4 semanas de HFD não há diferença de sensibilidade à insulina entre os grupos OP e OR ( $p > 0.999$ ). Após 8 semanas, os animais propensos começam a apresentar uma diminuição na sensibilidade à insulina ( $p = 0,0159$ ), que é exacerbada após 16 semanas de dieta hiperlipídica ( $p = 0,0079$ ). Diante desses dados, concluiu-se que os animais OP vão se tornando resistentes à insulina com o aumento de tempo de exposição à dieta hiperlipídica; enquanto os animais OR mantêm a resposta à insulina após 16 semanas de HFD semelhante à apresentada após 4 semanas de HFD, sugerindo que o desenvolvimento da resistência à insulina ocorre de forma diferente nos dois grupos. A intolerância à glicose foi avaliada

através do teste de tolerância a glicose (GTT) e os resultados estão apresentados na Figura 32.

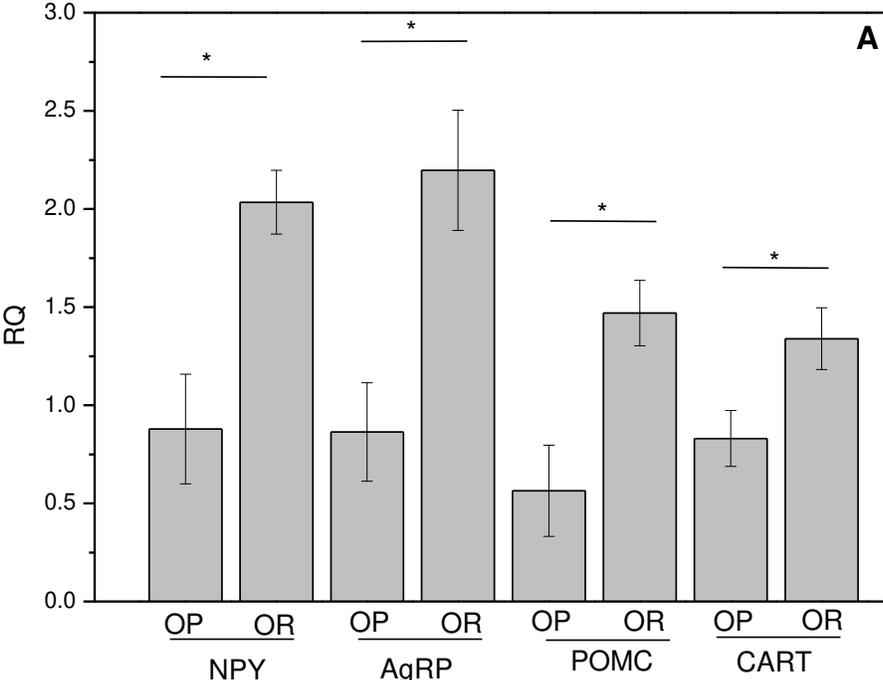


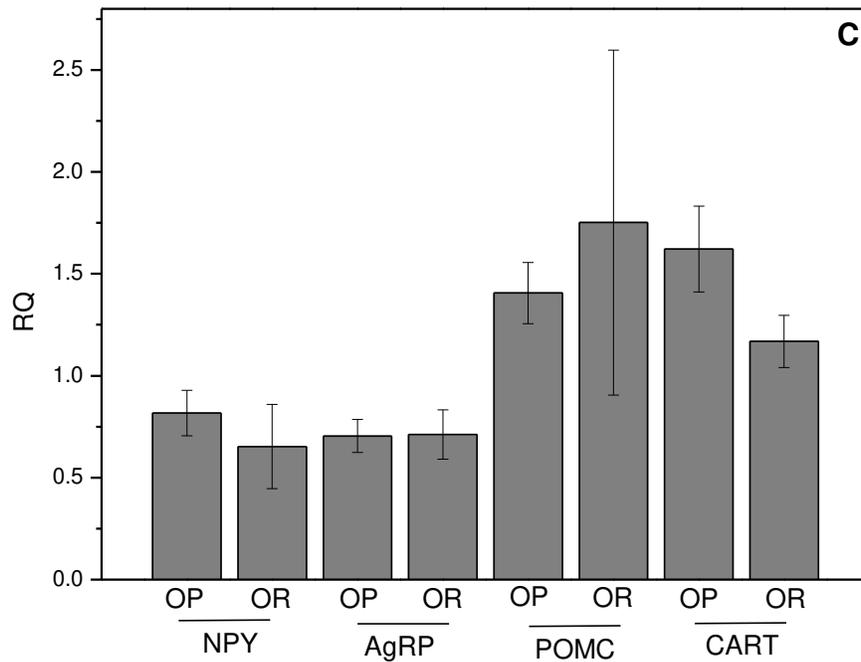
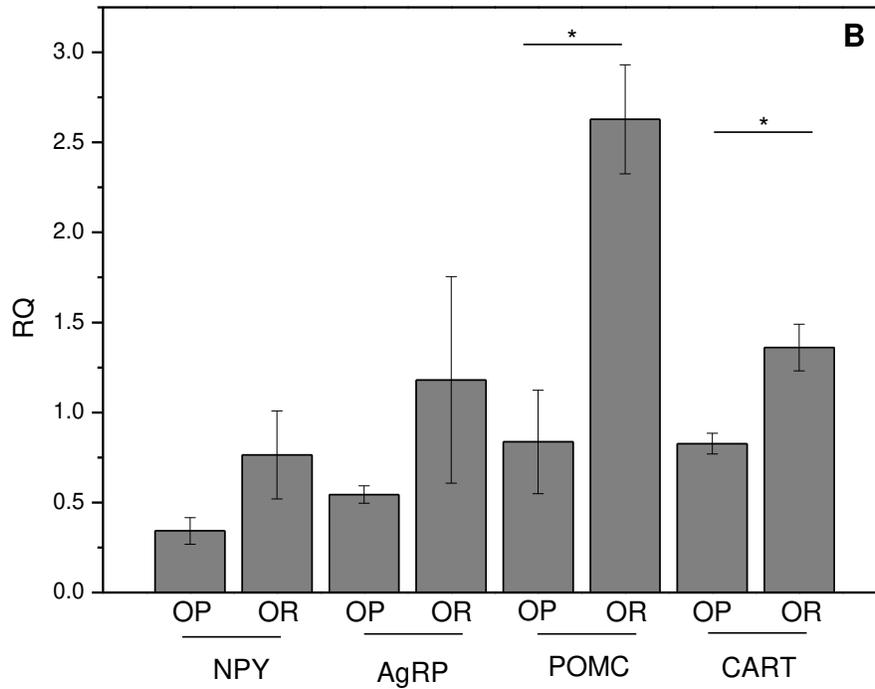
**Figura 32.** Área sob a curva do ensaio de GTT para os camundongos Swiss propensos (OP) e resistentes (OR) após 4, 8 e 16 semanas de dieta hiperlipídica. \*  $p = 0,0286$

Os dados da Figura 32 permitem concluir que os animais OP são mais intolerantes à glicose do que os animais OR logo após 4 semanas de HFD, e que esse nível de intolerância se mantém praticamente constante após 16 semanas de dieta. Diferentemente, os animais OR inicialmente são mais responsivos à glicose, mas há uma tendência de diminuição nessa diferença após 8 semanas de dieta hiperlipídica, sendo que não há mais diferença significativa entre os grupos após 16 semanas de dieta ( $p = 0,3095$ ). Sendo assim, os dados sugerem que os animais resistentes à obesidade são também mais resistentes ao desenvolvimento da intolerância à glicose.

As diferenças no sistema nervoso central entre os animais OP e OR foram avaliadas no hipotálamo por PCR. As expressões de RNA mensageiro (mRNAs) dos

