UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Detecção e caracterização de lipídios nitrados no plasma e nas lipoproteínas humanas

Émersom Silva Lima

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2003

17773

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Detecção e caracterização de lipídios nitrados no plasma e nas lipoproteínas humanas

Émersom Silva Lima

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2003

DEDALUS - Acervo - CQ
30100005759

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Lima, Émersom Silva
L732d Detecção e caracterização de lipídios nitrados no plasma e nas lipoproteínas humanas / Émersom Silva Lima. -- São Paulo, 2003.
1v.(Paginação irregular)

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Bioquímica clínica 2. Lipídio : Metabolismo 3. Espectrometria de massa : Química analítica I. T. II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Émersom Silva Lima

Detecção e caracterização de lipídios nitrados no plasma e nas lipoproteínas humanas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Tit. Dulcineia Saes Parra Abdalla
Orientadora

Prof. Tit. Paolo Di Mascio
1°. examinador

Prof. Dr. Francisco R.M. Laurindo
2°. examinador

Prof. Dr. Marcelo G. Oliveira
3°. examinador

Prof. Dra. Marta H. Krieger
4°. examinador

São Paulo, 09 de dezembro de 2003.

DEDICATÓRIA

Dedico a...

Deus, pelo seu amor e pela força para a realização deste trabalho

Meus pais Ozeas e Idelzuite, pelo constante incentivo, carinho e compreensão

Minha esposa Janaína e minha filha Evelyn Cristinne, pelo convívio, cumplicidade e amor

Agradeço...

A Profa. Dra. Dulcineia S. P. Abdalla, pela indispensável orientação durante a realização do trabalho, pela amizade, apoio e incentivo nestes meus primeiros passos da vida acadêmica.

Aos colegas pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Oxidação de Lipoproteínas pela ajuda e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Paolo Di Mascio do Instituto de Química da USP, onde foram realizados os experimentos de espectrometria de massa, pelo apoio e incentivo na realização do trabalho.

A Clécio F. Klitzke e Mirian Uemi pela colaboração nas análises de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear.

A Profa. Ohara Augusto e Marcelo Bonini, pela realização dos experimentos de ressonância paramagnética eletrônica e importante ajuda na discussão dos resultados.

Ao Prof. Dr. Heraldo S. Possolo e Hermes Barbeiro da Faculdade de Medicina da USP, onde foram realizados os ensaios de vasorelaxamento, pela colaboração na realização dos experimentos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, que sempre tiveram disponíveis quando da necessidade de qualquer ajuda.

A todos os professores das disciplinas de pós-graduação as quais foram de primordial importância para o meu crescimento pessoal e intelectual.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho com o seu apoio prático ou intelectual ou simplismente pelo incentivo e amizade.

APOIO FINANCEIRO

FAPESP- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PRONEX - Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

FUSP - Fundação Universidade de São Paulo

Agradecimento especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (**FAPESP**) pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

EPÍGRAFE

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

SÚMARIO

Resumo ..... *i*

Summary ..... *ii*

Lista de abreviaturas ..... *iii*

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Principais ações biológicas do óxido nítrico 2

1.2. Formação e papel biológico das espécies reativas do nitrogênio 8

1.3. Formação *in vitro* e *in vivo* de lipídios nitrados 10

1.4. Atividades biológicas dos lipídios nitrados 14

2. OBJETIVOS 18

3. MATERIAL E MÉTODOS 20

3.1. Reagentes 20

3.2. Equipamentos 20

3.3. Obtenção das amostras 21

3.4. Síntese dos padrões de lipídios nitrados e nitrosilados 22

3.4.1. *Síntese, purificação e quantificação do padrão de 18:2-OOH* 22

3.4.2. *Reação do 18:2-OOH com nitrito de sódio* 23

3.4.3. *Reação do 18:2 ou 18:2-OOH com* NO_2BF_4 23

3.4.4. *Reação do Ch18:2 com nitrito de sódio ou* NO_2BF_4 24

3.4.5. *Isolamento e purificação dos padrões de lipídios nitrados* 24

3.5. Caracterização química dos lipídios nitrados 25

3.5.1. *Análises por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa* 25

3.5.1.1. Produtos derivados do ácido linolêico 25

3.5.1.2. Produtos derivados do Ch18:2 26

3.5.2. *Análises por absorção no infra-vermelho* 27

3.5.3. *Análises por ressonância magnética nuclear* 27

3.5.4. *Teste de estabilidade química* 28
3.6. Detecção e caracterização dos lipídios nitrados no plasma e nas lipoproteínas 28
3.6.1 *Extração dos lipídios nitrados* 28
3.6.2. *Análise dos lipídios nitrados derivados do 18:2 no plasma* 30
3.6.3. *Análise dos lipídios nitrados derivados do Ch18:2* no plasma e nas lipoproteínas 31
3.7. Caracterização da liberação de $^{\bullet}NO$ pelos lipídios nitrados 31
3.7.1. *Detecção direta por quimiluminescência* 31
3.7.2. *Análises por ressonância paramagnétrica eletrônica* 34
3.7.3. Efeito de relaxamento em anéis aórticos de ratos 35

4. RESULTADOS 37
4.1.Obtenção dos padrões de lipídios nitrados e nitrosilados 37
4.1.1. *Reação do 18:2-OOH com nitrito de sódio* 37
4.1.2. *Reação do 18:2 ou 18:2-OOH com* NO_2BF_4 ou $NOBF_4$ 40
4.1.3. *Reação Ch18:2 com* $NaNO_2$ *ou* NO_2BF_4 45
4.2. Análises por absorção no infra-vermelho 49
4.3. Análises por ressonância magnética nuclear 54
4.4 Teste de estabilidade química 56
4.5. Sistema de extração dos lipídios nitrados derivados do 18:2 60
4.6. Detecção e caracterização dos lipídios nitrados derivados do 18:2 no plasma 63
4.7. Detecção e caracterização dos lipídios nitrados derivados do Ch18:2 no plasma e nas lipoproteínas 68
4.8. Caracterização da liberaçao de $^{\bullet}NO$ pelo lipídios nitrados 75
4.8.1. Liberação direta detectada por quimiluminescência 75
4.8.2. Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica 78
4.8.3. Efeito de relaxamento em anéis aórticos de ratos 83

