Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia

Indiara Vieira Santana

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-HIPERTENSIVOS DA
S-NITROSOGLUTATIONA LIVRE E NANOENCAPSULADA
EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO**

Ribeirão Preto – SP
2020

Indiara Vieira Santana

**COMPARAÇÃO DOS EFEITOS ANTI-HIPERTENSIVOS DA
S-NITROSOGLUTATIONA LIVRE E NANOENCAPSULADA
EM MODELO ANIMAL DE HIPERTENSÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos
Santos

Ribeirão Preto – SP

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Santana, Indira Vieira

Comparação dos efeitos anti-hipertensivos da S-nitrosoglutathione livre e nanoencapsulada em modelo animal de hipertensão. Indira Vieira Santana; Orientador: Prof.Dr. José Eduardo Tanus dos Santos. Ribeirão Preto, 2020. 85 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. S-nitrosoglutathione. 2. Espécies nitrosadas. 3. Nanopartículas. 4. Hipertensão arterial. 5. Efeitos anti-hipertensivos.

Folha de avaliação

SANTANA, I.V. Comparação dos efeitos anti-hipertensivos da S-nitrosoglutathione livre e nanoencapsulada em modelo animal de hipertensão. 2020. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Às pessoas que sempre acreditaram
em mim e me apoiaram em cada
decisão, minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que me guia em todas as situações e me dá forças para enfrentar os desafios da vida.

Agradeço aos meus pais, Jucilene e Marcelino, por tudo! A torcida e apoio de vocês tem feito toda diferença. Agradeço a vocês por terem me ensinado tanto, que sem dúvidas foi o que me trouxe até aqui.

Aos meus irmãos, Marcel, Itana e Lua por serem meus companheiros de vida e por toda cumplicidade. Aos meus sobrinhos Pedro e Benjamin e primos Júnior e Ana por me ensinar a dar valor ao que realmente importa e por, mesmo com a distância, serem a alegria do meu dia-a-dia. Agradeço também a toda minha família, tios, tias e avós, por todo incentivo e torcida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, pela orientação nesses dois anos de mestrado e pelo exemplo de competência e profissionalismo. Muito obrigada por acreditar e confiar em mim.

Aos meus amigos e colaboradores, Grazi, Renato e Sandra por todo apoio e por nunca medir esforços para me auxiliar na execução deste trabalho.

À Prof^a. Dr. Amedea Seabra e a Milena Pelegrino, por toda disponibilidade e colaboração para o desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas de laboratório, Juliana, Leevan, Jessica, Carla, Grazi, Renato, Tiago, Evandro, Dani, Rose por todos os conselhos, dicas e apoio. A ótima convivência com vocês tornou os últimos anos mais leves e prazerosos. Muito obrigada pela amizade e companheirismo.

A todas amizades cultivadas em Ribeirão Preto, muito obrigada por cada momento, cada conversa, enfim, pelo apoio dedicado a mim.

Gostaria de agradecer especialmente à Rose, Grazi e ao Renato pela amizade cultivada, pelos conselhos e por trazerem muita alegria para o meu dia a dia. À Jessica, Carla e Dani por tantos momentos de descontração e por tornarem os meus dias mais leves.

À Sandra por ser amiga, conselheira e tranquilizadora. Muito obrigada também por acreditar em mim e por me fazer ter mais confiança em mim mesma.

Ao Paulo Henrique, por ter sido um super amigo e companheiro. Muito obrigada por toda parceria e por ter me apoiado tanto nesses últimos meses

Às meninas do 12A, Kelly, Jé e Fer, por serem a minha família em Ribeirão Preto. Muito obrigada por todo companheirismo nesses dois anos. Tudo foi muito mais leve com vocês.

Aos professores, funcionários e colegas de todo o departamento de Farmacologia da FMRP, em especial ao Ramon e à Gislaine por toda ajuda e orientação, sempre sendo prestativos e atenciosos.

Aos meus amigos de infância, da graduação e do intercâmbio, que mesmo com a distância sempre me apoiaram e torceram por mim. Poder contar com vocês tem sido essencial na minha caminhada.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que aqui não foram citados, mas que fazem parte da minha vida e que me apoiam todos os dias, muito obrigada.

“Faça a cada dia algo que o aproxime
um pouco mais de um amanhã melhor”

Doug Firebaugh

RESUMO

SANTANA, I.V. Comparação dos efeitos anti-hipertensivos da S-nitrosoglutationa livre e nanoencapsulada em modelo animal de hipertensão. 2020. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A pressão arterial elevada é fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e acomete mais de 1,1 bilhão de pessoas no mundo. O aumento da pressão arterial é acompanhado do estresse oxidativo e do desenvolvimento da disfunção endotelial. Estes eventos ocasionam a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), molécula importante para o controle do tônus vascular. Neste contexto, existe um crescente interesse em aumentar a biodisponibilidade de NO por meio da administração de nitrosotióis, que além de serem reservatórios endógenos de NO, alteram funções proteicas por meio da nitrosação. Dentre os nitrosotióis endógenos mais abundantes está a S-nitrosoglutationa. (GSNO), uma molécula vasodilatadora e redutora da pressão arterial. O desafio para o uso da GSNO na hipertensão arterial é sua rápida degradação endógena por atividade enzimática. Uma possível forma de prolongar o efeito hipotensor do GSNO é através do encapsulamento desta molécula em nanopartículas de quitosana. Assim, a hipótese deste trabalho é que o tratamento com GSNO nanoencapsulado apresenta efeito hipotensor prolongado comparado ao tratamento com GSNO livre. Para isto foi utilizado um modelo de hipertensão animal induzida por L-NAME (1g/L) na água de beber e foram avaliados os efeitos do tratamento agudo e crônico com a GSNO livre e nanoencapsulada por via oral. Foram estudados os efeitos dos tratamentos na pressão arterial e nas concentrações plasmáticas e teciduais dos metabólitos do NO (nitrito, nitrato e espécies nitrosadas). Os resultados obtidos evidenciam que a GSNO é um potente anti-hipertensivo de efeito agudo, com duração do efeito menor que 20 minutos. Não observamos diferença estatisticamente significativa relacionada ao encapsulamento sob a resposta da GSNO na pressão arterial dos animais tratados aguda ou cronicamente. No protocolo agudo, foi possível observar aumento de nitrito e nitrato no plasma, estômago e fígado nos animais hipertensos tratados com GSNO-NP. Já no protocolo crônico observamos aumento dos metabólitos do NO apenas no

fígado e estômago. Em suma, os dados mostrados sugerem que o tratamento com GSNO reduz a pressão arterial e o encapsulamento em nanopartículas de quitosana não modifica a resposta anti-hipertensiva da molécula livre.

Palavras chave: S-nitrosoglutathione; Espécies nitrosadas; Nanopartículas; Hipertensão arterial

ABSTRACT

SANTANA, I.V. Comparison of antihypertensive effects between free and nanoencapsulated S-nitrosoglutathione in animal hypertension model. 2020. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

High blood pressure is a risk factor for the development of cardiovascular diseases, which affect more than 1.1 billion people worldwide. The increase in blood pressure results in oxidative stress and endothelial dysfunction. These events lead to a decrease in the bioavailability of nitric oxide (NO), an important molecule that controls vascular tone. In this context, there is a growing interest in increasing the bioavailability of NO through the administration of nitrosothiols, which are endogenous reservoirs of NO and mediate protein nitrosation. One of the most abundant endogenous nitrosothiols is S-nitrosoglutathione. (GSNO), a molecule with vasodilatory and blood pressure reducing activity. However, its use in hypertension is still a challenge due to its rapid endogenous degradation by enzymatic activity. A possible way to prolong the antihypertensive effect of GSNO is through the encapsulation of this molecule within chitosan nanoparticles. Thus, the hypothesis of this study is that the treatment with nanoencapsulated GSNO has a prolonged antihypertensive effect compared to the treatment with free GSNO. In order to test this hypothesis, it was used a model of animal hypertension induced by L-NAME (1g / L) in drinking water. Treatment effects of free and nanoencapsulated GSNO were evaluated in acute and chronic protocols. Effects of treatments on blood pressure and plasma and tissue concentrations of NO metabolites (nitrite, nitrate and nitrosated species) were studied. Results show that GSNO is a potent antihypertensive agent with an acute effect, lasting less than 20 minutes. It was not observed any statistically significant difference in blood pressure response between groups treated with encapsulated and free GSNO in both acute and chronic protocols. In the acute protocol, it was detected an increase in concentration of nitrite and nitrate in plasma, stomach and liver after treatment of hypertensive animals with GSNO-NP. With regards to the chronic protocol, we observed an increase in NO metabolites only in the liver and stomach. In summary, the data suggests that

treatment with GSNO reduces blood pressure and encapsulation with chitosan nanoparticles does not modify the antihypertensive response of the free molecule.

Keywords: S-nitrosoglutathione; Nitrosated species; Nanoparticles; Arterial hypertension

Lista de Ilustrações

Figura 1. Mecanismos envolvidos na síntese de óxido nítrico -----	22
Figura 2. Mecanismos envolvidos na diminuição de NO na disfunção endotelial----	24
Figura 3. Síntese de nitrosotióis -----	27
Figura 4. Estrutura química da GSNO-----	29
Figura 5. Protocolo experimental agudo -----	39
Figura 6. Protocolo experimental crônico-----	40
Figura 7. Pressão arterial média invasiva de ratos controle e hipertensos tratados agudamente por via oral com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP.-----	44
Figura 8. Frequência cardíaca de ratos controle e hipertensos tratados agudamente por via oral com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	45
Figura 9. Concentração de nitrato e nitrito no plasma de ratos controle e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	47
Figura 10. Concentração de espécies nitrosadas totais, nitrosotióis e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio no plasma de ratos controle e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	48
Figura 11. Concentração de nitrato e nitrito na aorta de ratos controle e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	49
Figura 12. Concentração de nitrato e nitrito no coração de ratos normotensos e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP.-----	51
Figura 13. Concentração de espécies nitrosadas totais, nitrosotióis e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio no coração de ratos controle e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	52
Figura 14. Concentração de nitrato e nitrito no fígado de ratos controle e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP . -----	54
Figura 15. Concentração de espécies nitrosadas totais, nitrosotióis e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio no fígado de ratos controle e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	55
Figura 16. Concentração de nitrato e nitrito no estômago de ratos controle e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP.-----	57
Figura 17. Concentração de espécies nitrosadas, nitrosotióis e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio no estômago de ratos controle e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP.-----	58

Figura 18. Pressão arterial sistólica de ratos hipertensos tratados sete dias por via oral com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	59
Figura 19. Concentração nitrito na aorta de ratos hipertensos tratados por 7 dias com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	60
Figura 20. Concentração nitrito e espécies nitrosadas no plasma e coração de ratos hipertensos após tratamento por 7 dias com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	61
Figura 21. Concentração nitrito e espécies nitrosadas no estômago e fígado de ratos hipertensos após tratamento por 7 dias com veículo, NP, GSNO e GSNO-NP. -----	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA – Dimetilarginina assimétrica
ANOVA – Análise de variância
AVE – Acidente vascular encefálico
BH₄ – Tetraidrobiopterina
CS – Quitosana
CSH – Cisteína
CSNO – Nitrosocisteína
DTPA – Ácido dietilenotriaminopentaacético
eNOS ou NOS3 – Óxido nítrico sintase endotelial
EPM – Erro padrão médio
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ESLI – Estudo Longitudinal da Saúde dos Idosos
GCs – Guanilato ciclase solúvel
GMPc – Monofostato cíclico de guanosina
GSH – Glutathione
GSH-NP – Glutathione nanoencapsulada
GSNO – Nitrosoglutathione
GSNO-NP – Nitrosoglutathione nanoencapsulada
GSNOR – Nitrosoglutathione redutase
GTP – Trifosfato de guanosina
Hg – Mercúrio
IMC – Índice de massa corpórea
L-NAME – N(ω)-nitro-L-arginina metil ester
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NEM – N-etilmaleimida
-NH – Grupamento amina
NO – Óxido nítrico
NO₂ – Nitrito
NO₃ – Nitrato
NP – Nanopartícula
O₂⁻ - Ânion superóxido

O₂ – Oxigênio

OMS – Organização Mundial de saúde

ONOO⁻ - Peroxinitrito

PAD – Pressão arterial diastólica

PAM – Pressão arterial média

PAS – Pressão arterial sistólica

PBS – Tampão fosfato salino

PKG – Proteína kinase G

RSNO – Nitrosotíóis

RXNO – Espécies nitrosadas totais

-SH – Grupamento sulfidril ou tiol

TPP – Tripolifosfato de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO-----	19
1.1. Hipertensão arterial: Conceito, fatores de risco e epidemiologia -----	19
1.2. Óxido nítrico: síntese e seu papel na homeostase vascular -----	21
1.3. Deficiência de óxido nítrico na hipertensão arterial -----	23
1.4. Metabólitos do óxido nítrico e sua importância para o sistema cardiovascular	25
1.5. Nitrosotióis -----	26
1.6. S-Nitrosoglutathione e seu papel terapêutico no sistema cardiovascular -----	29
1.7. Desafios para o uso terapêutico da S-nitrosoglutathione-----	30
1.8. Nanoencapsulamento da nitrosoglutathione -----	32
1.9. Encapsulamento da GSNO em nanopartículas de quitosana -----	33
2. HIPÓTESE-----	35
3. OBJETIVOS -----	36
3.1. Objetivos específicos-----	36
4. METODOLOGIA -----	37
4.2. Animais -----	37
4.2.1. Protocolo agudo -----	37
4.2.2. Protocolo crônico -----	39
4.3. Ensaio bioquímico-----	40
4.3.1. Ensaio de quantificação de nitrato plasmático e tecidual -----	40
4.3.2. Ensaio de quantificação de nitrito plasmático e tecidual -----	41
4.3.3. Ensaio de quantificação de espécies nitrosadas e nitrosotióis -----	41
4.4. Análise Estatística-----	42
5. RESULTADOS -----	43
5.1. Efeito do tratamento agudo nos animais normotensos e hipertensos L-NAME	43
5.1.1. Semelhança entre o efeito hipotensor agudo da GSNO livre e nanoencapsulada-----	43
5.1.2. Efeitos do tratamento agudo sobre as concentrações plasmáticas dos metabólitos do NO -----	46
5.1.3. Tratamento com GSNO-NP não aumenta as concentrações de metabólitos do NO na aorta -----	49
5.1.4. Efeito do tratamento agudo com GSNO-NP nos metabólitos do NO no coração e fígado	50
5.1.5. Tratamento agudo com GSNO-NP aumenta as concentrações de metabólitos do NO no estômago -----	56