neuropeptídios reguladores da fome, POMC e CART, que possuem ação anorexígena, e AgRP e NPY, que possuem ação orexigênica (Schwartz 2000) foram avaliadas e os resultados são apresentados na Figura 33.





**Figura 33.** Expressão de mRNA de neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos de animais propensos (OP) e resistentes (OR) à obesidade após 4 (A), 8 (B) e 16 (C) semanas de dieta hiperlipídica. \*  $p < 0,05$ .

Como pode ser observado a partir da Figura 33, os animais OR apresentam uma maior expressão de neuropeptídios tanto anorexígenos como orexigênicos após as primeiras 4 semanas em comparação aos animais OP. Com 8 semanas de dieta, a diferença entre a expressão dos neuropeptídios orexigênicos deixa de existir e após 16 semanas de dieta, já não há diferença significativa na expressão dos neuropeptídios entre os animais.

Estudos prévios já apresentaram a relação entre a resistência e propensão à obesidade induzida por dieta e expressão de neuropeptídios. Huang *et al.* mostraram que, após 22 semanas de dieta hiperlipídica, camundongos C57BL/6 propensos à obesidade apresentaram maior expressão de NPY do que os OR e tinham um nível mais baixo de expressão de mRNA de POMC e AgRP (Huang 2003a e 2003b). Wang *et al.* observaram também que ratos OP apresentavam expressão gênica de NPY em níveis mais altos do que ratos OR (Wang 2007). Entretanto, nenhum desses estudos fez uma avaliação da influência do tempo de exposição à dieta sobre a expressão desses neuropeptídios como realizado no presente estudo, o que permitiu observar que os animais propensos e resistentes têm, inicialmente, uma diferença na expressão de neuropeptídios e que essa diferença tende a desaparecer com o aumento de tempo de exposição à dieta.