5. DISCUSSÃO **89**

5.1.1. Síntese, caracterização e detecção dos lipídios nitrados derivados do 18:2 no plasma 89

5.1.2. Síntese, caracterização e detecção dos lipídios nitrados derivados do Ch18:2 no plasma nas lipoproteínas 95

5.1.3. Liberação de •NO e efeito de vasorelaxamento 98

6. CONCLUSÕES **106**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **109**

LIMA, E.S. **Detecção e caracterização de lipídios nitrados no plasma e nas lipoproteínas humanas.** São Paulo, 2003. 118p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

O óxido nítrico (•NO) e outras espécies reativas do nitrogênio reagem com radicais lipídicos gerando lipídios nitrados (LNs) aos quais têm sido atribuídas diversas ações antiaterogênicas. Contudo, apesar de diversos estudos terem demonstrado a formação de LNs em sistemas isolados, até então, a detecção destes produtos em amostras humanas não havia sido descrita. No presente trabalho foram realizadas a síntese, a caracterização química, a detecção em plasma e lipoproteínas humanas e a avaliação da atividade de liberação de •NO; do nitrolinoleato (LNO_2), nitrohidroxilinoleato (LNO_2OH) e nitrolinoleato de colesterol ($ChLNO_2$), derivados do ácido linoleico, seu hidroperóxido e do linoleato de colesterol, respectivamente. Os LNs foram sintetizados *in vitro*, purificados com cromatografia em coluna ou cromatografia de camada delgada e caracterizados por cromatografia liquida acoplada à espectrometria de massa seqüencial com ionização por eletrospray (LC-ESI/MS/MS), espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. Os LNs foram detectados no plasma e nas lipoproteínas por LC-ESI/MS/MS. A liberação de •NO pelos produtos sintetizados foi confirmada pela análise direta do •NO por quimiluminescência; por ressonancia paramagnética eletrônica (RPE), através da análise do complexo formado pela reação do •NO liberado com *spin traps* (Fe-MGD_2, Carboxi-PTIO e DBNBS) e pelo efeito do vasorelaxamento em anéis aórticos de ratos. As análises quantitativas demostraram a presença de níveis mais elevados de LNO_2 e LNO_2OH no plasma de indivíduos hiperlipidêmicos em relação a normolipidêmicos, detectando-se também $ChLNO_2$ no plasma e nas frações lipoproteicas de indivíduos normolipidêmicos. Os produtos sintetizados liberaram •NO detectado por quimiluminescência, resultado que foi comfirmado pelos experimentos de RPE. Os lipídios nitrados também induziram relaxamento independente do endotélio, o qual foi inibido pela presença de ODQ, um inibidor da guanilato ciclase solúvel. A presença de LNs foi então pela primeira vez descrita em plasma e nas lipoproteínas humanas. Estes achados podem tanto comprovar o papel antioxidante do •NO *in vivo* e/ou representar um mecanismo compensatório de proteção durante o estresse nitrativo/oxidativo presente nas hiperlipidemias.

SUMMARY

LIMA, E.S. **Detection and characterization of nitrated lipids in human blood plasma and lipoproteins.** São Paulo, 2003. 118p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Nitric oxide (•NO) and •NO-derived reactive species react with lipidic radicals to generate nitrated species. Several *in vitro* studies have described nitrated lipid-derived products. However, the presence of the nitrated lipids in human biological samples has not been demonstrated yet. Herein, we report the synthesis, purification, characterization, bioactivity of •NO release and detection of nitrated derivatives of the linoleic acid (LNO_2) linoleic acid hydroperoxide (LNO_2OH) and cholesteryl linoleate ($ChLNO_2$) in human blood plasma and lipoproteins using a high-pressure liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry method (LC-ESI/MS/MS). The nitrated products were synthesized *in vitro*, purified by column liquid chromatography or thin liquid chromatography before characterization analyses. •NO release analyses was performed using quimiluminescence, electron paramagnetic resonance analysis of NO-spin trap complex (Fe-MGD_2, Carboxy-PTIO, DBNBS) and by induction effect of endothelium-independent relaxation in rat aortic rings. Stable products, showing the same chromatographic characteristics and fragmentation pattern as those LNO_2, LNO_2OH and $ChLNO_2$ synthesized standards, were found in human blood plasma and lipoproteins of normolipidemic and hyperlipidemic subjects. The synthesized standards released •NO spontaneously, which was enhancing by ascorbate and inhibited by hemoglobin and carboxy-PTIO, besides to relax the rat aortic rings. The presence of this novel nitrogen-containing lipid adduct was by the first time detected in human biological samples. It may represent a potential antioxidant role that •NO or its metabolites play during *in vivo* lipid oxidation, through the generation of a probably protection compensatory mechanism against the nitrative/oxidative stress found in the hyperlipidemia.