5.2. Efeito do tratamento crônico nos animais hipertensos L-NAME -----	59
5.2.1. Ausência de efeito hipotensor crônico da GSNO livre e nanoencapsulada -	59
5.2.2. Tratamento crônico com GSNO-NP não aumenta as concentrações de metabólitos do NO na aorta, plasma e coração -----	60
5.2.3. Tratamento crônico com GSNO-NP aumenta as concentrações de RXNO no estômago e fígado -----	62
6. DISCUSSÃO -----	64
7. CONCLUSÃO-----	71
REFERÊNCIAS -----	72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão arterial: Conceito, fatores de risco e epidemiologia

A hipertensão arterial é caracterizada por níveis aumentados e sustentados da pressão arterial. Um indivíduo, para ser considerado hipertenso, precisa apresentar pressão arterial sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mmHg (MALACHIAS et. al., 2016). A hipertensão arterial essencial, responsável por 90% dos casos, ainda não tem causa definida, sendo um conjunto de fatores de risco facilitadores para o desenvolvimento desta doença (DINH et al., 2014), são eles:

- Excesso de ingestão de sal – mais de 60% dos brasileiros consomem quantidades de sódio acima do considerado seguro para saúde (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2011);

- Consumo excessivo de bebidas alcoólicas – cerca de 24% de indivíduos maiores de 18 anos consomem bebidas alcoólicas uma vez na semana ou mais (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014). O Estudo Longitudinal da Saúde dos Idosos (ESLI) demonstrou que 96,9% dos indivíduos hipertensos consomem bebidas alcólicas (FIRMO et al., 2019);

- Sedentarismo – 46% dos adultos brasileiros são considerados insuficientemente ativos. Os praticantes de atividade física regular (150 minutos/semana) somam apenas 22,5% da população (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014). Entre os indivíduos hipertensos, a prática de pelo menos 150 minutos de atividade física é observada apenas em 62,2% dos indivíduos (FIRMO et al., 2019);

- Excesso de peso e obesidade – o índice de massa corpórea (IMC) é indicador de risco de diversas doenças crônicas não transmissíveis, dentre elas hipertensão arterial (FOROUZANFAR et al., 2016). Um estudo conduzido nas capitais brasileiras demonstrou que 55% dos brasileiros apresentam $IMC \geq 25Kg/m^2$ e 19,8% são obesos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019);

- Fatores socioeconômicos – fatores como renda e escolaridade interferem significativamente nas condições de moradia, alimentação, exposição ao estresse

entre outros fatores desencadeadores da hipertensão arterial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013);

- Estresse – a prevalência da hipertensão arterial tem aumentado com a exposição permanente ao estresse, associada ao baixo controle do estresse (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013);

- Sexo – no Brasil, há maior prevalência de hipertensão arterial em mulheres (24,2%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014);

- Etnia – no Brasil, 24% dos indivíduos hipertensos são negros, porção maior que indivíduos brancos (22,1%) e pardos (20,0%) (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014);

- Idade – dados demonstram que com o avanço da idade, há maior incidência de hipertensão arterial. Indivíduos acima de 60 anos representam mais de 50% da população hipertensa (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2014);

- Fatores genéticos – sabe-se que existem fatores genéticos relacionados à hipertensão arterial, no entanto, no Brasil ainda não foi definido nenhum padrão genético associado ao desenvolvimento desta doença (KIMURA et al., 2012).

Mais de 1,1 bilhão de pessoas no mundo sofrem com pressão arterial elevada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). No Brasil, a hipertensão arterial acomete cerca de 32,4% da população adulta (MALACHIAS et. al., 2016). A pressão arterial elevada é fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares que são responsáveis por mais de 17 milhões de mortes por ano, desse total, 9 milhões de mortes são consequência direta da hipertensão arterial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013). Em 2010, a hipertensão arterial foi a maior causa única de mortes no mundo (POULTER; PRABHAKARAN; CAULFIELD, 2015)

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) menos de 1 em cada 5 indivíduos hipertensos apresenta um quadro de hipertensão arterial controlada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). No que diz respeito à hipertensão arterial resistente, os dados epidemiológicos divergem entre si, reportando que dentre os indivíduos hipertensos 7% a 66% possuem hipertensão arterial resistente (BRAAM et al., 2017; HYMAN; PAVLIK, 2015; WEI et al., 2018). Nos Estados Unidos, cerca de 53% dos adultos hipertensos que fazem terapia medicamentosa apresentam pressão arterial não controlada (CASEY et al., 2019). Já no Brasil, apenas 50,7% dos

indivíduos hipertensos que fazem uso de medicamentos anti-hipertensivos, possuem pressão arterial controlada (FIRMO et al., 2019). É importante considerar a dificuldade de mensurar os motivos da falta de controle da pressão arterial, como por exemplo a falta de mudança no estilo de vida do indivíduo ou a baixa adesão ao tratamento medicamentoso (BRAAM et al., 2017). Entretanto, é fato que parte dos indivíduos hipertensos não respondem ao tratamento medicamentoso, evidenciando a necessidade de novas abordagens terapêuticas e medicamentosas para controle da pressão arterial.

1.2. Óxido nítrico: síntese e seu papel na homeostase vascular

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, lipofílica, altamente reativa e de meia vida muito curta (STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992). A importância biológica desta molécula no sistema cardiovascular por muito tempo permaneceu desconhecida, até que na década 1980 o seu papel no relaxamento vascular foi descrito (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO et al., 1987; PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Desde então, além do seu papel crucial no controle do tônus vascular, já estão bem descritas suas atividades na diminuição da agregação plaquetária (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1987), na modulação da adesão leucocitária ao endotélio (KUBES; SUZUKI; GRANGER, 1991) e na regulação da proliferação do músculo liso (JEREMY et al., 1999).

No sistema vascular o NO é sintetizado principalmente pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS3), maiormente encontrada na célula endotelial. A eNOS utiliza a L-arginina como substrato e necessita da presença do oxigênio além dos cofatores nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e tetraidrobiopterina (BH_4) para a síntese de L-citrulina e NO. O NO sintetizado é difundido passivamente para a célula muscular lisa onde ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs). A GCs sintetiza monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) a partir de trifosfato de guanosina (GTP). O GMPc ativa a proteína kinase G (PKG) que por diferentes mecanismos diminui a concentração de cálcio intracelular levando ao vasorelaxamento (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018).

O NO sintetizado enzimaticamente sofre oxidação gerando os metabólitos nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), que por muito tempo foram considerados metabólitos

inertes do NO $\cdot$ (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). No entanto, atualmente é conhecida a participação do nitrato e do nitrito como via alternativa para a síntese de NO, a via nitrato-nitrito-NO, principalmente em situação de hipóxia (DUNCAN et al., 1995; ZWEIER et al., 1995). Esta via depende principalmente do ciclo enterro-salivar do nitrato no qual o nitrato obtido na dieta é absorvido pelo trato gastrointestinal e logo em seguida para a corrente sanguínea. Cerca de 25% do nitrato plasmático, seja oriundo da dieta ou da oxidação do nitrito, acumula-se nas glândulas salivares. Uma vez secretado na saliva, o nitrato é reduzido a nitrito pelas bactérias comensais da boca que possuem a enzima nitrato redutase. O nitrito é então deglutido e no ambiente ácido do estômago é reduzido a NO e espécies nitrosadas. Adicionalmente, parte do nitrito é absorvido e pode ser convertido a NO pelas enzimas nitrito redutase, como xantina oxidoreductase, ou por hemoglobina, mioglobina e ascorbato (DUNCAN et al., 1995; LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008).

Os mecanismos envolvidos na síntese de NO estão resumidos na Figura 1.

Figura 1. Mecanismos envolvidos na síntese de óxido nítrico. Na célula endotelial vascular o NO é sintetizado pela enzima eNOS a partir da L-arginina, uma vez na corrente sanguínea o NO pode ser oxidado do nitrito e este a nitrato. Além disso, o NO pode ser sintetizado a partir do nitrato e nitrito pela via nitrato-nitrito-NO, a qual depende do ciclo enterro-salivar do nitrato e das enzimas nitrato e nitrito redutases. Adaptado de: LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015; LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008.

1.3. Deficiência de óxido nítrico na hipertensão arterial

Diversos estudos evidenciam a deficiência de NO no quadro clínico da hipertensão arterial (GKALIAGKOUSI et al., 2009). Indivíduos hipertensos apresentam menor resposta vasodilatadora à acetilcolina (relaxamento dependente de endotélio) quando comparados com indivíduos normotensos, não havendo diferença na resposta vasodilatadora após infusão de um doador de NO, ou seja, não há diferença entre os grupos na resposta vasodilatadora independente de endotélio (LINDER et al., 1990). Além disso, sabe-se que em modelos animais a depleção de NO resulta em hipertensão arterial. Animais knockout para eNOS apresentam elevação da pressão arterial em aproximadamente 20 mmHg em relação ao controle (HUANG et al., 1995), e inibidores da eNOS, como o N(ω)-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), são utilizados como modelo de indução da hipertensão arterial (CAMPBELL, 2006).

A diminuição da disponibilidade de NO no endotélio vascular, em paralelo ao aumento da produção de fatores contráteis, caracteriza a disfunção endotelial, comprometendo assim a capacidade de relaxamento vascular e o controle da resistência vascular periférica (SAXENA; ALI; SAXENA, 2018). GKALIAGKOUSI e colaboradores sugerem que não apenas a síntese de NO está comprometida na hipertensão arterial, mas também a sua contribuição para a manutenção do tônus vascular. Assim, a deficiência de NO pode resultar tanto da redução da síntese de NO como do aumento do consumo de NO (GKALIAGKOUSI et al., 2009).

A síntese de NO pode ser diminuída pelo aumento da concentração do inibidor endógeno da eNOS, a dimetilarginina assimétrica (ADMA). Inclusive já foi demonstrado que indivíduos hipertensos apresentam aumentos nas concentrações plasmáticas de ADMA, resultando na diminuição da síntese de NO (BÖGER et al., 2009). Além disso, o aumento do estresse oxidativo na hipertensão arterial também leva à diminuição da síntese de NO. As espécies reativas de oxigênio oxidam um dos principais cofatores da enzima eNOS, o BH₄, que é responsável pelo acoplamento e estabilidade da forma dimérica da eNOS. Uma vez oxidado, o BH₄ é convertido a diidrobipterina (BH₂), o que favorece o desacoplamento da eNOS. Nesta situação, a eNOS passa a utilizar O₂ como substrato, em detrimento do uso da L-arginina para síntese de NO, sintetizando o ânion superóxido (O₂⁻), aumentando ainda mais o

estresse oxidativo e reduzindo a síntese de NO (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018).

O aumento do estresse oxidativo também pode diminuir a disponibilidade de NO, por aumentar o seu sequestro por espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs, principalmente o O_2^- , são fatores pró-oxidantes que podem atuar como sequestradores de NO. O O_2^- reage com o NO formando o peroxinitrito ($ONOO^-$), espécie relacionada com o estresse nitro-oxidativo (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018). Além disso, essas espécies reativas podem oxidar as GCs, particularmente ao interagir com seu sítio ferroso de ligação ao NO, que é oxidado à forma férrica, tornando-o resistente ao NO, o que impede sua atividade dependente de GCs (LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015).

Todos esses eventos citados anteriormente, em conjunto, reduzem a disponibilidade de NO e levam ao desenvolvimento da disfunção endotelial, como ilustrado na Figura 2.

Figura 2. Mecanismos envolvidos na diminuição de NO na disfunção endotelial. Em condições saudáveis na célula endotelial, o NO é sintetizado pela eNOS na presença de L-arginina e de cofatores, como o BH₄. O NO difunde-se para a célula muscular lisa, liga-se ao Fe²⁺ da GCs, resultando na vasodilatação. Na disfunção endotelial, a presença do estresse oxidativo leva à diminuição da síntese de NO por oxidação do Fe²⁺ da GCs e além do sequestro do NO por espécies reativas de oxigênio, com peroxinitrito. Adaptado de: LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015.

1.4. Metabólitos do óxido nítrico e sua importância para o sistema cardiovascular

O NO, por ter um elétron desemparelhado, apresenta característica radicalar, podendo rapidamente reagir com outros radicais livres. Assim, o NO possui tempo de meia vida muito curta, estimado entre 0,1 e 6 segundos (KELM et al., 1988; MARCONDES et al., 2002). Ao sofrer auto oxidação o NO pode ser convertido em nitrito, e este, posteriormente, convertido a nitrato (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). As reações entre NO e O₂ ainda podem dar origem a espécies reativas como N₂O₃ e ONOO⁻. Reações de nitrosação também fazem parte das principais reações do NO, e consistem em reações com moléculas que possuem o grupamento sulfidril (-SH) e amina (-NH). Vale ressaltar também que o NO reage facilmente com metais, por meio de reações de nitrosilação, principalmente presentes em proteínas como citocromo C, GCs e hemoglobina. Assim, o NO pode interagir com diversos alvos biológicos e formar espécies nitrosadas, nitrosotióis, nitrosaminas e compostos ferro-nitrosos (NAGABABU; RIFKIND, 2013).