Os dados obtidos mostram a cinética do desenvolvimento de algumas das diversas alterações causadas pela exposição à dieta hiperlipídica e a correlação dessas alterações com a propensão ou resistência à obesidade induzida por dieta. Esse modelo pode ser de utilidade no estudo do porquê alguns humanos se tornam obesos e outros não quando expostos a uma dieta hipercalórica. Uma das hipóteses é que alguns indivíduos têm uma diminuição genética da habilidade de captar os sinais do tecido adiposo e responder a esses com diminuição da ingestão e aumento do gasto metabólico. Essa predisposição genética resultaria da pressão evolutiva que garantiu que indivíduos pudessem comer e estocar mais energia do que suas necessidades metabólicas em tempos de abundância como reserva para tempos de escassez. Esse mecanismo serviu bem aos nossos antepassados que estavam sujeitos a tempos de abundância e escassez, mas hoje, quando

as comidas ricas em gordura e em calorias são abundantes e baratas, esse mecanismo de sobrevivência pode ser um fator contribuinte para a propensão genética de alguns indivíduos em se tornarem obesos (Levin 2007). Sendo assim, uma questão chave para o entendimento da epidemia da obesidade é: quando providos com calorias ilimitadas, porque apenas algumas pessoas consomem mais do que outras, se tornando obesas? quais são as variantes genéticas que contribuem para o ganho de massa? (Friedman 2009). Nesse contexto, o estudo dos fatores genéticos que estão envolvidos na propensão à obesidade em roedores e como eles respondem ao desafio da dieta hiperlipídica pode ser de grande valia na pesquisa para o controle dessa epidemia em humanos. Os dados obtidos no presente estudo permitem concluir que os camundongos OP e OR desenvolvem a resistência à insulina e a intolerância à glicose de forma diferente durante o tempo de exposição à dieta hiperlipídica, assim como as alterações hipotalâmicas que ocorrem em paralelo com a ingestão da dieta hiperlipídica.

## 5. Conclusões

A aplicação tópica ex-vivo de soluções de RSNOs na mucosa gástrica de ratos Sprague-Dawley levou ao aumento dose-dependente do fluxo sanguíneo gástrico (FSG), medido por fluxometria por laser-doppler, com valor máximo c.a. de 5 x maior do que os obtidos pela aplicação de soluções equimolares de nitrito ou nitrato.

A administração oral de GSNO e SNAC se refletiu no aumento tempo e dose-dependentes dos níveis plasmáticos de nitrito+nitrato em camundongos Swiss.

O acompanhamento cinético da estabilidade de soluções aquosas de GSNO e SNAC em função do pH e a identificação de seus produtos de decomposição, permitiram demonstrar que esses RSNOs se decompõem predominantemente através de mecanismos de hidrólise ácida ou básica, com meias vidas máximas em torno do pH fisiológico.

Camundongos Swiss submetidos à dieta hiperlipídica apresentam um perfil não homogêneo de ganho de massa, que permite estabelecer uma correlação tempo-dependente da propensão e da resistência à obesidade, a alterações na resistência à insulina, intolerância à glicose e nas expressões de neuropeptídeos hipotalâmicos.

## 6. Referências

- Abu-Soud HM, Ichimori K, Nakazawa H, *et al.* Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase by Self-Generated NO. *Biochemistry* 40 (2001) 6876-6881.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 357 (2001) 593-615.
- Alencar JL, Lobysheva I, Geffard M, *et al.* Role of S-nitrosation of Cysteine Residues in Long-Lasting Inhibitory Effect of Nitric Oxide on Arterial Tone. *Molecular Pharmacology* 63 (2003) 1148-1158.
- Aleryani S, Milo E, Rose Y, *et al.* Superoxide-mediated Decomposition of Biological S-nitrosothiols. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (1998) 6041-6045.
- Al-Kaabi SS, Williams DLH, Bonnett R, Oi SL. A kinetic investigation of the thionitrite from ( $\pm$ )-2-acetylamino-2-carboxy-1,1-dimethylethanesulfonamide as a possible nitrosating agent *J. Chem. Soc, Perkin Trans, 2* (1982) 227-230
- AlSadoni H, Ferro A. S-nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clinical Sciences* 98 (2000) 507-520.
- Ancha H, Ojeas H, Tedesco D, Ward A, Harty RF. "Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow". *Regulatory Peptides* 110 (2003) 107-113.
- Arai RJ, Ogata FT, Batista WL, *et al.* Thioredoxin-1 promotes survival in cells exposed to S-nitrosoglutathione: Correlation with reduction of intracellular levels of nitrosothiols and up-regulation of ERK1/2 MAP Kinases. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233 (2008) 227-237.
- Askew SC, Butler AR, Flitney FW, *et al.* Chemical mechanism Underlying the Vasodilator and Platelet Anti-Aggregation properties of S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine and S-nitrosoglutathione. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 3 (1995) 1-9.
- Bandarage UP, Chen L, Fang X *et al.* Nitrosothiol Esters of Diclofenac: Synthesis and Pharmacological Characterization as Gastrointestinal-Sparing Prodrugs *J. Med. Chem.* 43 (2000) 4005-4016.
- Bartberger MD, Mannion JD, Powell SC *et al.* S-N Dissociation Energies of S-Nitrosothiols: On the Origins of Nitrosothiol Decomposition Rates. *Journal of American Chemical Society*, 123 (2001) 8868-8869.
- Basu S, Keszler A, Azarova NA *et al.* A novel role for cytochrome c: Efficient catalysis of S-nitrosothiol formation. *Free Radical Biology & Medicine* 48 (2010) 255-263.
- Bateman RM, Ellis CG Freeman DJ. Optimization of Nitric Oxide Chemiluminescence Operating Conditions for Measurement of Plasma Nitrite and Nitrate. *Clinical Chemistry* 48 (2002) 570-572.
- Bjorne H, Petersson J, Phillipson M, *et al.* Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *Journal of Clinical Investigation* 113 (2004) 106-114.
- Bocedi A, Gradoni L, Menegatti E, *et al.* Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. *Biochemical and biophysical Research Communications* 315 (2004) 710-718.
- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2 (2001) 907-916.