$^{\bullet}NO$	Óxido nítrico
$^{\bullet}OH$	Radical hidroxila
17:0	Acido heptadecanóico
18:2	Ácido linoleico
18:2-OOH	Hidroperóxido do ácido linoleico
^{3}H-Ch18:2	Linoleato de colesterol marcado com ^{3}H
AA	Ácido araquidônico
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AMVN	2,2´-azobis (2,4-dimetilvalenonitrila)
Carboxy-PTIO	2-phenil-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido
Ch18:2	Linoleato de colesterol
Ch18:2-OOH	Hidroperóxido do linoleato de colesterol
DNA	Ácido desoxirribonuclêico
DBNBS	Sulfonato de 3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno
EDTA	Ácido etilenetriaminopentaacético
ESI	Electrospray
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HPLC-CL	Cromatografia líquida de alta performance com detecção por quimiluminescência
$L^{\bullet}$	Radical alquila
$L(O)NO_2$	Nitroepoxidolinoleato
LC/ESI-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa seqüencial com ionização por electrospray.
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LNO_2	Nitrolinoleato
LNO_2	Nitrohidroxilinoleato
$LO^{\bullet}$	Radical alcoxila
LONO	Nitritolinoleato
$LONO_2$	Linoleato nitrato
$LOO^{\bullet}$	Radical Peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPO	Lipoperoxidação
MRM	Monitoramento de reação múltipla
MS/MS	Espectrometria de massa seqüencial ou em *tandem*
$NO_2^{\bullet}$	Radical dióxido de nitrogênio
NO_2BF_4	Tetrafluoroborato de nitronium
$NOBF_4$	Tetrafluoroborato de nitrosonium

ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalin-1-ona
$ONOO^-$	Ânion peroxinitrito
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RNO_2	Nitrolipídio
RONO	Nitritolipídio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPE	Ressonância paramagnética eletrônica
rpm	Rotação por minuto
SIR	Monitoramento de íon selecionado
UV	Ultravioleta

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Após a descoberta da formação endógena do óxido nítrico (•NO) e conseqüentemente de outras espécies reativas derivadas do nitrogênio (ERNs), muito se tem elucidado a respeito do papel destas substâncias *in vivo*. Contudo, vários aspectos relacionados às suas ações, por exemplo, no metabolismo lipídico, ainda permanecem pouco esclarecidos. Lipídios nitrados foram inicialmente descritos como produtos da reação de óxidos de nitrogênio com ácidos graxos insaturados em estudos utilizando poluentes atmosféricos (PRYOR, PRIER & CHURCH, 1981; PRYOR, LIGHTSEY & CHURCH, 1982). A partir daí, diversos modelos experimentais demonstraram a formação de lipídios nitrados ou nitrosilados em meios compatíveis com condições fisiológicas (PRYOR, CASTLE & CHURCH, 1985; GALLON & PRYOR, 1993; PADMAJA &HUIE, 1993; RUBBO *et al.*, 1994; RUBBO *et al.*, 1995; RUBBO & FREEMAN, 1996; O'DONNELL *et al.*, 1997 ; O'DONNELL *et al.*, 1999a;). Estes resultados geraram especulações muito fortes a respeito da formação destes compostos *in vivo*.

Diversos grupos têm também estudado características químicas e biológicas destes compostos. Em um destes estudos foi testada a atividade citotóxica de derivados nitrados do ácido linoleico (18:2) numa linhagem celular, verificando-se que estes não apresentaram nenhum efeito tóxico (NAPOLITANO *et al.*, 2000). Além disso, outros trabalhos têm mostrado que estes compostos possuem ação vasodilatadora dependente da guanilato ciclase (COLES *et al.*, 2002; BALAZY *et al.*, 2001), indicando fortemente liberação endógena de •NO. Isto sugere que estes compostos possam servir como uma forma orgânica de armazenamento tecidual de

•NO. Esta propriedade faz desses compostos alvos de potencial interesse para a indústria farmacêutica, haja vista a possibilidade de substituição aos nitratos orgânicos utilizados atualmente na terapia convencional da angina instável.

Em vista destes dados, achamos importante investigar no plasma humano a presença de produtos nitrados e/ou nitrosilados derivados do metabolismo lipídico, sejam ácidos graxos (principalmente na albumina-plasma) ou ésteres de colesterol (plasma e lipoproteínas), o que até então não havia sido reportado na literatura. Utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, demonstramos a presença de produtos nitrados derivados do 18:2 e do linoleato do colesterol nas lipoproteínas e no plasma de indivíduos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos. Também foi possível verificar a propriedade destes compostos liberarem óxido nítrico, a qual foi caracterizada *in vitro* pela detecção direta do •NO liberado por quimiluminescência ou indiretamente por ressonância paramagnética eletrônica. A liberação de •NO pelos compostos sintetizados também foi demonstrada pelo efeito de relaxamento em anéis aórticos de ratos. Assim, o presente trabalho demonstrou pela primeira vez a presença de lipídios nitrados no organismo humano e estudou a propriedade destes compostos liberarem •NO *in vitro* e *in vivo*.

1.1 Principais ações biológicas do óxido nítrico

O •NO é um gás incolor, moderadamente solúvel em água e bastante solúvel em solventes orgânicos, que apresenta fácil difusão nos tecidos orgânicos, possuindo em sua estrutura um elétron desemparelhado no orbital mais externo, o

que lhe confere característica de um radical livre (HALLIWEL & GUTERIDGE, 1999). Atua como mensageiro intra e extracelular, na regulação de vários processos biológicos (CROW & BECKMAN, 1995; TIKKANEN & FYHRQUIST, 1995).

O •NO, reconhecido como fator de relaxamento vascular derivado do endotélio (MONCADA *et al.*, 1988), é sintetizado a partir da L-arginina por uma família de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS), que catalisam a oxidação de um nitrogênio guanidínico da L-arginina para formar •NO e citrulina (SHIMIZU *et al.*, 1997). Existem três tipos de NOS: a NOS constitutiva endotelial (ecNOS), a NOS constitutiva neuronal (ncNOS) e a NOS indutível (iNOS). As NOS constitutivas são dependentes de cálcio e calmodulina e estão presentes em células endoteliais, plaquetas e no sistema nervoso central (SNC), sendo moduladas pelo "shear stress" e uma variedade de agonistas (acetilcolina, histamina, bradicinina, serotonina, norepinefrina, etc) (HALLIWEL & GUTERIDGE, 1999). O •NO sintetizado pelas NOS constitutivas em baixas concentrações e por curtos períodos de tempo, tem um papel crucial na regulação da pressão sangüínea, do tônus vascular e na agregação plaquetária. A iNOS é independente de cálcio e indutível por estímulos imunológicos ou infecciosos, estando presente em uma variedade de tecidos, incluindo células musculares lisas, macrófagos, neutrófilos e hepatócitos (MARLETTA, 1993; KNOWLE & MONCADA, 1994; NAVA *et al.*, 1995). O •NO também pode ser gerado não enzimaticamente, a partir do nitrito, em condições de baixo pH, como no compartimento gástrico e em vesículas fagocíticas (WEITZBERG & LUNDBERG, 1998; LEPORE *et al.*, 2002).