Por muito tempo acreditava-se que o nitrito e o nitrato eram metabólitos com potencial tóxico devido à participação na formação de metahemoglobina e N-nitrosaminas (TANG; JIANG; BRYAN, 2011). Atualmente sabe-se que a formação de metahemoglobina pelo nitrito e nitrato tem pouca ou nenhuma relevância clínica quando estes são utilizados nas doses usuais (DEJAM et al., 2007; PLUTA et al., 2011). Além disso, por aumentar a disponibilidade de óxido nítrico, o efeito protetor cardiovascular destes metabólitos está sendo cada vez mais explorado. Estudos demonstram o aumento do fluxo sanguíneo e redução da pressão arterial média em humanos após tratamento com nitrito (DEJAM et al., 2007; PLUTA et al., 2011) e com nitrato (KAPIL et al., 2010; WEBB et al., 2008). Em paralelo, diversos estudos animais evidenciam que o nitrito melhora função cardíaca em ratos hipertensos (NETO-NEVES et al., 2019) e tem efeito cardioprotetor em modelo de isquemia e reperfusão (DURANSKI et al., 2005).

O efeito anti-hipertensivo do nitrito e do nitrato tem sido associado à produção endógena de nitrosotióis. A relevância clínica da formação de nitrosotióis foi demonstrada em um estudo clínico, no qual a infusão endovenosa de NO foi acompanhada de queda da pressão arterial média e aumento do fluxo sanguíneo na arterial braquial com correspondente aumento de nitrosotióis plasmáticos (RASSAF et

al., 2002). Pinheiro e colaboradores demonstraram em um modelo animal de hipertensão arterial que os efeitos anti-hipertensivos do nitrito dependem da formação de nitrosotióis no ambiente ácido do estômago (PINHEIRO et al., 2015). Outro exemplo é a melhora da função cardíaca de ratos hipertensos tratados com nitrito, efeito este observado em paralelo ao aumento de nitrosotióis (NETO-NEVES et al., 2019).

Diante o exposto, pode-se notar que o nitrato e o nitrito são metabólitos do NO com reconhecida relevância terapêutica no contexto da hipertensão arterial, no entanto, existem outras espécies derivadas do NO, como os nitrosotióis, com promissor efeito terapêutico.

1.5. Nitrosotióis

Os nitrosotióis são espécies nitrosadas formadas por uma molécula ou proteína com grupamento sulfidríla ou tiol (-SH) em sua composição e um NO. A síntese endógena de nitrosotióis depende de um ambiente redox que favoreça a formação prévia de espécies nitrosantes a partir do NO, uma vez que a reação entre NO e um tiol livre não acontece espontaneamente em situações fisiológicas (NAGABABU; RIFKIND, 2013; WYNIA-SMITH; SMITH, 2017). Diversos estudos têm reportado o papel dual dos nitrosotióis, uma vez que concentrações baixas ou excessivas dos mesmos estão associados ao desenvolvimento de diferentes doenças (CHOI, 2018; FOSTER; HESS; STAMLER, 2009; WOLHUTER; EATON, 2017).

Os nitrosotióis podem ser formados a partir da auto oxidação do NO, da combinação radicalar entre NO e um radical til e por uma reação catalisada por metais, como pode ser visto na Figura 3 (WOLHUTER; EATON, 2017; WYNIA-SMITH; SMITH, 2017; ZHANG et al., 2017).

Figura 3. Síntese de nitrosotióis (RSNO). A síntese de RSNO exige um ambiente redox que favoreça a síntese de espécies nitrosantes. O NO pode reagir com metais e formar intermediários que transfira o NO para um tiol. Outras espécies nitrosantes, como N_2O_3 e N_2O_4 podem ser formadas a partir da oxidação do NO. Ainda, radicais tiila ($\text{RS}^\bullet$) podem reagir com NO levando a formação de RSNO. Uma vez formados, os RSNO podem sofrer reações de transnitrosação. Fonte: (WOLHUTER; EATON, 2017).

As reações entre metais e o NO são também conhecidas como reações de nitrosilação, e acontecem por meio da adição do NO a um metal de transição, principalmente ferro e cobre (TOLEDO; AUGUSTO, 2012; WYNIA-SMITH; SMITH, 2017). As espécies nitrosiladas, por sua vez, podem reagir com tíóis livres formando os nitrosotióis. Uma vez sintetizados, os nitrosotióis também podem formar outros nitrosotióis por meio de reações de transnitrosação, que consistem na transferência do NO^+ de um tiol para outro. Para que a transnitrosação aconteça é necessário que as proteínas apresentem potencial redox favorável para que a interação entre elas ocorra (BRONIOWSKA; DIERS; HOGG, 2013; CHOI, 2018).

Os nitrosotióis são classificados em nitrosotióis de baixo peso molecular e S-nitroso-proteínas, dependendo do tiol acoplado à molécula de NO. Os principais nitrosotióis de baixo peso molecular são formados pela cisteína (CSH) e glutathiona (GSH), as quais formam a nitrosocisteína (CSNO) e nitrosoglutationa (GSNO), respectivamente (CHOI, 2018). As S-nitroso-proteínas são nitrosotióis de alto peso molecular formados basicamente por proteínas que possuem resíduos de cisteína em sua composição, como por exemplo a nitrosoalbumina (STOMBERSKI; HESS; STAMLER, 2019).

As funções biológicas dos nitrosotíóis aparentemente são muito similares às do NO, assim, os nitrosotíóis são considerados reservatórios endógenos de NO, preservando sua função biológica por mais tempo e permitindo sua atuação em locais distantes da sua síntese (GIUSTARINI et al., 2003; LIU et al., 2018; PERRIN-SARRADO et al., 2019). Além de possuir efeito vasodilatador (KASHIBA et al., 1999), os nitrosotíóis exibem atividade inibitória frente à agregação plaquetária (RADOMSKI et al., 1992), inibem a proliferação do músculo liso (GARG; HASSID, 1993) e a adesão de leucócitos ao endotélio vascular (GLUCKMAN et al., 2000). Essas características são interessantes principalmente em situações de deficiência de NO e disfunção endotelial, no intuito de manter a homeostase e função vascular (PERRIN-SARRADO et al., 2019; STAMLER, 2004).

Os nitrosotíóis também atuam via nitroação proteica. Nos últimos anos as reações de nitroação proteica, bem com as de transnitroação, tem sido consideradas modificações pós-traducionais, muitas vezes referidas com importância similar às reações de fosforilação (ANAND; STAMLER, 2012; MAROZKINA; GASTON, 2012). Essa modificação proteica altera a função das proteínas nitrosadas, interação proteína-proteína e localização celular, alterando a fisiologia e fisiopatologia do sistema relacionado (CHIESA; BAIDANOFF; GOLOMBEK, 2018; STOMBERSKI; HESS; STAMLER, 2019).

A nitroação proteica tem sido correlacionada com efeitos benéficos no sistema cardiovascular (HALDAR; STAMLER, 2013). A nitroação do receptor de angiotensina do tipo AT1 diminui a afinidade deste agonista por seu receptor, diminuindo a resposta constritora frente à angiotensina II (BOURESSAM et al., 2019; LECLERC et al., 2006). Também já foi demonstrado que a nitroação da proteína GRK2 envolvida na fosforilação e recaptação de receptores B-adrenérgicos (presentes principalmente no coração) preveniu a fosforilação, e consequentemente reduziu a dessensibilização e recaptação deste receptor. Esta modificação pós-traducional *in vivo* pode restaurar esta via de sinalização prejudicada em situações patológicas associadas à deficiência de NO, como a hipertensão arterial (WHALEN et al., 2007).

1.6. S-Nitrosoglutathione e seu papel terapêutico no sistema cardiovascular

Dentre os nitrosotíóis endógenos mais abundantes está a S-nitrosoglutathione (Figura 4) um nitrosotíol de baixo peso molecular formado a partir de um tiol muito abundante nas células, a GSH (BRONIOWSKA; DIERS; HOGG, 2013). Endogenamente a GSNO é sintetizada principalmente num processo de uma transferência de um grupo nitrosil para uma molécula de GSH, que pode ser intermediado pelo citocromo C férrico (BRONIOWSKA et al., 2012).

Figura 4. Estrutura química da GSNO

A GSNO é considerada o maior armazenamento endógeno de NO, tendo o benefício de ser ainda mais estável e não induzir tolerância semelhante aos nitratos orgânicos em estudos clínicos preliminares (BELCASTRO et al., 2017). Adicionalmente, na maioria dos ensaios clínicos conduzidos com o uso da GSNO poucos eventos adversos foram reportados, dentre eles estão hipotensão, palpitação e dor de cabeça (PARENT et al., 2013; RAMSAY et al., 1995). Portanto, o potencial terapêutico da GSNO tem sido cada vez mais explorado em diversas doenças cardiovasculares.

Dentre os efeitos cardiovasculares da GSNO, a atividade antiagregante plaquetária é a mais explorada clinicamente. Salas e colaboradores demonstraram que o tratamento com GSNO diminui ativação da agregação plaquetária (SALAS et al., 1998). Este efeito é observado em baixas doses, inclusive em doses que não interferem na pressão arterial média dos indivíduos (LANGFORD et al., 1994; RAMSAY et al., 1995). Estudos mostram que a atividade antiagregante plaquetária da GSNO reduziu sinais de embolia por 24h após 90 minutos de infusão em pacientes com estenose sintomática na carótida (KAPOSZTA; MARTIN; MARKUS, 2002), além de reduzir embolia pós-operatória em pacientes submetidos a endarterectomia

(KAPOSZTA et al., 2001; MOLLOY et al., 1998) e angioplastia da carótida (KAPOSZTA et al., 2002), efeito colateral comum nesses tipos de procedimento.

Adicionalmente, o efeito vasodilador da GSNO já está bem descrito na literatura (RASSAF et al., 2002; RING et al., 2010; SOGO et al., 2000). A administração endovenosa da GSNO resulta em vasodilatação tanto em vasos de resistência quanto em vasos de condutância, aumentando o diâmetro dos vasos e o fluxo sanguíneo (RASSAF et al., 2002). Já foi demonstrado também que a GSNO inibe a vasoconstrição de artéria pulmonar por impedir a ativação de receptores alfa-1 adrenérgicos (NOZIK-GRAYCK et al., 2005) e da artéria cerebral por impedir a ativação de receptores AT-1 (BOURESSAM et al., 2019). Assim, o uso da GSNO tem sido sugerido como alternativa para diminuir a disfunção endotelial, uma vez que há indícios de acúmulo de nitrosotióis nos vasos sanguíneos, aumentando a disponibilidade de NO e reduzindo o efeito constritor frente a agentes contrateis (PERRIN-SARRADO et al., 2019).

O efeito sistêmico da GSNO resulta na diminuição da pressão arterial, efeito evidenciado inicialmente em animais normotensos e anestesiados (ISHIBASHI et al., 2011; KASHIBA et al., 1999). Este efeito também foi observado em animais não anestesiados e em estudos clínicos. O tempo de duração e intensidade do efeito hipotensor da GSNO varia entre os estudos, dependendo da dose e da forma de administração utilizadas (ISHIBASHI et al., 2011; KASHIBA et al., 1999; PARENT et al., 2015; RAMSAY et al., 1995; RASSAF et al., 2002, 2006). Além de reduzir a pressão arterial, a GSNO melhora a função cardíaca, por aumentar o índice de volume sistólico e melhorar a função ventricular (RASSAF et al., 2006).

Assim, devido ao seu potente efeito vasodilatador e, consequentemente hipotensor, a GSNO é considerada uma molécula promissora para o tratamento da hipertensão arterial. No entanto, a GSNO ainda não tem sido utilizada como fármaco anti-hipertensivo.

1.7. Desafios para o uso terapêutico da S-nitrosoglutathione

Mesmo com efeito terapêutico comprovado, como demonstrado em tópicos anteriores, o uso clínico da GSNO ainda é um desafio. As dificuldades do uso da GSNO como ferramenta farmacoterapêutica estão associadas ao seu curto tempo de

meia vida e rápida degradação (HEIKAL; MARTIN; DAILEY, 2009). O tempo estimado de meia vida da GSNO *in vitro* é de 50 minutos (KASHIBA et al., 1999). No entanto, o tempo de meia vida *in vivo* da GSNO é de aproximadamente 5 minutos (LIU et al., 2016). O curto tempo de meia vida da GSNO é resultado da sua susceptibilidade a diferentes fontes de decomposição (BRONIOWSKA; DIERS; HOGG, 2013; HEIKAL; MARTIN; DAILEY, 2009).

A taxa de decomposição da GSNO depende de uma variedade de fatores, sendo eles não enzimáticos e enzimáticos (HEIKAL; MARTIN; DAILEY, 2009). Os fatores não enzimáticos estão associados à degradação *in vitro* da GSNO (BELCASTRO et al., 2017). Dentre estes fatores pode-se citar a exposição a luz UV, a elevadas temperaturas e ao pH do meio; a GSNO mostra-se mais estável em pH baixo, baixas temperaturas e quando protegida da luz (HEIKAL; MARTIN; DAILEY, 2009). A degradação da GSNO também pode ser catalisada rapidamente por metais de transição, como ferro e cobre, porém, mesmo com a presença significativa de metais em sistemas biológicos, o rápido sequestro de metais por proteínas torna a reação com metais pouco relevante na degradação da GSNO *in vivo* (BENHAR; FORRESTER; STAMLER, 2009).