Bramanti E, Angeli V, Paolicchi A, *et al.* The determination of S-nitrosothiols in biological samples – Procedures, problems and precautions. *Life Sciences* 88 (2011) 126-129.

Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, *et al.* Gastroprotective and ulcer healing effects of nitric oxide-releasing non steroidal anti-inflammatory drugs. *Digestive Liver Disease* 32 (2000) 583-594.

Camara PRS, Ferraz GJN, Franco-Penteado CF *et al.* Ablation of primary afferent neurons by neonatal capsaicin treatment reduces the susceptibility of the portal hypertensive gastric mucosa to ethanol-induced injury in cirrhotic rats. *European Journal of Pharmacology* 589 (2008) 245–250.

Ceron PIB, Cremonez DC, Bendhack LM, *et al.* The relaxation Induced by S-nitroso-glutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine in rat aorta is not related to Nitric Oxide production. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 298 (2001) 686-694.

Cintra DE, Pauli JR, Araújo EP *et al.* Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of Hepatology* 48 (2008) 628-637

Collins PJ, Horowitz M, Cook DJ, *et al.* Gastric emptying in normal subjects- a reproducible technique using a single scintillation camera and computer system. *Gut* 24 (1983) 1117-1125.

Cortas NK, Wakid NW. Pharmacokinetic Aspects of Inorganic Nitrate Ingestion in Man. *Pharmacology & Toxicology* 68 (1991) 192-195.

Cuzzocrea S, Zingarelli B, Saubetin L, *et al.* Multiple organ failure following zymosan-induced peritonitis is mediated by nitric oxide. *Shock* 8 (1997) 268-275.

de Souza CT, Araújo EP, Stoppiglia LF, *et al.* Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action. *Faseb Journal* 21 (2007) 1153-1163.

Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, *et al.* Development of Hypertension in a Rat Model of Diet-Induced Obesity. *Hypertension* 35 (2000) 1009-1015.

Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre Óxido Nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 39 (2003) 343-350.

Egan WJ, Lauri G. Prediction of intestinal permeability. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (2002) 273-289

Elliott SN, McKnight W, Cirino G, Wallace JL. A Nitric Oxide-releasing Nonsteroidal Antiinflammatory Drug Accelerates Gastric Ulcer Healing in Rats. *Gastroenterology* 109 (1995) 524-530.

Fang FC. Mechanisms of Nitric Oxide-related Antimicrobial Activity. *Journal of Clinical Investigations* 12 (1997) 2818-2825.

Favaloro JL, Kemp-Harper BK. The nitroxyl anion (HNO) is a potent dilator of rat coronary vasculature. *Cardiovascular Research* 73 (2007) 587-596.

Fiorucci S, Mencarelli A, meneguzzi A, *et al.* Co-Administration of Nitric Oxide-Aspirin (NCX-4016) and Aspirin Prevents Platelet and MOnocyte Activation and Protects Against Gastric Damage Induced by Aspirin in Humans. *Journal of the American College of Cardiology* 44 (2004) 635-641.

Flamant M, Aubert P, Rolli-Derkinderen M, *et al.* Enteric glia protect against *Shigella flexneri* invasion in intestinal epithelial cells: a role for S-nitrosoglutathione. *Gut* 60 (2011) 473-484.