As principais ações fisiológicas do •NO incluem vasodilatação, inibição da adesão e agregação plaquetária, regulação de algumas vias de transdução de sinais, neurotrasmissão e regulação do sistema imune. Contudo, a mais conhecida ação do •NO é a regulação do tônus vascular, haja vista que a parede vascular está em um estado de vasodilatação ativa devido à sua ação (TIKKANEN & FYHRQUIST, 1995). O •NO formado nas células endoteliais promove a nitrosilação do grupo heme da guanilato cliclase solúvel (sGC), aumentando o nível intracelular de monofosfato cíclico de guanina (cGMP). Nas células musculares lisas o cGMP ativa quinases cGMP-dependentes que fosforilam e modulam a atividade de proteínas envolvidas na homeostase do cálcio, resultando em uma redução na quantidade de cálcio disponível para a contração, promovendo a vasodilatação. O •NO também pode atuar sobre fatores de transcrição e modular funções vasculares alterando a expressão de genes que codificam proteínas do endotélio importantes para a manutenção da homeostase vascular (MARLETTA, 1993; KNOWLE & MONCADA, 1994; NAVA *et al.*, 1995).

O •NO pode reagir com diversas substâncias em sistemas biológicos, tais como, grupos tiol e heme das proteínas. Por exemplo, sua reação com grupos tiois de proteínas ou compostos de baixo peso molecular, como o GSH, forma S-nitrosotióis (WINK & MITCHELL, 1998). Esta reação pode prolongar a vida média do •NO e preservar sua atividade biológica. Portanto, o •NO pode ser armazenado na forma de *s*-nitrosotióis e posteriormente ser liberado para exercer suas ações biológicas (STAMLER *et al.*, 1992). Além disso, uma das reações mais importantes é aquela com espécies reativas do oxigênio, como o radical hidroxila, radicais lipídicos

e especialmente com o ânion radical superóxido (HUIE & PADJAMA, 1993), como visto, respectivamente, nas **reações 1, 2** e **3**.

$^{\bullet}NO + OH^{\bullet} \rightarrow HNO_2$ (ácido nitroso) Reação 1

$LO_2^{\bullet} + {}^{\bullet}NO \rightarrow LOONO$ (alquil peroxinitrito) Reação 2

$O_2^{-\bullet} + {}^{\bullet}NO \rightarrow ONOO^-$ (peroxinitrito) Reação 3

Por outro lado, o $^{\bullet}NO$ também pode exercer atividade antioxidante, direta ou indiretamente, em sistemas biológicos através principalmente da sua propriedade de reagir com centros metálicos e radicais orgânicos intermediários (WINK *et al.*, 1995; WEVER, STROES & RABELINK, 1998; PATEL *et al.*, 2000). Por exemplo, quando a relação estequiométrica entre o $^{\bullet}NO$ e o radical superóxido for maior que um, ou seja, excesso do primeiro em relação ao segundo, o $^{\bullet}NO$ atua como antioxidante, reagindo principalmente com $L^{\bullet}$, $LO^{\bullet}$, $LOO^{\bullet}$, formando adutos destes radicais e inibindo a oxidação da LDL (GOSS *et al.*, 1995; RUBBO & FREEMAN, 1996). Contudo, em condições nas quais a produção de superóxido é maior, a oxidação é favorecida (RUBBO *et al.*, 1995). Outra evidência da ação antioxidante do $^{\bullet}NO$ é que quando sua síntese endógena é estimulada, ou, quando se faz sua administração exógena, sob condições de estresse oxidativo, ocorre inibição da lesão oxidativa nos níveis molecular e funcional (MALO-RANTA *et al.*, 1994; RUBBO & FREEMAN, 1996). A reação direta do $^{\bullet}NO$ com centros metálicos contendo ferro ou cobre nos seus estados reduzidos também pode inibir a reação de fenton, a través da formação do complexo nitrosil-metal (WINK & MITCHELL, 1998).

Outra via importante pela qual o •NO atua eficazmente como antioxidante ocorre através da inativação das enzimas envolvidas na oxidação endógena de ácidos graxos: lipoxigenase e cicloxigenase (WINK & MITCHELL, 1998). Enquanto a cicloxigenage converte o ácido araquidônico em prostaglandinas tromboxanos, e prostaciclinas; a lipoxigenase é responsável pela formação dos leucotrienos. Estas substâncias chamadas genericamente de eicosanóides são importantes na mediação de importantes processos fisiológicos durante os processos inflamatórios promovendo diversas ações fisiopatológicas. O •NO pode inibir a atividade da lipoxigenase através da reação com o ferro no sítio ativo da enzima (O'DONNELL & FREEMAN, 2001). Em condições fisiológicas o ferro no seu estado oxidado (Fe^{3+}) presente na forma ativa da enzima, pode ser reduzido ao seu estado ferroso (Fe^{2+}), que rapidamente se liga ao •NO, levando a formação do complexo Fe- •NO que inibe a atividade da enzima. A atividade da heme-proteína cicloxigenase também pode ser influenciada pela formação do complexo •NO-metal e interações do •NO com outros radicais. Desta forma, o •NO exerce papel importante como antioxidante endógeno (**Figura 1**) e também na formação dos diferentes eicosanóides (WINK & MITCHELL, 1998).