A maior parcela de degradação da GSNO *in vivo* deve-se à mecanismos dependentes de enzimas. Os sistemas enzimáticos de degradação de nitrosotíóis englobam denitrosilases de nitrosotíóis de baixo peso molecular, como a nitrosoglutationa redutase (GSNOR) e SNO-CoA redutase e as denitrosilases de proteínas, como o sistema da tioredoxina (STOMBERSKI; HESS; STAMLER, 2019). O sistema tioredoxina é composto por tioredoxina, tioredoxina redutase e NADPH, e é importante regulador de vias de sinalização e função proteica, por mediar reações de denitrosação e transnitrosação proteica. Por mais que este complexo enzimático tenha maior atuação em proteínas, também tem participação na degradação da GSNO (ARAI et al., 2008; NIKITOVIC; HOLMGREN, 1996).

No entanto, a principal enzima que controla a disponibilidade endógena da GSNO é a GSNOR ou álcool desidrogenase 5. Esta enzima utiliza o NADH como cofator para reduzir a GSNO a um produto intermediário, o GSNHOH, que pode interagir com GSH e formar GSSH e NH_2OH ou pode sofrer hidrólise a GSO_2H e amônia (BRONIOWSKA; DIERS; HOGG, 2013; WOLHUTER; EATON, 2017). Em ambos casos, a degradação da GSNO não libera NO, o que impede seus efeitos benéficos mediados pelo NO e pela nitrosação proteica. A importância biológica desse

mecanismo de degradação da GSNO é evidenciada através da inibição ou deleção da GSNOR como mecanismo protetor para doenças cardiovasculares (CHOI, 2018; HATZISTERGOS et al., 2015; LIMA et al., 2009).

Diante do exposto, são diversos os mecanismos de degradação da GSNO, que resultam no seu curto tempo de meia vida. Assim, é necessário buscar por alternativas que diminuam a taxa de degradação da GSNO, no intuito de possibilitar o uso desta molécula para o tratamento da hipertensão arterial.

1.8. Nanoencapsulamento da nitrosoglutationa

Os avanços da nanotecnologia na medicina abriram portas para o desenvolvimento de partículas transportadoras de fármacos, o que possibilitou novas abordagens terapêuticas mais seguras e específicas. O uso de nanopartículas (NP) como carreadores de fármacos tem especial relevância uma vez que o tamanho na escala nanométrica confere a estas partículas uma maior área de superfície de contato e facilidade de atravessar membranas (WILCZEWSKA et al., 2012). Outras vantagens do nanoencapsulamento são o controle de liberação dos fármacos e a proteção contra mecanismos de degradação (ÖZTÜRK-ATAR; EROĞLU; ÇALIŞ, 2018).

Assim, uma alternativa para o uso da GSNO na clínica seria encapsular esta molécula em nanopartículas para protegê-la contra degradação, e com isso, prolongar o seu efeito farmacológico (WU et al., 2015a, 2016). Nesse sentido, estudos *in vitro* mostram a superioridade do tratamento com GSNO nanoencapsulado em relação ao GSNO livre. Wu e colaboradores observaram que em cultura de células musculares lisas, ocorria uma redução nos níveis de nitrosotiois após 4 horas de tratamento com GSNO livre, enquanto que o tratamento com GSNO nanoencapsulado ainda apresentou níveis elevados de nitrosotiois mesmo após 18 horas de tratamento (WU et al., 2015a).

Ainda em estudos *in vitro*, foi demonstrado que a viabilidade celular após tratamento com GSNO livre e nanoencapsulada foi significativamente maior em cultura de células de fibroblastos tratadas com GSNO nanoencapsulado (mais de 80% de viabilidade) e mesmo sem atividade citotóxica, o tratamento com GSNO encapsulada apresentou atividade de cicatrização de feridas e atividade antibacteriana (HLAING et

al., 2018). Marcato e colaboradores também mostraram que a GSNO nanoencapsulada não apresentou toxicidade celular, em contraste com a citotoxicidade observada em células tratadas com GSNO livre (MARCATO et al., 2013)

São poucos os estudos que abordam o uso da GSNO encapsulada *in vivo* ou *ex vivo*. Wu e colaboradores observaram, após dose única de tratamento com GSNO nanoencapsulada, diminuição da contratilidade induzida por fenilefrina em aorta de ratos após 17 horas de tratamento, não sendo observado o mesmo efeito no grupo GSNO livre (WU et al., 2016). Em outro estudo, o uso de micropartículas de GSNO utilizadas em modelo animal de acidente vascular encefálico (AVE) reduziu a área infartada, agregação plaquetária e edema após o AVE (PARENT et al., 2015). Portanto, os estudos disponíveis até o momento demonstram as vantagens do nanoencapsulamento da GSNO, sendo assim esta abordagem terapêutica precisa ser mais explorada, principalmente em estudos *in vivo*.

1.9. Encapsulamento da GSNO em nanopartículas de quitosana

A quitosana (CS) é um polissacarídeo obtido da desacetilação da quitina, substância oriunda do exoesqueleto de crustáceos. A aplicabilidade da quitosana em sistemas de liberação de fármacos tem aumentado devido às suas características antimicrobiana, antioxidante, bem como por ter propriedades mucoadesivas (SEABRA; DURÁN, 2010). A propriedade mucoadesiva da quitosana confere benefícios quando administrado por via oral uma vez que permite uma interação mais prolongada no muco gastrointestinal, além de ter a capacidade de abrir as junções oclusivas das células aumentando a permeabilidade e absorção gastrointestinal (SHARIATINIA, 2019; WU et al., 2015a). Assim, a grande vantagem da quitosana é a maior absorção intestinal e consequentemente maior biodisponibilidade de drogas administradas por via oral (WU et al., 2016).

Os estudos sobre o uso terapêutico da GSNO conduzidos em animais e em humanos disponíveis até o momento utilizam prioritariamente as vias de administração endovenosa e subcutânea, havendo poucos relatos do uso da GSNO por via oral. Pensando no uso da GSNO para o tratamento da hipertensão arterial, a utilização da via de administração oral torna-se mais interessante pensando em

comodidade e facilidade posológica (DATE; HANES; ENSIGN, 2016). Assim, o uso da quitosana como matriz polimérica para o desenvolvimento de nanopartículas com GSNO para uso por via oral torna-se uma alternativa promissora (SHARIATINIA, 2019).

A nanopartícula de quitosana desenvolvida por Pelegrino e colaboradores mostra-se uma alternativa próspera a para o encapsulamento de doadores de NO (PELEGRINO et al., 2017a). Até o momento já foram explorados os efeitos de doadores de NO (ácido S-nitroso-mercaptosuccínico) nesta nanopartícula de quitosana em modelos *in vitro* de crescimento tumoral (PELEGRINO et al., 2017b) e atividade parasitária (CABRAL et al., 2019; SEABRA et al., 2015). Também foi demonstrado que a nanopartícula de quitosana desenvolvida não apresenta toxicidade em cultura celular de macrófagos (SEABRA et al., 2015). Em relação à GSNO, o encapsulamento deste nitrosotíol nesta nanopartícula aumentou a disponibilidade de NO após incubação *ex vivo* em pele humana (PELEGRINO et al., 2017a). No entanto, ainda não foi explorada a utilização da GSNO em nanopartícula de quitosana em modelos *in vivo* de hipertensão arterial.

2. HIPÓTESE

Tendo em vista que a S-nitrosoglutathione é um potente vasodilatador e redutor da pressão arterial, porém de rápida degradação, ainda existe dificuldade no seu uso terapêutico para hipertensão arterial por via oral. Assim, a hipótese deste trabalho é que o tratamento com GSNO encapsulado em nanopartículas de quitosana apresenta efeito anti-hipertensivo prolongado comparado ao tratamento com GSNO livre em modelo de hipertensão animal induzida por L-NAME.

3. OBJETIVOS

Avaliar comparativamente o efeito anti-hipertensivo do tratamento com nitrosoglutationa livre e nanoencapsulada por via oral em modelo animal de hipertensão arterial e investigar alterações nos metabólitos do NO.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar se há diferença nas respostas pressóricas em ratos hipertensos e normotensos após tratamento agudo com GSNO livre e GSNO encapsulada, por via oral;
- Avaliar se há diferença nas respostas pressóricas em ratos hipertensos após tratamento crônico com GSNO livre e GSNO encapsulada, por via oral;
- Determinar e comparar as concentrações teciduais e plasmáticas de nitrato, nitrito e espécies nitrosadas entre ratos normotensos e hipertensos após tratamento agudo com GSNO livre e GSNO encapsulada por via oral;
- Determinar e comparar as concentrações teciduais e plasmáticas de nitrito e espécies nitrosadas totais em ratos hipertensos após tratamento crônico com GSNO livre e GSNO encapsulada por via oral.

4. METODOLOGIA

4.1. Síntese das nanopartículas e nitroação do GSH encapsulado

A GSNO encapsulada em nanopartículas de quitosana (GSNO-NP) foi preparada por meio da técnica de gelificação ionotópica, como descrito por PELEGRINO et al., 2017. Brevemente, este método consiste, inicialmente, na mistura sob agitação magnética da quitosana (CS) e da GSH em solução ácida, seguida da adição de tripolifosfato de sódio (TPP) na proporção 3CS/GSH:1TPP. A mistura foi então agitada por 45 min em temperatura ambiente resultando na suspensão de GSH-NP. A nitroação da GSH nanoencapsulada e consequente formação da GSNO-NP foi realizada momentos antes da administração, através da adição de nitrito de sódio equimolar, em tubo protegido da luz a 4°C.

4.2. Animais

O estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob número de protocolo 0138/2017. Para realização do protocolo agudo, foram utilizados ratos machos Wistar (250-300g) provenientes do biotério central de Paulínia. Para o protocolo crônico, ratos machos Wistar Hannover (180-200 g) provenientes do biotério central da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto em ciclos claro-escuro de 12h em temperatura controlada (22 a 25° C), com acesso livre a água e comida.

4.2.1. Protocolo agudo

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, hipertensos e controles. A hipertensão foi induzida nos animais do grupo hipertensos através da administração de L-NAME por 10 dias na água de beber (1g/L). O L-NAME foi escolhido por ser um potente inibidor da oxido nítrico sintase, além de ser um bom indutor do aumento da pressão arterial após a primeira semana de tratamento

(MONTENEGRO et al., 2017). O grupo controle recebeu veículo (água) durante esse mesmo período. No 10º dia de tratamento os animais foram submetidos a uma cirurgia de canulação da artéria femoral. O procedimento foi realizado após indução de anestesia no animal através da administração intraperitoneal de Tribromoetanol (250mg/Kg). O procedimento consiste na inserção de um cateter de polietileno (2 cm PE-10 soldado a um cateter PE-50 de 18 cm) preenchido com salina heparinizada (50UI/mL) na artéria femoral do animal (JESPERSEN; KNUPP; NORTHCOTT, 2012). Os cateteres utilizados foram submetidos à siliconização interna com Sigmacote. Após indução anestésica e com o rato em posição supina foi feita uma incisão na área inguinal de aproximadamente 12 mm ao longo do ângulo natural da perna. Após exposição e isolamento da artéria femoral, o cateter foi inserido na artéria femoral. Ao final do procedimento, o cateter foi exteriorizado no dorso do animal e logo em seguida foi realizada analgesia (Fluxina meglumina 2,5 mg/kg, via subcutânea) e antibioticoterapia (Enrofloxaxino 10 mg/Kg, via subcutânea) pós-operatória. Aproximadamente 18 horas após a cirurgia, o cateter de cada animal foi conectado a um transdutor de sinal, acoplado a um sistema de aquisição de dados (Biopac Systems Inc. CA, USA) para o acompanhamento da pressão arterial invasiva. Após período de estabilização e registro da pressão arterial basal (30 min) os ratos foram tratados por gavagem e a pressão arterial registrada por um período de 60 minutos. Os ratos dos grupos hipertenso e controle foram separados nos seguintes subgrupos de tratamento: a) veículo (água acidificada); b) nanopartícula de quitosana vazia (NP); c) GSNO Livre (GSNO 50µmol/Kg); e d) GSNO encapsulado em nanopartículas de quitosana (GSNO-NP 50µmol/Kg). O protocolo agudo está sumarizado na Figura 5.

Figura 5. Protocolo experimental agudo

4.2.2. Protocolo crônico

Nos experimentos crônicos, ratos machos Wistar Hannover (180-200 g) foram submetidos à indução de hipertensão através da administração de L-NAME (1 g/L) na água de beber por duas semanas. Ao final da primeira semana, os ratos foram randomizados nos mesmos grupos de tratamento do protocolo agudo: veículo, NP, GSNO (100 µmol/ kg/dia) e GSNO-NP (100 µmol/ kg/dia). Os tratamentos foram realizados por meio de gavagens diárias.

A medida da pressão arterial sistólica (PAS) foi feita semanalmente pela pletismografia de cauda (CODA, KENT scientific). Durante as medidas de pressão, os animais ficaram imobilizados e tendo a cauda aquecida a 28-30 °C. Para minimizar os efeitos do estresse induzido pelo método de aferição da pressão, os animais foram submetidos a um período de aclimação. A medida de pressão arterial no décimo quarto dia foi realizada 6 horas após o último tratamento. O protocolo crônico está sumarizado na Figura 6.

Figura 6. Protocolo experimental crônico

4.3. Ensaios bioquímicos

Os ratos dos protocolos agudo e crônico foram eutanasiados com sobredose de Cetamina e Xilazina (140mg/Kg e 20mg/Kg), seguida de punção cardíaca para coleta de sangue. Após centrifugação a 3000 rpm a 4°C o plasma foi aliquotado em tubo âmbar contendo solução estabilizadora contendo NEM/DTPA (10mM/2mM). Logo em seguida, foi realizada administração de heparina (500UI) no ventrículo esquerdo do animal e este foi submetido à perfusão completa por uma solução estabilizadora de NEM/DTPA (10mM/2mM) preparada em tampão fosfato-salino (PBS pH 7,4). Amostras de aorta, coração, fígado e estômago foram coletadas para dosagens bioquímicas.