- Fortin CF, McDonald PP, Fulop T, *et al.* Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. *Shock* 33 (2010) 344-352.
- Franceschi L, Malpeli G, Scarpa A, *et al.* Protective effects of S-nitrosoalbumin on lung injury induced by hypoxia-reoxygenation in mouse model of sickle cell disease. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 291 (2006) L457-L465.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacological Reviews* 62 (2010) 525-563.
- Friedman JM. Causes and control of excess body fat. *Nature* 459 (2009)
- Gao J, Ghibaudi L, van Heek M, Hwa JJ. Characterization of diet-induced obese rats that develop persistent obesity after 6 months of high-fat followed by 1 month of low-fat diet. *Brain Research* 936 (2002) 87-90.
- Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I, *et al.* Detection of S-nitrosothiols in biological fluids: A comparison among the most widely applied methodologies. *Journal of Chromatography B* (2007) 124-139.
- Hedberg JJ, Griffiths WJ, Nilsson STF, *et al.* Reduction of S-nitrosoglutathione by human alcohol dehydrogenase 3 is an irreversible reaction as analysed by electrospray mass spectrometry. *European Journal of Biochemistry* 270 (2003) 1249-1256.
- Hijona E, Hijona E, Arenas JI, Bujanda L. Inflammatory Mediators of Hepatic Steatosis. *Mediators of Inflammation* 2010 (2010) 1-7.
- Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, *et al.* What Part of NO Don't You Understand? Some answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (2010) 19699-19704.
- Hogg N. Biological Chemistry and Clinical Potential of S-nitrosothiols. *Free Radical Biology & Medicine* 28 (2000) 1478-1486.
- Hogg N. The Biochemistry and Physiology of S-nitrosothiols. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* 42 (2002) 585-600.
- Hollenberg SM, Cinel I. Bench-to-bedside review: Nitric oxide in critical illness – update 2008. *Critical Care* 13 (2009) 1-9.
- Holloway Gam Watkins DW. Laser Doppler measurement of cutaneous blood flow. *The Journal of Investigative Dermatology* 69 (1977) 306-309.
- Holm L, Phillipson M, Perry MA. NO-flurbiprofen maintains duodenal blood flow, enhances mucus secretion contributing to lower mucosal injury. *American Journal Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 283 (2002) G1090-G1097.
- Holmes AJ, Williams DLH. Reaction of ascorbic acid with S-nitrosothiols: clear evidence for two distinct reaction pathways. *Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 2* 2 (2000) 1639-1644.
- Horter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46 (2001) 75-87.
- Huang X, Han M, South T, *et al.* Altered levels of PMC, AgRP and MC4-R mRNA expression. in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Research* 992 (2003a) 9-19.

Huang X, Han M, Storlien LH. The level of NPY receptor mRNA expression in diet-induced obese and resistant mice. *Molecular Brain Research* 115 (2003b) 21-28.

Irvine JC, Ritchie RH, Favaloro JL, *et al.* Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends in Pharmacological Sciences* 29 (2008) 601-608.

Jansson EA, Petersson J, Reinders C, *et al.* Protection from nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastric ulcers by dietary nitrate. *Free Radical Biology & Medicine* 42 (2007) 510-518.

Jensen De, Belka GK, DuBois GC. S-nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* 331 (1998) 659-668.

Jobgen WS, Fried SK, Fu WJ, *et al.* Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17 (2006) 571-588.

Jourd'Heuil D, Hallen K, Feelisch M, *et al.* Dynamic State of S-nitrosothiols in human Plasma and Whole Blood. *Free Radical Biology & Medicine* 28 (2000) 409-417.

Keszler A, Zhang Y, Hogg N. Reaction between nitric oxide, glutathione, and oxygen in the presence and absence of protein: How are S-nitrosothiols formed?. *Free Radical Biology & Medicine* 48 (2010) 55-64.

Kiris T, Karasu A, Yavuz C, *et al.* Reversal of Cerebral Vasospasm by the Nitric Oxide Donor SNAP in an Experimental Model of Subarachnoid Haemorrhage. *Acta Neurochirurgica* 141 (1999) 1323-1329.

Krezel A, Bal W. Contrasting Effects of Metal Ions on S-nitrosoglutathione, Related to Coordination Equilibria: GSNo Decomposition Assisted by Ni(II) vs Stability Increase in the Presence of Zn(II) and Cd(II). *Chemical Research in Toxicology* 17 (2004) 392-403.

Lanas A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Research & Therapy* 10 (2008) 1-6.

Larter CZ, Chitturi S, Heydet D, Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 25 (2010) 672-690.

Lauterio TJ, Bond JP, Ulman EA. Development and Characterization of a Purified Diet to Identify Obesity-Susceptible and Resistant Rat Populations. *The Journal of Nutrition* 124 (1994) 2172-2178.

Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B, Keeseey RE. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *American Journal of Physiology* 273 (1997) R725-R730.

Liu L, Hausladen A, Zeng M, *et al.* A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410 (2001) 490-494.

Liu L, Yan Y, Zeng M, *et al.* Essential Roles of S-nitrosothiols in Vascular Homeostasis and Endotoxic Shock. *Cell* 116 (2004) 617-628.

Lundberg J, Weitzberg E. Use of Nitrites and Nitrates and Compositions containing these. Número da patente: 20100092441, data de publicação: 04/15/2010

Lundberg JO, Govoni M. Inorganic Nitrate is a Possible Source for Systemic Generation of Nitric Oxide. *Free Radical Biology & Medicine* 37 (2004) 395-400.

- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews in Drug Discovery* 7 (2008) 156-167.
- Ma L, Wallace JL. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279 (2000) G341–G346.
- MacArthur PH, Shiva S, Gladwin MT. Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. *Journal of Chromatography B* 851 (2007) 93–105.
- Marley R, Patel RP, Orié N, *et al.* Formation of Nanomolar Concentrations of S-nitroso-albumin in Human Plasma by Nitric Oxide. *Free Radical Biology & Medicine* 31 (2001) 688-696.
- Marra F, Gastaldelli A, Baroni GS, Tell G, Tiribelli C. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic Steatohepatitis. *Trends in Molecular Medicine*, 14 (2008) 72-81.
- McMahon TJ, Doctor A. Extrapulmonary Effects of Inhaled Nitric Oxide. *The Proceedings of the American Thoracic Society* 3 (2006) 153-160.
- Mellion BT, Ignarro LJ, Myers CB, *et al.* Inhibition of Human Platelet Aggregation by S-nitrosothiols. *Molecular Pharmacology* 23 (1983) 653-664.
- Miller Mr, Megson IL. Recent developments in nitric oxide donor drugs. *British Journal of Pharmacology* 151 (2007) 305-321.
- Molloy J, Martin JF, Baskerville PA, *et al.* S-nitrosoglutathione Reduces the Rate of Embolization in Humans. *Circulation* 98 (1998) 1372-1375.
- Moraes JC, Coope A, Morari Jet al. High-Fat Diet Induces Apoptosis of Hypothalamic Neurons. *PLoS ONE* 4 (2009) e5045.
- Moran EE, Timerguazin QK, Kwong E, *et al.* Kinetics and Mechanism of S-nitrosothiol Acid-Catalyzed Hydrolysis: Sulphur Activation Promotes Facile NO<sup>+</sup> Release. *The Journal of Physical Chemistry B* 115 (2011) 3112-3126.
- Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the Phenomenon of Nitrate Tolerance. *Circulation Research* 97 (2005) 618-628.
- Muscara MN, McKnight W, Del Soldato P, Wallace JL. Effect of a Nitric Oxide-Releasing Naproxen Derivative on Hypertension and Gastric Damage Induced by Chronic Nitric Oxide Inhibition in the Rat. *Pharmacol. Lett.* 62 (1998) 235- 240.
- Nagababu E, Ramasamy S, Rifkin JM. S-nitrosohemoglobin: A mechanism for its formation in conjunction with nitrite reduction by deoxyhemoglobin. *Nitric Oxide* 15 (2006) 20-29.
- Nagababu E, Rifkind JM. Measurement of Plasma Nitrite by Chemiluminescence without Interference of S-, N-nitroso and Nitrated Species. *Free Radical Biology and Medicine*, 42 (2007) 1146-1154.
- Ng ESM, Cheng Z, Ellis A, *et al.* Nitrosothiols in vascular tissue: Modulation by ultraviolet light, acetylcholine and ionomycin. *European Journal of Pharmacology* 560 (2007) 183-192.
- Nikitovic D, Holmgren A. S-nitrosoglutathione is Cleaved by the Thioredoxin System with Liberation of Glutathione and Redox Regulating Nitric Oxide. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 19180-19185.

Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, *et al.* Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299 (2003) 896-899.

Oliveira CPMS, Alves VAF, Abdala D *et al.* Oral Administration Of S-Nitroso-N-Acetylcysteine Prevents The Onset Of Non Alcoholic Fatty Liver Disease In Rats. *World Journal of Gastroenterology*, 12 (2006a) 1905-1911.

Oliveira CPMS, Alves VAF, Lima VMR *et al.* Modulation of hepatic microsomal triglyceride transfer protein induced by s-nitroso-n-acetylcysteine in ob/ob mice. *Biochemical Pharmacology*, 74 (2007) 290-297.

Oliveira CPMS, Lima VMR, Simplicio FI *et al.* Prevention and reversion of nonalcoholic steatohepatitis in OB/OB mice by S-nitroso-N-acetylcysteine treatment. *Journal of the American College of Nutrition*, 27 (2008) 299-305.