Uma enzima importante envolvida no metabolismo do •NO é a mieloperoxidase (MPO). A MPO é uma enzima que contem o grupo heme sendo secretada após estimulação de fagócitos durante o "burst" respiratório, por exemplo nos processos inflamatórios (CARR *et al.*,2000). Neste sistema, a partir do ácido hipocloroso (HOCl) formado, a MPO pode oxidar o nitrito gerando cloreto de nitrila (NO_2Cl) que pode depletar antioxidantes da LDL, iniciar o processo de LPO, induzir

a formação de 3-nitrotirosina ou gerar uma partícula de LDL semelhante àquelas encontradas nas células espumosas (O'DONNELL & FREEMAN, 2001). A MPO pode também, na presença de H_2O_2, oxidar nitrito diretamente a $^{\bullet}NO_2$ induzindo a formação de moléculas nitradas e/ou oxidadas (Byun *et al.*, 1999).

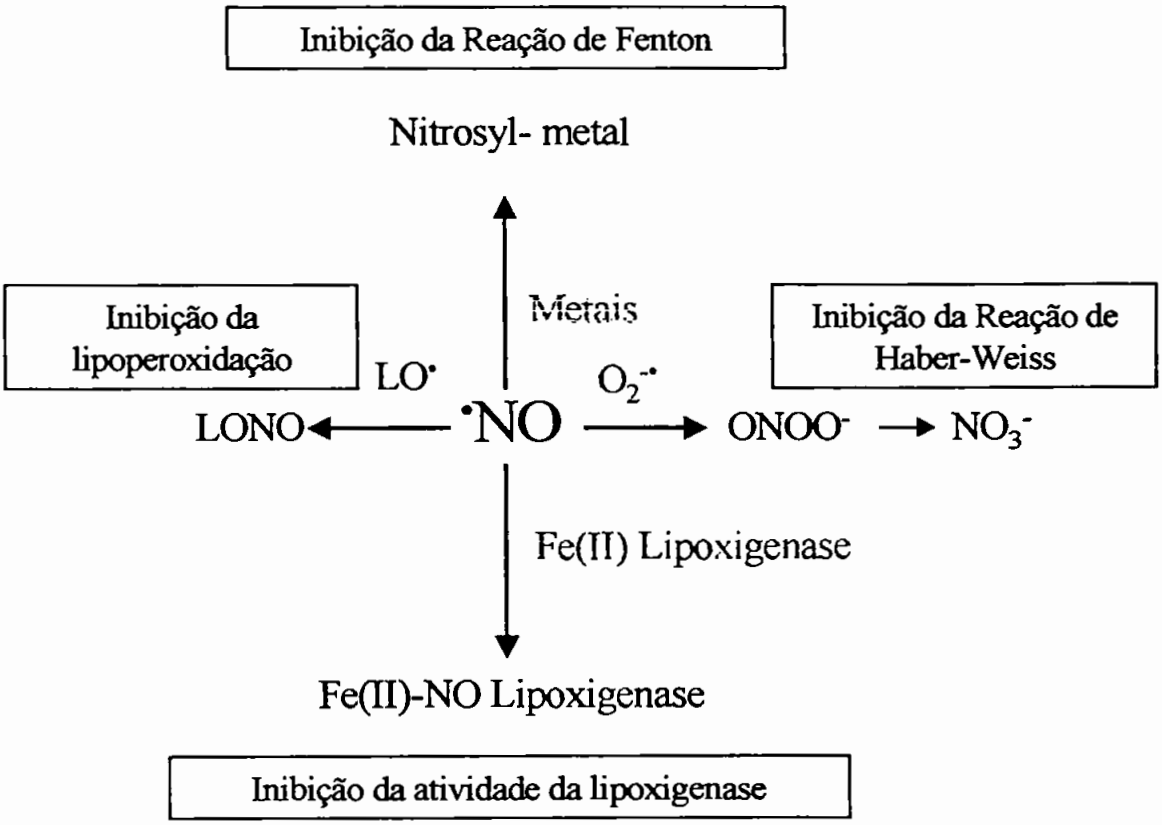

Figura 1: Principais vias de atuação do óxido nítrico como antioxidante (modificado de WINK & MITCHELL, 1998).

1.2 Formação e papel biológico das espécies reativas do nitrogênio

As ERNs são geradas *in vivo* a partir do metabolismo do $^{\bullet}NO$ e têm papel importante no metabolismo oxidativo, proporcionando diversos efeitos biológicos (PATEL *et al.*, 1999). Dentre as principais reações mediadas pelas ERNs incluem-se a nitração (adição de $^{\bullet}NO_2$ ou $^{+}NO_2$), nitrosilação (adição de $^{\bullet}NO$) e nitrosação (adição de NO^{+}) em várias classes de moléculas, como proteínas e lipídios (PATEL *et al.*, 1999). Estas reações também podem promover ou inibir a oxidação de biomoléculas (EISERICH *et al.*, 1998, O'DONNELL *et al.*, 1999a).

Uma das principais reações do $^{\bullet}NO$ ocorre através da sua interação com centros metálicos enzimáticos, especialmente aqueles contendo ferro ou cobre, como o citocromo *c* e mieloperoxidase. O potencial de oxi-redução dos metais de transição contidos nestes centros proporciona condições para geração de ERNs a partir da reação com o $^{\bullet}NO$ (PATEL *et al.*, 1999; CARR *et al.*, 2000). Outra via importante de geração das ERNs é através da reação no $^{\bullet}NO$ com o ânion radical superóxido ($O_2^{-\bullet}$), gerando o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) (HUIE & PADJAMA, 1993). Tanto o $O_2^{-\bullet}$ como o $^{\bullet}NO$ são radicais livres, reagindo com uma constante de velocidade da ordem de 10^{10} M^{-1} s^{-1} em soluções aquosas, implicando que esta reação é limitada apenas pela difusão (KISSNER *et al.*, 1997). O $ONOO^-$ existe em equilíbrio com sua forma protonada, o ácido peroxinitroso (ONOOH, pKa = 6,8). Assim, em sistemas biológicos, ambas as formas podem estar presentes. No plasma (pH 7,4), por exemplo, cerca de 80% estaria na forma aniônica (RADI *et al.*, 2001).