4.3.1. Ensaio de quantificação de nitrato plasmático e tecidual

Para quantificação de nitrato, as amostras foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio (LUNDBERG; GOVONI, 2004). Para tal, o plasma foi diluído na proporção de 1:10 em água ultrapura. As amostras de coração, fígado, aorta e estômago foram pesadas (10 mg para aorta e 100mg para demais tecidos) e homogeneizadas em PBS pH 7,4 para preparo do extrato tecidual. Cerca de 20 µl de amostra foi injetada no purge vessel em um sistema fechado contendo

solução ácida de cloreto de vanádio (63mM) a 95°C. O nitrato da amostra é reduzido a óxido nítrico que é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (Sievers 280i). O óxido nítrico formado reage com o ozônio resultando em quimiluminescência em intensidade diretamente proporcional à formação de NO. Os dados obtidos foram analisados pelo programa OriginPro 8.5.

4.3.2. Ensaio de quantificação de nitrito plasmático e tecidual

Para quantificação de nitrito, as amostras foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio (PELLETIER et al., 2006). Para tal, as amostras de coração, fígado, aorta e estômago foram pesadas (10 mg para aorta e 100mg para demais tecidos) e homogeneizadas em PBS pH 7,4 para preparo do extrato do tecidual. Cerca de 100 µl de amostra foi injetada no purge vessel em um sistema fechado contendo solução redutora de triiodeto (67mM Iodeto de potássio e 30mM Iodo em ácido acético glacial). O nitrito da amostra é reduzido a óxido nítrico que é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (EcoMedics CLD 88sp). O óxido nítrico formado reage com o ozônio resultando em quimiluminescência em intensidade diretamente proporcional à formação de NO. A aquisição dos dados bem como as análises foram realizadas através do software eDAQ Chart.

4.3.3. Ensaio de quantificação de espécies nitrosadas e nitrosotióis

As espécies nitrosadas e os nitrosotióis foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio (YANG et al., 2003). Amostras de tecido (100mg) foram homogeneizadas em PBS e aliqüotadas (450 µl) em 2 micro tubos âmbar. Em um tubo a solução de sulfanilamida (5% em ácido clorídrico 1M) foi adicionada à amostra na proporção de 10% do volume final da solução. Após 3 minutos de reação 400 µl da amostra foi injetada no purge vessel em um sistema fechado contendo solução de triiodeto acidificado (67mM Iodeto de potássio e 30mM Iodo em ácido acético glacial) (PELLETIER et al., 2006). Em outro tubo âmbar foi adicionado na amostra solução de cloreto de mercúrio (2%) por 2 min seguido da adição de sulfanilamida ácida (5% em ácido clorídrico 1M) por 3 min, ambas soluções são adicionadas na proporção de 10% do volume final da solução. Após o tempo de

reação especificado, 400 µl da amostra foram injetados no purge vessel como descrito anteriormente. As espécies nitrosadas da amostra são reduzidas a óxido nítrico que é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (EcoMedics CLD 88sp). O óxido nítrico formado reage com o ozônio resultando em quimiluminescência em intensidade diretamente proporcional à formação de NO. A aquisição dos dados bem como as análises foram realizadas através do software eDAQ Chart. A quantificação de nitrosotíóis presentes na amostra é feita através do cálculo da diferença entre o sinal detectado pelo conteúdo de espécies nitrosadas totais (amostra na presença de sulfanilamida ácida) e espécies nitrosadas resistentes à mercúrio (amostras na presença de sulfanilamida e mercúrio) .

4.4. Análise Estatística

Os dados de pressão arterial e frequência cardíaca foram representados em Média $\pm$ EPM. Os resultados bioquímicos foram representados em Mediana (Mínimo – Máximo). Os resultados foram analisados pela análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida da análise de múltiplas comparações de Turkey. Devido à não distribuição normal dos resultados das análises bioquímicas, foi realizada transformação matemática dos dados (escala logarítmica) previamente à realização do teste estatístico. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas as que obtiveram valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do tratamento agudo nos animais normotensos e hipertensos L-NAME

5.1.1. Semelhança entre o efeito hipotensor agudo da GSNO livre e nanoencapsulada

O efeito do tratamento agudo com GSNO livre e nanoencapsulado na pressão arterial média (PAM) dos ratos controle (normotensos) e hipertensos está representado na Figura 1. Inicialmente podemos observar diferença entre o valor médio basal da PAM dos animais controle, $102 \pm 1,6$ mmHg, (Figura 7A) e hipertensos, $150 \pm 2,2$ mmHg (Figura 7B) evidenciando que o tratamento com L-NAME aumentou a pressão arterial dos ratos tratados, demonstrando a eficácia do modelo utilizado. Os animais do grupo controle não apresentaram variação no parâmetro pressão arterial média, sendo os valores basais de PAM nos respectivos grupos de tratamento: veículo $102 \pm 2,8$ mmHg, NP $104 \pm 2,8$ mmHg, GSNO $100 \pm 2,0$ mmHg e GSNO-NP $100 \pm 1,8$ mmHg. Após o tratamento não foi observada diferença estatística nos tempos subsequentes em até uma hora.

Em relação aos animais hipertensos, os valores basais de pressão arterial média nos respectivos tratamentos foram: veículo $149 \pm 6,6$ mmHg, NP $153 \pm 2,8$ mmHg, GSNO $149 \pm 3,6$ mmHg e GSNO-NP $151 \pm 4,5$ mmHg, não apresentando diferença entre si.

Os animais hipertensos tratados com veículo e NP não apresentaram variação na pressão arterial média no período de 1h após administração do tratamento. Já os animais hipertensos tratados com GSNO e GSNO-NP apresentaram queda significativa na PAM em relação aos animais hipertensos veículo e NP nos primeiros minutos após a administração da droga. No tempo 4 minutos, o tratamento com GSNO reduziu a PAM em 45 mmHg em relação a grupo veículo e 49 mmHg em relação ao grupo NP. No tempo 8 minutos, a PAM persistiu reduzida, sendo estatisticamente diferente dos controles, no entanto 17% mais elevada do que no tempo 4 minutos. De modo similar, o grupo tratado com GSNO-NP apresentou queda significativa da PAM.

No tempo 4 minutos o GSNO-NP reduziu a PAM em 33 mmHg em relação aos grupos veículo e NP. No tempo 8 minutos a redução da PAM foi 24 mmHg em relação ao veículo e 31 mmHg em relação ao NP. Assim, pode-se notar que o grupo hipertenso GSNO-NP apresenta uma tendência em atenuar a queda da PAM em relação ao grupo GSNO, no entanto não existe diferença estatística entre o encapsulamento ou não da GSNO.

Após vinte minutos do tratamento os valores pressóricos dos animais retornaram a valores muito próximos dos basais, persistindo desta maneira até o final do protocolo.

Figura 7. Pressão arterial média invasiva de ratos controle (A) e hipertensos (B) tratados agudamente por via oral com veículo, NP, GSNO (50 μ mol/kg) e GSNO-NP (50 μ mol/kg). O tempo zero corresponde ao basal e tempos subsequentes correspondem aos momentos após administração do tratamento. Dados expressos em média $\pm$ EPM. (n=6-8). ** $P < 0,05$ vs Veículo e NP.

A frequência cardíaca após o tratamento também foi registrada e está representada na Figura 8.

Figura 8. Frequência cardíaca de ratos controle (A) e hipertensos (B) tratados agudamente por via oral com veículo, NP, GSNO (50 μ mol/kg) e GSNO-NP (50 μ mol/kg). O tempo zero corresponde ao basal e tempos subsequentes correspondem aos momentos após administração do tratamento. Dados expressos em média $\pm$ EPM (n=6-8). **P<0,05 vs Veículo e NP.

Não foi observada diferença na frequência cardíaca nos animais normotensos em nenhum dos grupos de tratamento (Figura 8A). Foi observado aumento similar na frequência cardíaca nos animais hipertensos tratados com GSNO e GSNO-NP, não sendo observado este efeito nos demais grupos avaliados (Figura 8B). O aumento máximo na frequência cardíaca foi observado no tempo 4 minutos no qual a frequência cardíaca aumentou 76 e 77 bpm nos grupos GSNO e GSNO-NP respectivamente.

Após vinte minutos do tratamento a frequência cardíaca dos animais retornou a valores muito próximos dos basais, persistindo desta maneira até o final do protocolo.

5.1.2. Efeitos do tratamento agudo sobre as concentrações plasmáticas dos metabólitos do NO

No protocolo agudo, não houve alteração na concentração plasmática de nitrato dos animais normotensos tratados (Figura 9A). No grupo hipertenso tratado com GSNO, a concentração plasmática média de nitrato foi 25,11 (14,99 – 37,70) μM e 33,26 (10,81 – 48,86) μM no grupo GSNO-NP, o que representa um aumento significativo em relação à concentração de nitrato nos animais tratados com veículo e NP, 11,08 (10,40 – 18,85) e 11,02 (6,38 – 33,22) μM respectivamente (Figura 9B). No entanto, não foi observada diferença estatística entre o grupo NP e GSNO. Não foi observada diferença na concentração de nitrato plasmático dos animais normotensos após o tratamento com GSNO livre e nanoencapsulado.

Na figura 9C, pode-se notar aumento de nitrito no plasma nos animais normotensos tratados com GSNO e GSNO-NP, cujas concentrações foram 1,42 (0,99 – 1,75) μM e 0,80 (0,53 – 1,43) μM , respectivamente. O aumento observado foi em relação aos grupos veículo e NP que apresentaram concentrações de 0,43 (0,19 – 0,59) μM e 0,42 (0,18 – 0,67) μM respectivamente. O nitrito plasmático dos ratos hipertensos aumentou significativamente nos grupos GSNO e GSNO-NP, com concentração de 0,68 (0,49 – 1,22) μM e 1,26 (0,42 – 2,33) μM vs 0,21 (0,17 – 0,36) μM e 0,20 (0,15 – 0,29) μM para os grupos veículo e NP, respectivamente (Figura 9D).

Nos animais normotensos também pode-se observar o aumento do RXNO plasmático (Figura 10A). A concentração observada foi 5,84 (1,44 – 9,12) nM para veículo, 3,60 (1,07 – 8,33) nM para o grupo NP, 9,47 (5,26 – 12,65) nM para o GSNO e 10,54 (2,12 – 29,80) nM para o grupo GSNO-NP. Não foram observados aumentos nas concentrações plasmáticas de RXNO, RSNO e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio nos animais hipertensos.

Figura 9. Concentração de nitrato (A, B) e nitrito (C, D) no plasma de ratos controle (normotensos) e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO (50 μmol/kg) e GSNO-NP (50 μmol/kg). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. n=5-8. **p< 0,05 vs.Veículo e NP.

Figura 10. Concentração de espécies nitrosadas totais (A, B), nitrosotiois (C, D) e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio (E, F) no plasma de ratos controle (normotensos) e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO (50 μ mol/kg) e GSNO-NP (50 μ mol/kg). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. n=5-8.

5.1.3. Tratamento com GSNO-NP não aumenta as concentrações de metabólitos do NO na aorta

As concentrações de nitrato e nitrito na aorta (Figura 11) não apresentaram diferença após o tratamento agudo com a GSNO livre e GSNO-NP.

Figura 11. Concentração de nitrato (A) e nitrito (B) na aorta de ratos controle (normotensos) e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO (50 µmol/kg) e GSNO-NP (50 µmol/kg). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. n=6-8. *p<0,05 vs GSNO-NP.

5.1.4. Efeito do tratamento agudo com GSNO-NP nos metabólitos do NO no coração e fígado

As concentrações de nitrato e nitrito no coração (Figura 12) não apresentaram diferença após o tratamento agudo com a GSNO-NP, bem como as concentrações de nitrosotíóis (RSNO) e espécies nitrosadas resistentes à mercúrio (Figura 13). Foi observado efeito do tratamento no aumento da concentração de RXNO no coração (Figura 13B) de ratos hipertensos, no entanto o aumento significativo apenas foi evidenciado nos animais tratados com GSNO-NP 0,13 (0,03 – 0,29) pmol/mg em relação ao grupo veículo 0,03 (0,02 – 0,11) pmol/mg e NP 0,34 (0,01 – 0,22) pmol/mg.

O nitrato no coração dos animais hipertensos nos respectivos grupos de tratamento foram: GSNO 56,63 (24,62 – 180,10) pmol/mg GSNO-NP 98,84 (27,16 – 324,30) pmol/mg Veículo 125,1 (57,36 – 152,10) pmol/mg e NP 74,68 (20,37 – 130,30). pmol/mg. Pode-se observar uma interação entre os grupos, não havendo diferença estatística.

Ainda, foi observado efeito do nanoencapsulamento nas espécies nitrosadas totais no coração dos animais normotensos. Aparentemente o grupo GSNO-NP e NP apresentaram menor concentração de espécies nitrosadas quando comparadas com os tratamentos não encapsulados. No entanto, este efeito é não significativo entre os grupos GSNO 0,14 (0,04 – 0,79) pmol/mg, GSNO-NP 0,07 (0,03 – 0,19) pmol/mg, Veículo 0,09 (0,02 – 0,52) pmol/mg e NP 0,05 (0,03 – 0,08) pmol/mg.

Figura 12. Concentração de nitrato (A, B) e nitrito (C, D) no coração de ratos normotensos (controle) e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO (50 μmol/kg) e GSNO-NP (50 μmol/kg). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. n=6-8.