Oliveira CPMS, Stefano JT, Lima VMR *et al.* Hepatic gene expression associated with non alcoholic steatohepatitis protection by S-nitroso-N-acetylcysteine. *Journal of Hepatology*, 45 (2006b) 725-733.

Oliveira MG, Shishido SM, Seabra AB, Morgon NH. Thermal Stability of Primary S-Nitrosothiols: Roles of Autocatalysis and Structural Effects on the Rate of Nitric Oxide Release . *Journal of Physical Chemistry A* 106 (2002) 8963-8970

Pannala AS, Mani AR, Spencer JPE, *et al.* The Effect of Dietary Nitrate on Salivary, Plasma, and Urinary Nitrate Metabolism in Humans. *Free Radical Biology & Medicine* 34 (2003) 576-584.

Petersson J, Phillipson M, Jansson EA, *et al.* Dietary nitrate increases gastric mucosal blood flow and mucosal defense. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 292 (2007) G718-G724.

Que L, Yang Z, Stamler JS, *et al.* S-nitrosoglutathione Reductase An Important Regulator in Human Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180 (2009) 226-231.

Rafikova O, Rafikov R, Nudler E. Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: The mechanism and implication in vascular control. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99 (2002) 5913-5918.

Rajan V, Varghese B, Leeuwen TG, *et al.* Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers Medicine Science* 24 (2009) 269-283.

Ramsay B, Radomski M, de Belder A, *et al.* Systemic effects of S-nitrosoglutathione in the human following intravenous infusion. *British Journal of Clinical Pharmacology* 40 (1995) 101-102.

Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, *et al.* Plasma Nitrosothiols Contribute to the Systemic Vasodilator Effects of Intravenously Applied NO: Experimental and Clinical Study on the Fate of NO in Human Blood. *Circulation Research* 91 (2002) 470-477.

Richardson G, Benjamin N. Potential therapeutic uses for S-nitrosothiols. *Clinical Science* 102 (2002b) 99-105.

Richardson G, Hicks SL, Byrne SO, *et al.* The ingestion of inorganic nitrate increases gastric S-nitrosothiol levels and inhibits platelet function in humans. *Nitric Oxide* 7 (2002a) 24-29.

Rinella ME, Elias MS, Smolak RR *et al.* Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *Journal of Lipid Research*, 49 (2008) 1068-1076.

Romão PRT, Fonseca SG, Moraes RH, *et al.* Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. against nitrosothiol-induced cytotoxicity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39 (2006) 355-363.

Rossaint R, Falke KJ, López F, *et al.* Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine* 328 (1993) 399-405.

Sandmann J, Schwedhelm KS, Tsikas D. Specific transport of S-nitrosocysteine in human red blood cells: Implications for formation of S-nitrosothiols and transport of NO bioactivity within vasculature. *FEBS Letters* 579 (2005) 4119-4124.

Schott KL, Charão MF, Valentin J, *et al.* Influência de Desproteinizantes ácidos na Quantificação da Glutathiona Reduzida Eritrocitária por CLAE-UV. *Química Nova* 30 (2007) 592-596.

Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, *et al.* Central nervous system control of food intake. *Nature* 404 (2000) 661-671.

Sengupta R, Ryter SW, Zuckerbraun BS, *et al.* Thioredoxin Catalyzes the Denitrosation of Low-Molecular Mass and Protein S-nitrosothiols. *Biochemistry* 46 (2007) 8472-8483.

Shah CM, Locke IC, Chowdrey HS, *et al.* Rapid S-nitrosothiol metabolism by platelets and megakaryocytes. *Biochemical Society Transactions* 31 (2003) 1450-1452.

Singh RJ, Hogg N, Joseph J *et al.* Mechanism of Nitric Oxide Release from S-Nitrosothiols. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (1996) 18596-18603.

Smith JN, Dasgupta TP. Kinetics and Mechanism of the Decomposition of S-nitrosoglutathione by L-Ascorbic Acid and Copper Ions in Aqueous Solution to Produce Nitric Oxide. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 4 (2000) 57-66.

Smith RP, Kruszyna H. Nitroprusside produces cyanide poisoning via a reaction with hemoglobin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 3 (1974) 557-563.

Stoyanovsky DA, Tyurina YY, Tyurin VA, *et al.* Thioredoxin and Lipoic Acid Catalyze the Denitrosation of Low Molecular Weight and Protein S-nitrosothiols. *Journal of American Chemical Society* 127 (2005) 15815-15823.

Swift HR, Williams DLH. Decomposition of S-nitrosothiols by mercury(II) and silver salts *J. Chem. Soc., Perkin Trans, 2* (1997) 1933-1935.