Os efeitos biológicos promovidos pelo $ONOO^-$ podem ser classificados de acordo com as reações e os substratos envolvidos, tais como: (i) reações redox

diretas com centros metálicos contendo metais de transição; (ii) reação com o dióxido de carbono, formando nitroso peroxicarboxilato [$ONOOCO_2$], que pode aumentar o seu poder de nitração em relação à oxidação; (iii) decomposição espontânea gerando outros radicais como o $^{\bullet}NO_2$ e $^{\bullet}OH$, que poderão gerar outras substâncias nitrantes ou oxidantes, dependendo principalmente da concentração de oxigênio no meio (RADI *et al.*, 2001), conforme esquema apresentado na **Figura 2**.

O ânion peroxinitrito, ou os produtos derivados de sua decomposição também pode oxidar grupos SH de proteínas, promover a nitração de resíduos de tirosina, inativar antiproteases pela reação com a metionina, induzir peroxidação lipídica ou reagir com aminoácidos aromáticos em proteínas para formar nitroadutos (VAN DER VLIET *et al.*, 1994). Também a exposição da LDL ao peroxinitrito pode promover a oxidação desta lipoproteína, contribuindo assim para seu potencial aterogênico (HOGG *et al.*, 1993; GRAHAN *et al.*, 1993). Portanto, o $ONOO^-$ e as espécies reativas dele derivadas podem mediar alguns efeitos deletérios do $^{\bullet}NO$, como, por exemplo, a oxidação da LDL e de grupos sulfidrila, assim como a depleção de antioxidantes do plasma (BRUCKDORFER *et al.*, 1990).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

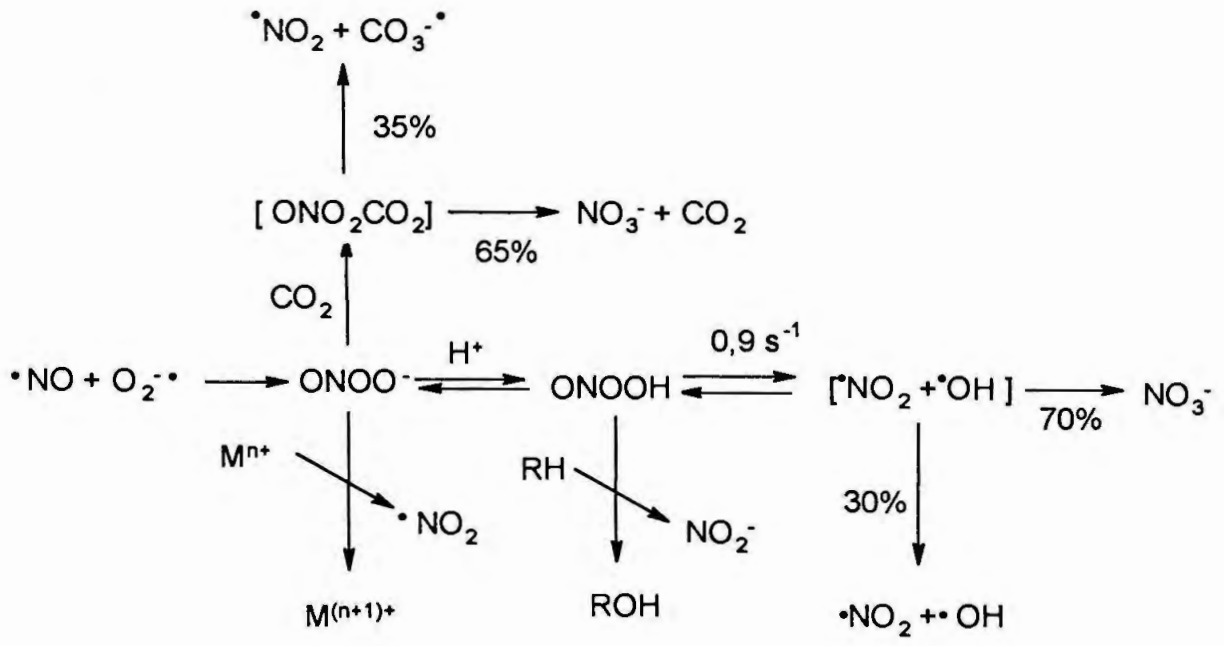

Figura 2: Principais vias de reação do $ONOO^-$(RADI *et al.*, 2001).

1.3 Formação *in vitro* e *in vivo* de lipídios nitrados

O •NO e demais ERNs podem inibir ou estimular a LPO, dependendo da sua concentração, da presença de EROs e de antioxidantes no local da reação. O principal mecanismo antioxidante do •NO se dá através de sua reação, ou de espécies dele derivadas, com radicais lipídicos, terminando assim a reação em cadeia da LPO (O'DONNELL *et al.*, 1997; HOGG & KALYANARAMAN, 1999). A atividade antioxidante do •NO na LPO *in vivo* pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo sua taxa de síntese e os níveis endógenos de antioxidantes lipossolúveis (RUBBO *et al.*, 1996).