Figura 13. Concentração de espécies nitrosadas totais (A, B), nitrosotyrosina (C, D) e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio (E, F) no coração de ratos controle (normotensos) e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO (50 $\mu\text{mol/kg}$) e GSNO-NP (50 $\mu\text{mol/kg}$). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. $n=5-8$. ** $p < 0,05$ vs. Veículo e NP.

O tratamento com GSNO encapsulado ou não encapsulado aumentou a concentração de nitrito no fígado de animais hipertensos, no entanto apenas foi observada diferença significativa entre os grupos GSNO 1,32 (0,46 – 1,93) pmol/mg e Veículo 0,42 (0,32 – 0,91) pmol/mg (Figura 14B). Não houve diferença nas concentrações de nitrato, nitrito, espécies nitrosadas totais e resistentes ao mercúrio e nitrosotióis nos demais grupos (Figura 15), com exceção do grupo controle tratado com GSNO que apresentou aumento na concentração de nitrosotióis (Figura 15 C) em relação ao veículo, com concentração de 0,07 (0,03 – 0,32) pmol/mg e 0,03 (0,0001 – 0,11) pmol/mg respectivamente. Ainda, foi observado efeito do tratamento no aumento das espécies nitrosadas totais no fígado dos animais controles.

Figura 14. Concentração de nitrato (A, B) e nitrito (C, D) no fígado de ratos controle e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO (50 $\mu\text{mol/kg}$) e GSNO-NP (50 $\mu\text{mol/kg}$). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. n=6-8. * $p < 0,05$ vs. Veículo.

Figura 15. Concentração de espécies nitrosadas totais (A, B), nitrosotiois (C, D) e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio (E, F) no fígado de ratos controle (normotensos) e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO (50 μ mol/kg) e GSNO-NP (50 μ mol/kg). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. n=6-8. *p< 0,05 vs. Veículo.

5.1.5. Tratamento agudo com GSNO-NP aumenta as concentrações de metabólitos do NO no estômago

No estômago, é notável o aumento de nitrito e nitrato após tratamento com GSNO e GSNO-NP, tanto nos grupos controle quanto hipertensos no protocolo agudo (Figura 10). Entretanto, não foi observada diferença estatística na concentração do nitrato de 84,84 (45,86 – 134,90) pmol/mg no grupo normotenso tratado com GSNO em comparação com veículo e NP 56,31 (35,79 – 66,56) pmol/mg e 62,02 (29,26 – 122,90) pmol/mg, respectivamente.

Os tratamentos com GSNO livre e nanoencapsulado aumentaram as espécies nitrosadas totais, nitrosotióis e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio no estômago de ratos hipertensos. Adicionalmente, foi observado aumento de RXNO (Figura 11B) nos grupos GSNO 0,341 (0,13 – 1,58) e GSNO-NP 0,83(0,002 – 3,7) pmol/mg, em relação ao Veículo 0,02 ($0,43 \cdot 10^{-6}$ – 0,09) pmol/mg, e tendência a aumento nos nitrosotióis e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio nos grupos GSNO e GSNO-NP (Figura 11 D, E e F).

Figura 16. Concentração de nitrato (A) e nitrito (B) no estômago de ratos controle (normotensos) e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO (50 μmol/kg) e GSNO-NP (50 μmol/kg). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. n=6-8. *p< 0,05 vs. Veículo; ** p< 0,05 vs. Veículo e NP.

Figura 17. Concentração de espécies nitrosadas (A, B), nitrosotiois (C, D) e espécies nitrosadas resistentes ao mercúrio (E, F) no estômago de ratos controle (normotensos) e hipertensos após tratamento agudo com veículo, NP, GSNO (50 $\mu\text{mol/kg}$) e GSNO-NP (50 $\mu\text{mol/kg}$). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. n=6-8. *p< 0,05 vs. Veículo.

5.2. Efeito do tratamento crônico nos animais hipertensos L-NAME

5.2.1. Ausência de efeito hipotensor crônico da GSNO livre e nanoencapsulada

Na Figura 12 está representada a PAS dos ratos no protocolo crônico, com hipertensão induzida por 2 semanas com L-NAME e tratamento por via oral por 7 dias. Pode-se observar que o tratamento com L-NAME foi capaz de elevar a pressão arterial sistólica dos ratos tratados, e este efeito persistiu mesmo após o início do tratamento como GSNO e GSNO-NP. Entretanto, no último dia de tratamento a PAS no grupo GSNO-NP (183 ± 2 mmHg) permanece estável a pressão sistólica, evento não observado no grupo GSNO (191 ± 2 mmHg), quando comparado ao veículo (192 ± 3 mmHg) e NP (193 ± 5 mmHg).

Figura 18. Pressão arterial sistólica de ratos hipertensos tratados sete dias por via oral com veículo, NP, GSNO ($100 \mu\text{mol/kg}$) e GSNO-NP ($100 \mu\text{mol/kg}$). O tratamento começou no 7º dia de L-NAME. Dados expressos em média $\pm$ EPM ($n=10$).

5.2.2. Tratamento crônico com GSNO-NP não aumenta as concentrações de metabólitos do NO na aorta, plasma e coração

No protocolo crônico não foi observado aumento nas concentrações de nitrito na aorta (Figura 13), nitrito e espécies nitrosadas no plasma (Figura 14A, B) e coração (Figura 14C, D). Os valores absolutos de nitrito e RXNO entre os grupos de tratamento não apresentaram grandes diferenças entre si.

Figura 19. Concentração nitrito na aorta de ratos hipertensos tratados por 7 dias veículo, NP, GSNO (100 μ mol/kg) e GSNO-NP (100 μ mol/kg). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. n=3-5.

Figura 20. Concentração nitrito e espécies nitrosadas no plasma e coração de ratos hipertensos após tratamento por 7 dias com veículo, NP, GSNO (100 $\mu\text{mol/kg}$) e GSNO-NP (100 $\mu\text{mol/kg}$). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. (A) Nitrito Plasma, (B) RXNO Plasma, (C) Nitrito Coração, e (D) RXNO Coração. n=3-5.

5.2.3. Tratamento crônico com GSNO-NP aumenta as concentrações de RXNO no estômago e fígado

O tratamento crônico com GSNO-NP não aumentou a concentração de nitrito no estomago de ratos hipertensos (Figura 15A). Ainda em relação ao estômago (Figura 15A, B), foi observado aumento de RXNO com o tratamento GSNO-NP 0,36 (0,21 – 0,50) pmol/mg, em relação ao Veículo 0,0921 (0,05 – 0,14) pmol/mg e NP 0,12 (0,10 – 0,21) pmol/mg. Além disso, também foi observada diferença significativa na concentração de RXNO entre os tratamentos com a GSNO livre e nanoencapsulada.

No fígado pode-se observar uma tendência ao aumento na concentração de nitrito, sem diferença estatística entre os grupos (Figura 15C). Adicionalmente, foi observada aumento no RXNO após os tratamentos. O aumento do RXNO foi observado no grupo GSNO-NP 0,78 (0,29 – 1,85) pmol/mg em relação aos grupos Veículo 0,23 (0,18 – 0,31) pmol/mg e NP 0,30 (0,18 – 0,43) pmol/mg após os tratamentos (Figura 15D).

Figura 21. Concentração nitrito e espécies nitrosadas no estômago e fígado de ratos hipertensos após tratamento por 7 dias veículo, NP, GSNO (100 $\mu\text{mol/kg}$) e GSNO-NP (100 $\mu\text{mol/kg}$). Dados expressos em intervalos interquartis. Retângulos representam valores de p obtidos após teste estatístico ANOVA de duas vias, sendo (Int) interação, (T) tratamento, (E) encapsulamento. (A) Nitrito Estômago, (B) RXNO Estômago, (C) Nitrito Fígado, (D) RXNO Fígado. n=4-5. **p< 0,05 vs. Veículo e NP. # p< 0,05 vs. GSNO.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar comparativamente o efeito anti-hipertensivo do tratamento com s-nitrosoglutathione livre e nanoencapsulada por via oral em modelo animal de hipertensão arterial. Com o nanoencapsulamento da GSNO, esperávamos prolongar o efeito anti-hipertensivo desta molécula. No entanto, os resultados obtidos evidenciam similaridade no efeito anti-hipertensivo da GSNO livre e nanoencapsulada. Neste estudo pode-se observar também que o tratamento com GSNO-NP, em geral, aumentou a concentração dos metabólitos do NO investigados.

É interessante notar diversos estudos encontrados na literatura mostram a atividade vasodilatadora (RASSAF et al., 2002; RING et al., 2010; SOGO et al., 2000) e redutora da pressão arterial (ISHIBASHI et al., 2011; KASHIBA et al., 1999; PARENT et al., 2015; RAMSAY et al., 1995; RASSAF et al., 2002, 2006) da GSNO, sem abordar o seu uso na hipertensão arterial. Algumas exceções são os estudos que utilizam a GSNO como abordagem terapêutica para a pré-eclâmpsia, pelo seu efeito de redução da pressão arterial e inibição da agregação plaquetária (BROWN et al., 2013; EVERETT et al., 2014). Estas propriedades da GSNO, em conjunto, podem ser consideravelmente benéficas para evitar complicações cardiovasculares em várias condições associadas à disfunção endotelial como um mecanismo importante que condiciona fatores de risco cardiovascular (PERRIN-SARRADO et al., 2019).

Contudo, até o momento, não existem estudos na literatura que utilizam a GSNO para o tratamento da hipertensão arterial. Talvez o uso da GSNO na hipertensão arterial não tenha sido tão explorado devido à sua rápida degradação, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KASHIBA et al., 1999; LIU et al., 2016; WU et al., 2015b). Isto inviabiliza um efeito prolongado necessário ao tratamento medicamentoso de pacientes hipertensos em acompanhamento ambulatorial. Neste estudo utilizamos o nanoencapsulamento da GSNO como estratégia para evitar a degradação desta molécula *in vivo* e potencialmente aumentar seus efeitos terapêuticos na hipertensão arterial. Deste modo, o presente estudo é pioneiro no uso da GSNO encapsulada em uma nanopartícula à base de quitosana para uso oral, em modelo animal de hipertensão arterial. A principal vantagem da quitosana é o favorecimento da absorção

pelo trato gastrointestinal, por sua capacidade mucosadesiva e de abertura de junções oclusivas intercelulares (SHARIATINIA, 2019; WU et al., 2015a).

No intuito de avaliar os efeitos anti-hipertensivos da GSNO optamos por utilizar o modelo animal de hipertensão arterial induzida pela administração de L-NAME. O L-NAME é um inibidor da NOS, resultando na diminuição da disponibilidade de NO no endotélio vascular, comumente causando disfunção endotelial, remodelamento vascular e cardíaco. Além da redução da disponibilidade de NO, o L-NAME provoca aumento da atividade simpática e ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona (CAMPBELL, 2006). A indução da hipertensão arterial neste estudo foi satisfatória uma vez que os animais tratados com L-NAME apresentaram aumento médio de pelo menos 40 mmHg após o tratamento. Esta observação corrobora resultados encontrados na literatura que evidenciam que, após a primeira semana de tratamento com L-NAME na água de beber, a hipertensão arterial está instaurada (MONTENEGRO et al., 2014; SIMKO et al., 2018).

Os resultados obtidos evidenciam que a GSNO na dose 50 $\mu\text{mol/Kg}$ é um potente anti-hipertensivo de efeito agudo, com duração do efeito menor que 20 minutos. O mesmo padrão de resposta foi obtido com o tratamento com GSNO-NP, evidenciando que o nanoencapsulamento não prolongou o efeito anti-hipertensivo da GSNO. No entanto, é importante notar que nanoencapsulamento da GSNO não prolonga, mas tende a atenuar o efeito hipotensor da GSNO livre.

O rápido efeito da GSNO deve-se principalmente ao curto tempo de meia vida desta droga, estimado em 5 minutos *in vivo* (LIU et al., 2016). Sendo assim, poucos são os estudos que utilizam a GSNO como abordagem terapêutica para a hipertensão arterial. Tendo isto em mente, lançamos a hipótese que o nanoencapsulamento da GSNO poderia aumentar o efeito anti-hipertensivo desta droga. Além do encapsulamento ser uma alternativa para diminuição da degradação da GSNO, este tipo de formulação pode ter maior facilidade de transporte para o meio intracelular, principalmente nanopartículas poliméricas de tamanho entre 10 e 60 nm (HOSHYAR et al., 2016). Isto é de especial relevância para a GSNO, que não é capaz de atravessar a membrana plasmática diretamente (BRONIOWSKA; DIERS; HOGG, 2013).

Mesmo não havendo estudos que abordam o efeito anti-hipertensivo da GSNO por via oral, os resultados encontrados no protocolo agudo deste estudo corroboram aqueles encontrados na literatura e que evidenciam o curto tempo de duração do

efeito da GSNO na pressão arterial. O tempo de duração do efeito hipotensor da GSNO é relatado entre diferentes vias de administração, sendo observadas variações em relação à dose e via de administração. A administração de GSNO 1 $\mu\text{mol/Kg}$ por via endovenosa reduziu a pressão arterial de ratos normotensos anestesiados por apenas 5 minutos (KASHIBA et al., 1999). Já no estudo conduzido por Parente e colaboradores a administração da GSNO subcutânea nas doses de 7,5 a 30 mg/Kg reduziu a pressão arterial média por 35 – 40 minutos em ratos em livre movimento (PARENT et al., 2015). No presente estudo, não foi observado efeito da administração da GSNO na pressão arterial de ratos normotensos, ou seja, a dose estudada não apresentou efeito hipotensor. De fato, fizemos uma escolha inicial da dose de GSNO de forma a minimizar seus efeitos hipotensores porque imaginamos que o encapsulamento poderia prolongar ou mesmo acentuar tais efeitos. Assim, por ser mais difícil acentuar efeitos que já são intensos, doses muito maiores de GSNO poderiam obscurecer diferenças devidas ao encapsulamento.