Tam SW, Saha JK, Garvey DS, *et al.* Nitrosothiol-based NO-donors inhibit the gastrointestinal mucosal damaging actions of NSAIDs. *Inflammopharmacology* 8 (2000) 81-88.

Taubert D, Roesen R, Lehmann C, *et al.* Effects of Low Habitual Cocoa Intake on Blood Pressure and Bioactive nitric Oxide. *Journal of American Medical Association* 298 (2007) 49-60.

Terwel D, Nieland LJM, Schutte, *et al.* S-nitroso-N-acetylpenicillamine and nitroprusside induce apoptosis in a neuronal cell line by production of different reactive molecules. *European Journal of Pharmacology* 400 (2000) 19-33.

Thomas DD, Ridnour LA, Isenber JS, *et al.* The chemical biology of nitric oxide: Implications in cellular signaling. *Free Radical Biology & Medicine* 45 (2008) 18-31.

Tiniakos DG. Nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis: histological diagnostic criteria and scoring systems. *European Journal Gastroenterology & Hepatology* 22 (2010) 643-650.

Trimmer BA, Aprille JR, Dudzinski DM, *et al.* Nitric Oxide and the Control of Firefly Flashing. *Science* 292 (2001) 2486-2488.

Tsikakos D, Gutzki FM, Stichtenoth DO. Circulating and excretory nitrite and nitrate as indicators of nitric oxide synthesis in humans: methods of analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 62 (2006) 51–59.

Tsikakos D, Rossa S, Stichtenoth DO, *et al.* Is S-nitroso-N-acetylcysteine a Circulating or an Excretory Metabolite of Nitric Oxide (NO) in Man? Assessment by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220 (1996) 939-944.

Tsikakos D. A critical review and discussion of analytical methods in the L-arginine/nitric oxide area of basic and clinical research. *Analytical Biochemistry* 379 (2008) 139-163.

Tymvios C, Moore C, Jones S, *et al.* Platelet aggregation responses are critically regulated *in vivo* by endogenous nitric oxide but not by endothelial nitric oxide synthase. *British Journal of Pharmacology* 158 (2009) 1735-1742.

Vassilakopoulos T, Govindaraju K, Parthenis D, *et al.* Nitric oxide production in the ventilator muscles in response to acute resistive loading. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 292 (2007) L1013-L1022

Vercelino R, Crespo I, de Souza GF, Cuevas MJ, de Oliveira MG, Marroni NP, González-Gallego J, Tuñón MJ. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J Mol Med*, 88 (2010) 401-11.

Vincent SR. Nitric Oxide Neurons and Neurotransmission. *Progress in Neurobiology* 90 (2010) 246-255.

Wallace JL, Reuter B, Cirino G. Nitric Oxide-Releasing Non- Steroidal Antiinflammatory Drugs: A Novel Approach for Reducing Gastrointestinal Toxicity. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 9 (1994) S40-S44.

Wallace JL. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself?. *Physiological Research* 88 (2008) 1547-1565.

Wang C, Yang N, Wu S *et al.* Difference of NPY and its Receptor Gene Expressions between Obesity and Obesity-resistant Rats in Response to High-fat Diet. *Horm Metab Res* 39 (2007) 262 – 267.

Webb Aj, Patel N, Loukogeorgakis S. Acute Blood Pressure Lowering, Vasoprotective, and Antiplatelet Properties of Dietary Nitrate via Bioconversion to Nitrite. *Hypertension* 51 (2008) 784-790.

Wu H, Romieu I, Sienna-Monge J, *et al.* Genetic variation in S-nitrosoglutathione reductase (*GSNOR*) and childhood asthma. *Journal of Allergy Clinical Immunology* 120 (2007) 322-328.

Wu Y, Zhang F, Wang Y, *et al.* Photoinstability of S-nitrosothiols during Sampling of Whole Blood: A Likely Source of Error and Variability in S-nitrosothiol Measurements. *Clinical Chemistry* 54 (2008) 916-918.

Xian M, Chen X, Liu Z, *et al.* Inhibition of Papain by S-nitrosothiols. *The Journal of Biological Chemistry* 27 (2000) 20467-20473.

Yang F, Troncy E, Francœur M, *et al.* Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence. *Clinical Chemistry* 43 (1997) 657–662.

Yang Z, Wang Z, Doulias P, *et al.* Lymphocyte Development Requires S-nitrosoglutathione Reductase. *The Journal of Immunology* 185 (2010) 6664-6669.

Zecchin HG, de Souza CT, Prada PO, *et al.* Effect of obesity on insulin signaling through JAK2 in rat aorta. *Vascular Pharmacology* 43 (2005) 346-352.

Zhan Y, Hogg N. S-nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radical Biology & Medicine* 38 (2005) 831-838.

Zhang Y, Hogg N. Formation and stability of S-nitrosothiols in RAW 264.7 cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 287.