A síntese de •NO é principalmente controlada por processos determinados geneticamente pelas NOS e pela ação de agonistas e antagonistas endógenos (MONCADA, RADOMSKI & PALMER, 1998). Em contrapartida, os níveis teciduais de α-tocoferol, por exemplo, são determinados quase que exclusivamente pela sua ingestão (RUBBO & FREEMAN, 1996). Também, um aumento na produção de ânion superóxido reduz a ação antioxidante do •NO, pela geração de $ONOO^-$, um potente oxidante, e pela diminuição da quantidade de •NO capaz de reagir com os radicais lipídicos (RUBBO & FREEMAN, 1996).

A reação do •NO com os radicais LO• e LOO• é muito rápida, ocorrendo numa constante de velocidade igual a 1,3 $x10^9$ M^{-1} s^{-1} (RUBBO *et al.*, 1996), corroborando a hipótese de que o •NO possa ser um potente inibidor dos processos causados pelo estresse oxidativo. Esta reação é muito mais rápida, por exemplo, do que a reação do LOO• com o α-tocoferol, a qual ocorre com uma constate de velocidade pelo menos 1000 vezes menor (k= 2,5 x 10^6 M^{-1} s^{-1}) (RUBBO *et al.*, 1996). Isto sugere que o •NO possa atuar muito mais eficazmente, como antioxidante lipossolúvel, do que o α-tocoferol, β-caroteno e licopeno, por exemplo. O •NO atravessa livremente as membranas celulares e pode concentrar-se nos compartimentos lipofílicos em virtude de seu baixo peso molecular, volatilidade e alto coeficiente de partição lipídico (TROSTCHANSKY *et al.*, 2001, DENICOLA *et al.*, 2002).

A geração de espécies lipídicas nitradas ou nitrosiladas por meio da reação com peroxinitrito pode ocorrer por mecanismos dependentes de radical dióxido de nitrogênio ($•NO_2$) e nitrônio (NO_2^+). A nitração de metil linoleato e linoleato

por $^{\bullet}NO_2$ ocorre através da abstração inicial de um hidrogênio de uma dupla ligação, por um oxidante, formando um radical alquil, que em seguida numa baixa tensão de oxigênio, combina-se com o $^{\bullet}NO_2$, formando um nitroalquil ou nitrolipídio (MARIEQ & SZENTE, 1996; **Figura 3**). Contudo, um alquilnitrito (RONO) também pode ser gerado pela reação do $^{\bullet}NO$ com $LO^{\bullet}$ (EISERICH *et al.*, 1998).

O principal subproduto formado a partir do $^{\bullet}NO$ no organismo é o nitrito (NO_2); enquanto esta espécie é estável em pH fisiológico, a acidificação gera ácido nitroso (HONO), que pode levar à geração de diversas espécies nitrantes e nitrosilantes (N_2O_3, $^{\bullet}NO$, $^{\bullet}NO_2$, **Reações 4, 5, 6**). Reações destas espécies com hidroperóxidos do 18:2, resultam na formação de espécies com íons de relação massa/carga (*m/z*) igual a 340, sugerindo diversas estruturas possíveis como LOONO, $LONO_2$,$L(O)NO_2$ (O'DONNELL *et al.*, 1999b) ou um produto nitrohidroxilado LNO_2OH (NAPOLITANO *et al.*, 2002).

$$NO_2^- + H^+ \rightleftharpoons HONO \qquad \text{Reação 4}$$

$$2\ HONO \rightleftharpoons N_2O_3 + H_2O \qquad \text{Reação 5}$$

$$N_2O_3 \rightleftharpoons {}^{\bullet}NO_2 + {}^{\bullet}NO \qquad \text{Reação 6}$$