A ausência de efeito prolongado da GSNO nanoencapsulada na pressão arterial também é evidenciada após tratamento crônico. Aparentemente o efeito da GSNO na pressão arterial é apenas agudo, uma vez que a pressão arterial dos animais hipertensos tratados não reduziu após 6 horas do último tratamento, mesmo após 7 dias de tratamento. Entretanto, verificamos uma tendência do grupo GSNO-NP em evitar o aumento da pressão arterial sistólica enquanto o grupo tratado com GSNO livre não demonstrou alterações quando comparados com os grupos Veículo e NP.

O efeito da GSNO livre na frequência cardíaca foi demonstrado anteriormente por Parente e colaboradores, num estudo que evidenciou o aumento na frequência cardíaca em animais normotensos em paralelo à queda da pressão arterial em um efeito dose-dependente (PARENT et al., 2015). Este estudo relata resultados que contrastam com nosso estudo, pois a GSNO livre e nanoencapsulada não ocasionou aumento da frequência cardíaca nos ratos normotensos tratados. O aumento da frequência cardíaca foi observado apenas nos animais hipertensos tratados com GSNO livre e nanoencapsulado, porém neste parâmetro o nanoencapsulamento também não alterou a resposta à GSNO livre. O aumento da frequência cardíaca foi correspondente aos momentos de queda da pressão arterial. Deste modo, o efeito observado na frequência cardíaca era esperado uma vez que a GSNO é uma molécula

vasodilatadora, gerando uma resposta de comum entre drogas vasodilatadoras que é a taquicardia reflexa (ARMARIO; DEL REY; PARDELL, 1994).

Outro objetivo deste trabalho consistiu na quantificação dos metabólitos do NO no plasma e tecidos, no intuito de entender os efeitos funcionais e bioquímicos da GSNO livre e nanoencapsulada. Como esperado, a administração de GSNO aumentou as concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato. No entanto, a concentração plasmática de nitrosotióis não aumentou após os tratamentos agudos. Como metabólitos estáveis oriundos da oxidação do NO, as concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato (oriundo da oxidação do nitrito) sugerem aumento de biodisponibilidade do NO (LAUER et al., 2001). Sendo assim, pode-se inferir que a GSNO aumentou a disponibilidade de NO que rapidamente foi oxidado a nitrito e este último oxidado a nitrato.

Diante do exposto, nos animais hipertensos, a queda na PAM parece estar relacionada com as concentrações plasmáticas de nitrato e nitrito que aumentaram nestes grupos de tratamento em relação ao veículo. Além disso, já foi demonstrado que o nitrito e o nitrato são fontes alternativas para a formação de NO (MILLAR et al., 1998; MONTENEGRO et al., 2014), sendo assim, tratamentos que levam ao aumento da concentração plasmática destes metabólitos também podem aumentar a disponibilidade de NO (LUNDBERG et al., 2009).

Não foi observado aumento de nitrito plasmático no protocolo crônico, resultado que difere do protocolo agudo. No entanto, é importante lembrar que o intervalo de tempo decorrido entre administração do tratamento e a coleta das amostras foi diferente nos dois protocolos: intervalo de 6h no protocolo crônico e de 1h no protocolo agudo. Este fator é muito relevante para se interpretar os resultados mostrando ausência de aumento dos metabólitos do NO no plasma dos animais submetidos ao protocolo crônico. O tempo de meia vida do nitrito é de apenas alguns minutos (LUNDBERG; WEITZBERG, 2005), provavelmente o período entre administração do tratamento e coleta de amostras explique a falta de alteração nos metabólitos do NO no plasma dos animais tratados cronicamente.

No presente estudo, com o tratamento com GSNO-NP não foi verificado grandes aumentos nos metabólitos do NO na aorta, em ambos protocolos agudo e crônico. Estudo prévios no nosso laboratório demonstraram que o acúmulo de nitrito na aorta pode demorar para ser observado (mesmo após tratamento com nitrito de

sódio), principalmente quando as concentrações plasmáticas deste metabólito ainda estão elevadas (FERREIRA, 2017).

No coração não foram observados aumentos nas concentrações de nitrito e nitrato no protocolo agudo. Além disso, tanto no coração quanto no plasma, apenas nos animais normotensos observamos um padrão de maior acúmulo de RSNO após o tratamento com a GSNO livre. Interessantemente, observamos uma tendência à redução na concentração de RSNO nos grupos tratados com NP e GSNO-NP. Esta observação nos faz questionar se existe um possível mecanismo pelo qual a nanopartícula possa interferir nas concentrações de nitrosotíóis no plasma e no coração. Para examinar tal possibilidade, outros estudos explorando os efeitos da nanopartícula de quitosana nestes órgãos precisam ser realizados.

Além disso, podemos observar que os animais normotensos apresentaram maiores concentrações de RXNO e RSNO após o uso das drogas. Entretanto, os animais hipertensos apresentaram maiores concentrações de nitrito e nitrato. É possível que o ambiente redox diferente nos animais normotensos e hipertensos tenha favorecido esse padrão de resposta (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018). Ainda, a hipertensão arterial é caracterizada pela deficiência de NO, como discutido na Introdução deste trabalho. Assim, talvez tenha havido maior liberação de NO a partir das drogas nos animais hipertensos e, conseqüentemente, maior oxidação de NO a nitrito e nitrato.

A nanopartícula de quitosana aparentemente apresenta vantagens para uso por via oral, em relação a outros polímeros, devido à sua capacidade mucoadesiva (SHARIATINIA, 2019; WU et al., 2015b). Esta propriedade levou a aumentos significativos nos metabólitos do NO no estômago. A capacidade mucoadesiva da quitosana pode permitir uma interação por tempo mais prolongado com a parede gastrointestinal (SHARIATINIA, 2019; WU et al., 2015a), favorecendo a aderência de parte das nanopartículas neste órgão. Tudo isso pode ter levado ao aumento significativo de nitrito e nitrato (após tratamento agudo) e de RXNO (após tratamento crônico) no estômago dos animais tratados com GSNO-NP. A importância da atividade mucoadesiva da quitosana é evidenciada pelo aumento encontrado nas concentrações de RXNO dos ratos tratados com GSNO-NP em relação ao GSNO livre, sugerindo a participação do encapsulamento no acúmulo de espécies nitrosadas totais.

Adicionalmente, os resultados obtidos demonstram o aumento de RSNO no fígado de animais normotensos tratados com GSNO livre e aumento de RXNO no fígado de animais hipertensos tratados com GSNO-NP, nos protocolos agudo e crônico respectivamente. O fígado já foi descrito com órgão passível de nitrosação, principalmente por possuir muitas proteínas que são alvos de nitrosação (DOULIAS et al., 2013). Deste modo, a GSNO administrada tem grande potencial de iniciar reações de nitrosação proteica, aumentando a concentração de espécies nitrosadas neste órgão. Além disso, estudos reportam o fígado como um órgão propício ao acúmulo de nanopartículas por ser vastamente vascularizado e fenestrado (DUONG et al., 2015). O acúmulo de espécies nitrosadas observado no fígado sugere que este órgão pode possivelmente atuar como reservatório destes metabólitos, que possivelmente podem ser lentamente liberadas.

Outro fator que pode contribuir para o acúmulo de nanopartículas no fígado está relacionada ao metabolismo de primeira passagem que os fármacos administrados pela via oral são submetidos. Estudos reportam o fígado como um órgão propício ao acúmulo de nanopartículas por captação destas pelo sistema mononuclear fagocitário, o que pode diminuir a biodisponibilidade da droga nanoencapsulada (CHO et al., 2009; HOSHYAR et al., 2016; WANG et al., 2010). A nanopartícula utilizada neste estudo tem tamanho hidrodinâmico 141.1 ± 4.536 nm e como este acúmulo é mais evidente em nanopartículas com tamanho acima de 50 nm (HOSHYAR et al., 2016), não podemos descartar a possibilidade desse interferente no presente estudo.

O acúmulo de espécies nitrosadas no estômago e no fígado abre possibilidades para outras abordagens terapêuticas fora do contexto da hipertensão arterial. O aumento de espécies nitrosadas após tratamento crônico com GSNO-NP sugere que este tratamento possa ser interessante em doenças hepáticas ou estomacais nas quais o acúmulo de GSNO possa produzir efeitos benéficos. De fato, a relevante função do óxido nítrico no controle do fluxo sanguíneo estomacal e manutenção da mucosa gastroprotetora torna interessante investigar doadores de NO como abordagem terapêutica para lesões gástricas (MAGIEROWSKI et al., 2015). Além disso, Duong e colaboradores mostraram em um estudo *in vitro* que o nanoencapsulamento de doadores de NO, como a GSNO, é promissor para o tratamento de fibrose hepática e hipertensão portal (DUONG et al., 2015). Entretanto, como esta abordagem não é o foco deste trabalho, são necessários mais estudos para

avaliar o real benefício da GSNO e do encapsulamento da GSNO em nanopartículas de quitosana nestas situações patológicas.

7. CONCLUSÃO

Os dados mostrados sugerem que o tratamento com GSNO reduz a pressão arterial e que o nanoencapsulamento não modifica a resposta anti-hipertensiva da molécula livre. O efeito agudo na pressão arterial após o tratamento com GSNO foi mais evidente do que o tratamento crônico, o que sugere a falta de efeito cumulativo da GSNO, tanto livre quanto nanoencapsulada. No geral, os tratamentos foram capazes de aumentar as concentrações dos metabólitos do NO, favorecendo o acúmulo destes no estômago e no fígado. O acúmulo de GSNO após tratamento crônico sugere que o tratamento com GSNO-NP possa causar efeitos farmacológicos de interesse terapêutico em doenças beneficiadas pelo aumento de concentrações de GSNO e que afetem o fígado ou o estômago.

REFERÊNCIAS

ANAND, P.; STAMLER, J. S. Enzymatic mechanisms regulating protein s-nitrosylation: Implications in health and disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 3, p. 233–244, 2012.

ARAI, R. J. et al. Thioredoxin-1 promotes survival in cells exposed to S-nitrosoglutathione: Correlation with reduction of intracellular levels of nitrosothiols and up-regulation of the ERK1/2 MAP Kinases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 233, n. 2, p. 227–237, 2008.

ARMARIO, P.; DEL REY, R. H.; PARDELL, H. Adverse Effects of Direct-Acting Vasodilators. **Drug Safety**, v. 11, n. 2, p. 80–85, ago. 1994.

BELCASTRO, E. et al. Regulation of protein function by S-nitrosation and S-glutathionylation: Processes and targets in cardiovascular pathophysiology. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 12, p. 1267–1293, 2017.

BENHAR, M.; FORRESTER, M. T.; STAMLER, J. S. Protein denitrosylation: Enzymatic mechanisms and cellular functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 10, p. 721–732, 2009.

BÖGER, R. H. et al. Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. **Circulation**, v. 119, n. 12, p. 1592–1600, 2009.

BOURESSAM, M. et al. S-nitrosoglutathione inhibits cerebrovascular angiotensin II-dependent and -independent AT₁ receptor responses: A possible role of S-nitrosation. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 12, p. 2049–2062, 7 jun. 2019.

BRAAM, B. et al. Recognition and management of resistant hypertension. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 3, p. 524–535, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigitel Brasil 2018: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquerito telefônico**. [s.l: s.n.].

BRONIOWSKA, K. A. et al. Cytochrome c-mediated formation of S-nitrosothiol in cells. **Biochemical Journal**, v. 442, n. 1, p. 191–197, 15 fev. 2012.

BRONIOWSKA, K. A.; DIERS, A. R.; HOGG, N. S-Nitrosoglutathione. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3173–3181, maio 2013.

BROWN, C. et al. The effects of S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetyl-D, L-penicillamine in a rat model of pre-eclampsia. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 330–335, 2013.

CABRAL, F. V. et al. Nitric oxide-loaded chitosan nanoparticles as an innovative antileishmanial platform. **Nitric Oxide**, v. 93, p. 25–33, 2019.

CAMPBELL, D. J. L-NAME hypertension: Trying to fit the pieces together. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. 1, p. 33–36, 2006.

CASEY, D. E. et al. **2019 AHA/ACC Clinical Performance and Quality Measures for Adults With High Blood Pressure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Performance Measures**. [s.l: s.n.]. v. 12

CHIESA, J. J.; BAIDANOFF, F. M.; GOLOMBEK, D. A. Don't just say no: Differential pathways and pharmacological responses to diverse nitric oxide donors. **Biochemical Pharmacology**, v. 156, p. 1–9, 2018.

CHO, M. et al. The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 189, n. 3, p. 177–183, 2009.

CHOI, M. S. Pathophysiological role of s-nitrosylation and transnitrosylation depending on s-nitrosoglutathione levels regulated by s-nitrosoglutathione reductase.

Biomolecules and Therapeutics, v. 26, n. 6, p. 533–538, 2018.

DATE, A. A.; HANES, J.; ENSIGN, L. M. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. **Journal of Controlled Release**, v. 240, p. 504–526, 2016.

DEJAM, A. et al. Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: Endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation. **Circulation**, v. 116, n. 16, p. 1821–1831, 2007.

DINH, Q. N. et al. Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DOULIAS, P. T. et al. Nitric oxide regulates mitochondrial fatty acid metabolism through reversible protein S-nitrosylation. **Science Signaling**, v. 6, n. 256, p. 1–17, 2013.

DUNCAN, C. et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. **Nature Medicine**, v. 1, n. 6, p. 546–551, 1995.

DUONG, H. T. T. et al. The use of nanoparticles to deliver nitric oxide to hepatic stellate cells for treating liver fibrosis and portal hypertension. **Small**, v. 11, n. 19, p. 2291–2304, 2015.

