



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

RENATO CORRÊA NOGUEIRA

Efeitos deletérios da interferência no ciclo êntero-salivar do nitrato/nitrito sobre o aparelho cardiovascular

Ribeirão Preto - SP

2023

RESUMO

NOGUEIRA, R.C. **Efeitos deletérios da interferência no ciclo êntero-salivar do nitrato/nitrito sobre o aparelho cardiovascular.** 2023. 108f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O tratamento com nitrito via oral apresenta resultados benéficos para a homeostase cardiovascular em vários acometimentos. Isso se deve ao fato de que o nitrito participa da via alternativa de formação do óxido nítrico (NO), denominada via nitrato-nitrito-NO. Esta via depende das bactérias orais redutoras de nitrato e do ambiente ácido do estômago, resultando tanto na formação de NO, quanto de espécies nitrosiladas como os S-nitrosotióis. Estes são potentes agentes nitrosantes capazes de agir como doadores de NO e de nitrosilar proteínas por transnitrosilação. Alguns estudos demonstraram que o tratamento ou a suplementação dietética com nitrito estabelecem um efeito citoprotetor e cardioprotetor contra doenças cardiovasculares, tendo esse efeito ocorrido em consonância com um aumento nos níveis plasmáticos de nitrosotióis, acompanhado por aumento da conversão de nitrito em NO e da nitrosilação de proteínas. Tal efeito protetor se dá de forma independente da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual compõe a via clássica de formação de NO, sugerindo a participação da via nitrato-nitrito-NO para efetivação do efeito. Portanto o tratamento com omeprazol, por aumentar o pH e alterar as reações químicas que acontecem no estômago, atenua a formação de S-nitrosotióis e a nitrosilação proteica cardiovascular. Em vista disto, o objetivo deste trabalho foi determinar se o tratamento com omeprazol inibe os aumentos das concentrações circulantes de S-nitrosotióis e conseqüentemente da nitrosilação proteica após tratamento com nitrito oral. Para isto, animais foram tratados com veículo, omeprazol, nitrito de sódio via oral ou via intraperitoneal, bem como foi feita a associação do tratamento do omeprazol com ambas as vias de administração do nitrito. Foi então realizada uma avaliação funcional da relação Pressão-Volume do ventrículo esquerdo, em seguida, sangue arterial foi coletado e centrifugado (3.000 rpm, 6 minutos, 4°C) e os animais foram eutanasiados com uma supradose intravenosa de cetamina e xilazina (160 mg/kg e 30 mg/kg respectivamente). Por fim, foram coletadas amostras teciduais para os ensaios bioquímicos, onde foi realizada a determinação das concentrações de nitrito e espécies nitrosiladas, análises *in situ* de atividade de

metaloproteinases de matriz (MMPs) e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por DHE e zimografia em gel para avaliar níveis e atividade de MMP-2 e -9. Os resultados funcionais e bioquímicos foram analisados por análise de variância de dois fatores (two way ANOVA) seguida por pós-teste de Bonferroni. Os protocolos de experimentação animal foram aprovados pela comissão de ética do *campus* da USP de Ribeirão Preto, registrado sob o número de protocolo 243/2019. O tratamento com omeprazol aumenta o estresse oxidativo e a atividade MMPs no coração, o nitrito oral não reduz tal resposta, enquanto o tratamento com nitrito intraperitoneal atenua a magnitude destes efeitos. O tratamento com omeprazol também diminui os níveis plasmáticos de S-nitrosotióis após o tratamento com nitrito oral. Em suma, este estudo sugere que o tratamento com omeprazol, por interferir na acidez estomacal e conseqüentemente, na via nitrato-nitrito-NO, inibe efeitos cardioprotetores providos pelo tratamento com nitrito de sódio via oral. Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPESP.

Palavras-chave: Omeprazol, nitrito de sódio, nitrosotióis, metaloproteinases de matriz.

ABSTRACT

NOGUEIRA, R.C. **Deleterious effects of interfering with the nitrate/nitrite enterosalivary cycle on the cardiovascular system.** 2023. 108p. Thesis (Doctorate) – Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2023.

Oral treatment with sodium nitrite provides benefits to cardiovascular homeostasis in several outcomes. This happens due to the participation of nitrite in the alternative nitric oxide (NO) formation pathway, named nitrate-nitrite-NO. The success of this pathway is dependent on the oral commensal nitrate-reducing bacteria and on the acidic environment of the stomach, yielding not only NO, but also nitroso species such as S-nitrosothiols, which are potent nitrosating agents able to donate NO and nitros(yl)ate other proteins by thansnitrosilation. Some studies showed that the treatment or dietary supplementation with nitrite establishes a cito- and cardioprotective effect against cardiovascular diseases, which happens in parallel to increased plasmatic levels of nitrosothiols, enhanced conversion of nitrite to NO, and formation of nitrosylated proteins. This protective effect was established in a nitric oxide synthase (NOS) independent manner, suggesting that the participation of the nitrate-nitrite-NO pathway. The treatment with omeprazole, by elevating pH and changing chemical reactions that happens in the stomach, blunts the formation of S-nitrosothiols and protein nitrosylation, processes that were showed to be important in the protective effect of oral administrated nitrite. The aim of this study was to determine whether omeprazole treatment inhibits the circulating levels of S-nitrosothiols and consequently protein nitrosylation provided by oral nitrite. Therefore, animals were treated with vehicle, omeprazole, sodium nitrite orally or intraperitoneally, also, the omeprazole treatment was associated with both treatment pathways of nitrite. Myocardial functional evaluation was assessed by analysis of the Pressure-Volume relationship in the left ventricle, then arterial blood was collected and centrifuged (3000 rpm, 6 min, 4°C), and the animals were euthanised by overdose of ketamin/xilazin (160 mg/kg / 30 mg/kg) intravenous injection. Tissue samples were collected to perform biochemical assays, such as determination of the nitrite and nitrosylated species concentration, *in situ* analysis of matrix metalloproteinases (MMPs) activity and reactive oxygen species (ROS) production using DHE, gelatin zymoghaphy to assess levels and activity of MMP-2 and -9. Functional and biochemical results were examined by two-way analysis

of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test. The animal experimental protocol was approved by the ethical committee for animal use from USP campus in Ribeirao Preto, being registered under the protocol number 243/2019. Treatment with omeprazole increases oxidative stress and MMPs activity in the cardiac tissue, whilst the treatment with sodium nitrite administered via intraperitoneal attenuates those effects magnitude. Treatment with omeprazole also diminishes the plasmatic levels of nitrite and nitrosothiols, derived from oral nitrite. Thus, the present study suggests that the treatment with omeprazole, by interfering with the gastric acidic status, therefore with the nitrate-nitrite-NO pathway, inhibits cardioprotective effects derived from the treatment with oral sodium nitrite. Financial support: CAPES, CPNq and FAPESP.

Keywords: Omeprazole, sodium nitrite, nitrosothiols, matrix metalloproteinases.