DURANSKI, M. R. et al. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1232–1240, 2005.

EVERETT, T. R. et al. S-Nitrosoglutathione improves haemodynamics in early-onset pre-eclampsia. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 660–669, 2014.

FARAH, C.; MICHEL, L. Y. M.; BALLIGAND, J. L. Nitric oxide signalling in

cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 5, p. 292–316, 2018.

FERREIRA, G. C. **Alterações induzidas pelo TEMPOL sobre as concentrações de metabólitos do óxido nítrico após o tratamento com nitrito de sódio. 2017. 85f.** [s.l.] Dissertação (Mestrado em Ciência). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, 2017.

FIRMO, J. O. A. et al. Comportamentos em saúde e o controle da hipertensão arterial: resultados do ELSI-BRASIL. **Cadernos de saude publica**, v. 35, n. 7, p. e00091018, 2019.

FOROUZANFAR, M. H. et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1659–1724, out. 2016.

FOSTER, M. W.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 9, p. 391–404, 2009.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

GARG, U. C.; HASSID, A. Mechanisms of nitrosothiol-induced antimitogenesis in aortic smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 237, n. 2–3, p. 243–249, 1993.

GIUSTARINI, D. et al. Nitric oxide and S -nitrosothiols in human blood. v. 330, p. 85–98, 2003.

GKALIAGKOUSI, E. et al. Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: Role in essential hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. 12, p.

2310–2320, 2009.

GLUCKMAN, T. L. et al. Regulation of leukocyte function by nitric oxide donors: The effect of s-nitroso-thiol complexes. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, v. 61, n. 1, p. 9–26, 2000.

HALDAR, S. M.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation: integrator of cardiovascular performance and oxygen delivery. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 1, p. 101–110, 2 jan. 2013.

HATZISTERGOS, K. E. et al. S-Nitrosogluthathione Reductase Deficiency Enhances the Proliferative Expansion of Adult Heart Progenitors and Myocytes Post Myocardial Infarction. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 7, 2015.

HEIKAL, L.; MARTIN, G. P.; DAILEY, L. A. Characterisation of the decomposition behaviour of S-nitrosogluthathione and a new class of analogues: S-Nitrosophytochelatin. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 157–165, 2009.

HLAING, S. P. et al. S-Nitrosogluthathione loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for prolonged nitric oxide release and enhanced healing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected wounds. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 132, n. September, p. 94–102, 2018.

HOSHYAR, N. et al. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. **Nanomedicine**, v. 11, n. 6, p. 673–692, 2016.

HUANG, P. L. et al. **Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase** *Nature*, 1995.

HYMAN, D. J.; PAVLIK, V. Medication adherence and resistant hypertension. **Journal of Human Hypertension**, v. 29, n. 4, p. 213–218, 2015.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from

artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 24, p. 9265–9269, 1987.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de Orçamentos Familiares: 2008-2009. Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil.** Biblioteca do Ministerio do Planejamento, Orçamento e Gestão. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv50063.pdf>>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<ftp://ftp.ibge.gov.br/PNS/2013/pns2013.pdf>>.

ISHIBASHI, T. et al. Role of Plasma S-Nitrosothiols in Regulation of Blood Pressure in Anesthetized Rabbits with Special References to Hypotensive Effects of Acetylcholine and Nitrovasodilators. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 8, p. 1307–1313, 2011.

JEREMY, J. Y. et al. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 3, p. 580–594, 1999.

JESPERSEN, B.; KNUPP, L.; NORTHCOTT, C. A. Femoral Arterial and Venous Catheterization for Blood Sampling, Drug Administration and Conscious Blood Pressure and Heart Rate Measurements. **Journal of Visualized Experiments**, n. 59, p. 1–8, 2012.

KAPIL, V. et al. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: Role for nitrite-derived no. **Hypertension**, v. 56, n. 2, p. 274–281, 2010.

KAPOSZTA, Z. et al. L-Arginine and S-nitrosoglutathione reduce embolization in humans. **Circulation**, v. 103, n. 19, p. 2371–2375, 2001.

KAPOSZTA, Z. et al. S-Nitrosoglutathione reduces asymptomatic embolization after carotid angioplasty. **Circulation**, v. 106, n. 24, p. 3057–3062, 2002.

KAPOSZTA, Z.; MARTIN, J. F.; MARKUS, H. S. Switching off embolization from

symptomatic carotid plaque using S-nitrosoglutathione. **Circulation**, v. 105, n. 12, p. 1480–1484, 2002.

KASHIBA, M. et al. Fates and vascular action of S-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 363, n. 2, p. 213–218, 1999.

KELM, M. et al. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 154, n. 1, p. 236–244, jul. 1988.

KIMURA, L. et al. Multilocus family-based association analysis of seven candidate polymorphisms with essential hypertension in an African-derived semi-isolated brazilian population. **International Journal of Hypertension**, v. 2012, 2012.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 11, p. 4651–4655, 1991.

LANGFORD, E. et al. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. **The Lancet**, v. 344, n. 8935, p. 1458–1460, 1994.

LAUER, T. et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 22, p. 12814–12819, 2001.

LECLERC, P. C. et al. S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT 1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 306–313, 2006.

LIMA, B. et al. Endogenous S-nitrosothiols protect against myocardial injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 15, p. 6297–302, abr. 2009.

LINDER, L. et al. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. **Circulation**, v. 81, n. 6, p. 1762–1767, 1990.

LIU, T. et al. Local and systemic vasodilatory effects of low molecular weight S-nitrosothiols. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 91, p. 215–223, 2016.

LIU, T. et al. Nitrite potentiates the vasodilatory signaling of S-nitrosothiols. **Nitric Oxide**, v. 75, n. 3, p. 60–69, 2018.

LUNDBERG, J. O. et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. **Nature Chemical Biology**, v. 5, n. 12, p. 865–869, dez. 2009.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 623–641, 2015.

LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 395–400, 2004.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 5, p. 915–922, 2005.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 156–167, 2008.

MAGIEROWSKI, M. et al. Gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulfide in the mechanism of gastrointestinal integrity, protection and ulcer healing. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9099–9123, 2015.

MALACHIAS, M. V. B., et al. **VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão** **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf>.

MARCATO, P. et al. Development of a Sustained-release System for Nitric Oxide Delivery using Alginate/Chitosan Nanoparticles. **Current Nanoscience**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2013.

MARCONDES, F. G. et al. In vivo effects of the controlled NO donor/scavenger ruthenium cyclam complexes on blood pressure. **Life Sciences**, v. 70, n. 23, p. 2735–2752, 2002.

MAROZKINA, N. V; GASTON, B. Biochimica et Biophysica Acta S-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions ☆. **BBA - General Subjects**, v. 1820, n. 6, p. 722–729, 2012.

MILLAR, T. M. et al. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. **FEBS Letters**, v. 427, n. 2, p. 225–228, 1998.

MOLLOY, J. et al. S-nitrosoglutathione reduces the rate of embolization in humans. **Circulation**, v. 98, n. 14, p. 1372–1375, 1998.

MONTENEGRO, M. F. et al. Vascular xanthine oxidoreductase contributes to the antihypertensive effects of sodium nitrite in L-NAME hypertension. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 6, p. 591–598, 2014.

MONTENEGRO, M. F. et al. Blood Pressure-Lowering Effect of Orally Ingested Nitrite Is Abolished by a Proton Pump Inhibitor. **Hypertension**, v. 69, n. 1, p. 23–31, 2017.

NAGABABU, E.; RIFKIND, J. M. Routes for Formation of S-Nitrosothiols in Blood. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 67, n. 2, p. 385–398, 2013.

NETO-NEVES, E. M. et al. Journal of Molecular and Cellular Cardiology Sodium nitrite improves hypertension-induced myocardial dysfunction by mechanisms involving cardiac S-nitrosylation. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 134, n. January, p. 40–50, 2019.

NIKITOVIC, D.; HOLMGREN, A. S-nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19180–19185, 1996.

NOZIK-GRAYCK, E. et al. S -nitrosoglutathione inhibits α 1 -adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery . **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 1, p. L136–L143, 2005.

ÖZTÜRK-ATAR, K.; EROĞLU, H.; ÇALIŞ, S. Novel advances in targeted drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 26, n. 8, p. 633–642, 2018.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.

PARENT, M. et al. A complete physicochemical identity card of S-nitrosoglutathione. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 9, n. 1, p. 31–42, 2013.

PARENT, M. et al. In Situ Microparticles Loaded with S - Nitrosoglutathione Protect from Stroke. p. 1–22, 2015.

PELEGRINO, M. T. et al. Chitosan nanoparticles for nitric oxide delivery in human skin. **Med. Chem. Commun.**, v. 8, n. 4, p. 713–719, 2017a.

PELEGRINO, M. T. et al. Nitric oxide-releasing nanoparticles: synthesis, characterization, and cytotoxicity to tumorigenic cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, n. 2, 2017b.

PELLETIER, M. M. et al. The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: Pitfalls and solutions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 541–548, 2006.

PERRIN-SARRADO, C. et al. S-Nitrosothiols as potential therapeutics to induce a mobilizable vascular store of nitric oxide to counteract endothelial dysfunction. **Biochemical Pharmacology**, p. 113686, 2019.

PINHEIRO, L. C. et al. Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 252–262, 2015.

PLUTA, R. M. et al. Safety and feasibility of long-term intravenous sodium nitrite infusion in healthy volunteers. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

POULTER, N. R.; PRABHAKARAN, D.; CAULFIELD, M. Hypertension. **The Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 801–812, 2015.

RADOMSKI, M. W. et al. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 745–749, 1992.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 148, n. 3, p. 1482–1489, 1987.

RAMSAY, B. et al. Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 101–102, 1995.

RASSAF, T. 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**, v. 91, n. 6, p. 470–477, 2002.

RASSAF, T. et al. Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans.

European Heart Journal, v. 27, n. 14, p. 1699–1705, 2006.

RING, A. et al. Exogenous nitric oxide donation causes desensitization of arteriolar relaxing activity in vivo: An intravital analysis in mice. **Journal of Surgical Research**, v. 164, n. 1, p. 169–174, 2010.

SALAS, E. et al. S-nitrosoglutathione inhibits platelet activation and deposition in coronary artery saphenous vein grafts in vitro and in vivo. **Heart**, v. 80, n. 2, p. 146–150, 1998.

SAXENA, T.; ALI, A. O.; SAXENA, M. Pathophysiology of essential hypertension: an update. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 16, n. 12, p. 879–887, 2018.

SEABRA, A. B. et al. Nitric oxide-releasing polymeric nanoparticles against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 617, n. 1, 2015.

SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 1624–1637, 2010.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 131–194, 2019.

SIMKO, F. et al. Effect of ivabradine on a hypertensive heart and the renin-angiotensin-aldosterone system in l-name-induced hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 1–15, 2018.

SOGO, N. et al. S-Nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: Therapeutic potential in bypass surgery. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, n. 6, p. 1236–1244, 2000.

STAMLER, J. S. S -Nitrosothiols in the Blood. **Circulation Research**, v. 94, n. 4, p. 414–417, 5 mar. 2004.

STAMLER, J. S.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J. u ARTICLE Biochemistry Nitric Oxide

and Redox-Activated Forms. v. 258, n. December, 1992.

STOMBERSKI, C. T.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 30, n. 10, p. 1331–1351, 2019.

TANG, Y.; JIANG, H.; BRYAN, N. S. Nitrite and nitrate: Cardiovascular risk-benefit and metabolic effect. **Current Opinion in Lipidology**, v. 22, n. 1, 2011.

TOLEDO, J. C.; AUGUSTO, O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 5, p. 975–989, 2012.

WANG, J. et al. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 861–866, 2010.

WEBB, A. J. et al. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. **Hypertension**, v. 51, n. 3, p. 784–790, 2008.

WEI, F. F. et al. Resistant hypertension. **Kardiologia Polska**, v. 76, n. 7, p. 1031–1042, 2018.

WHALEN, E. J. et al. Regulation of β -Adrenergic Receptor Signaling by S-Nitrosylation of G-Protein-Coupled Receptor Kinase 2. **Cell**, v. 129, n. 3, p. 511–522, 2007.

WILCZEWSKA, A. Z. et al. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p. 1020–1037, 2012.

WOLHUTER, K.; EATON, P. How widespread is stable protein S-nitrosylation as an end-effector of protein regulation? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 109, n. February, p. 156–166, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. A Global brief on hypertension. p. 9, 2013.

WU, W. et al. Time lasting S-nitrosoglutathione polymeric nanoparticles delay cellular protein S-nitrosation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 89, p. 1–8, 2015a.

WU, W. et al. Polymer nanocomposite particles of S-nitrosoglutathione: A suitable formulation for protection and sustained oral delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 1, p. 354–361, 2015b.

WU, W. et al. Polymer nanocomposites enhance S-nitrosoglutathione intestinal absorption and promote the formation of releasable nitric oxide stores in rat aorta. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 7, p. 1795–1803, 2016.

WYNIA-SMITH, S. L.; SMITH, B. C. Nitrosothiol formation and S-nitrosation signaling through nitric oxide synthases. **Nitric Oxide**, v. 63, p. 52–60, fev. 2017.

YANG, B. K. et al. Methodologies for the sensitive and specific measurement of S-nitrosothiols, iron-nitrosyls, and nitrite in biological samples. **Free Radical Research**, v. 37, n. 1, p. 1–10, 2003.

ZHANG, C. et al. S-Nitrosothiols: chemistry and reactions. **Chem. Commun.**, v. 53, n. 82, p. 11266–11277, 2017.

ZWEIER, J. L. et al. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. **Nature Medicine**, v. 1, n. 8, p. 804–809, 1995.