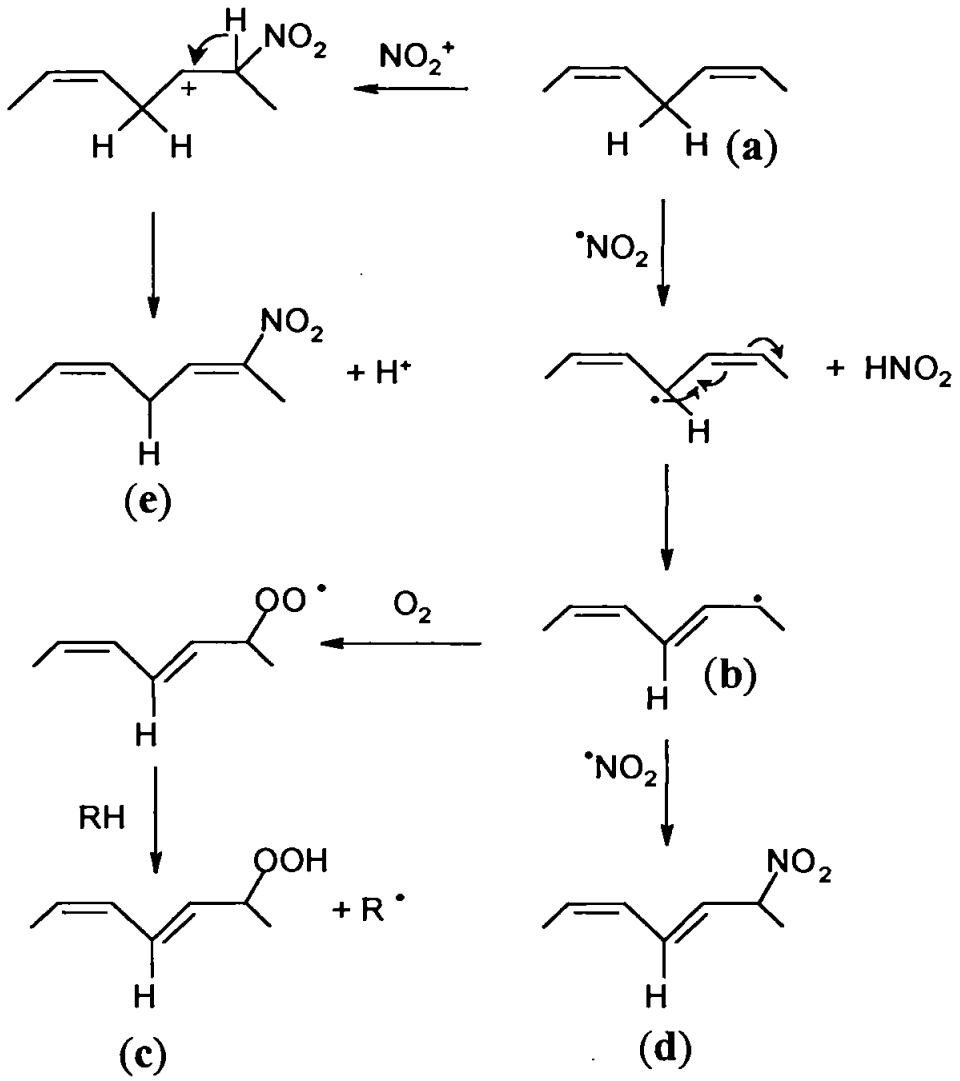

Figura 3: Mecanismos de reações propostos para a formação de lipídios nitrados. Um ácido graxo polinsaturado (**a**) pode sofrer um ataque de um radical livre, como, por exemplo, o $^{\bullet}NO_2$, gerando um radical alquil estabilizado por ressonância (**b**) e liberando HNO_2. Este radical pode reagir com o oxigênio formando um hidroperóxido (**c**) ou reagir com outra molécula de $^{\bullet}NO_2$ formando um lipídio nitrado conjugado(**d**). Por outro lado a nitração pode ocorrer diretamente através de uma reação de adição do íon de nitrônio, formando um lipídio nitrado não conjugado(**e**).

1.3 Atividades biológicas dos lipídios nitrados e nitrosilados.

Muito pouco se conhece sobre o metabolismo ou possíveis papeis fisiológicos destes lipídios nitrados *in vivo*. Por exemplo, em meio aquoso, os derivados LOONO formados podem se hidrolisar, gerando um hidroperóxido e NO_2^- (O'DONNELL *et al.*, 1999b). Os LOONOs gerados pela reação de radicais peroxila com óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) podem se decompor, gerando um hidroperóxido e nitrito (NO_2^-). Por uma outra via, pode ocorrer a sua dissociação, gerando os $LO^{\bullet}$ e $^{\bullet}NO_2$. Estes radicais gerados podem: (i) recombinar-se, regenerando o LOONO; (ii) formar um epóxido, via rearranjo e reação com O_2; ou (iii) formar um LONO por reação do radical alcoxila com outra molécula de $^{\bullet}NO$ (EISERICH *et al.*, 1998).

Um trabalho recente demonstrou a presença de um derivado nitro-hidroxilado do ácido araquidônico, em tecido cardíaco bovino, detectando-se pela primeira vez uma substância deste tipo *in vivo* (BALAZY *et al.*, 1999). Napolitano *et al.*, (2000), também estudaram as características químicas e biológicas deste tipo de composto, testando a atividade citotóxica de derivados nitrados do 18:2 numa linhagem celular. Estes autores verificaram que esses lipídios nitrados não apresentaram nenhum efeito tóxico nas condições experimentais utilizadas, demonstrando assim mais uma evidência que sustenta a hipótese da existência destes compostos no organismo. Em outro trabalho recente também foi demonstrado que um produto da reação do ácido araquidônico com o peroxinitrito libera $^{\bullet}NO$ e causa relaxamento em anéis aórticos de ratos, sugerindo pela primeira vez que estes produtos possam servir como uma forma tecidual ou circulante de armazenamento de $^{\bullet}NO$ (BALAZY *et al.*, 1999).

Alguns estudos também têm demonstrado que lipídios nitrados possuem ação vasodilatadora dependente da guanilato ciclase solúvel (BALAZY *et al.* 2001; COLES *et al.*, 2002a; LIM *et al.*, 2003), reforçando a hipótese que estes compostos poderiam ser uma forma orgânica de armazenamento tecidual de •NO. Neste mesmo contexto, também foi demonstrada a propriedade do nitrolinoleato de inibir as atividades plaquetária e inflamatória (COLES *et al.,* 2002b), a geração de ânion superóxido, a desgranulação de macrófago e a expressão de integrinas (LIM *et al.*, 2003), sugerindo que este composto possa exercer efeitos benéficos ao sistema cardiovascular.

Em função dos dados previamente descritos na literatura nos experimentos com animais e testes *in vitro*, inferimos que vários fatores poderiam estar contribuindo para a formação de produtos nitrados ou nitrosilados derivados de radicais lipídicos *in vivo*: (i) estas espécies oxidantes concentram-se significativamente nos compartimentos lipofílicos da célula, onde os antioxidantes hidrossolúveis não agem; (ii) a reação do •NO com LO• e LOO• é limitada apenas pela difusão, sugerindo que o processo de LPO e a ação de antioxidantes lipofílicos possam ser influenciados pela concentração de •NO no local da reação (RUBBO & FREEMAN, 1996); (iii) ocorre aumento da peroxidação lipídica em pacientes hipercolesterolêmicos (CHIRICO *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 1995; MORIEL & ABDALLA, 1997); (iv) existe correlação entre a maior produção de •NO e a menor suscetibilidade da LDL à oxidação (CALO *et al.*, 1998, PATEL *et al.*, 2000), sugerindo que o •NO tenha um importante papel em minimizar a oxidação da LDL, fator este reconhecidamente aterogênico. Assim, as evidências de que o •NO tenha

um papel central nas doenças cardiovasculares vêm aumentando progressivamente e o entendimento dos mecanismos antioxidantes do $^{\bullet}NO$ podem trazer uma contribuição importante para futuras estratégias terapêuticas e farmacológicas e, conseqüentemente, melhoria na expectativa e qualidade de vida de pacientes portadores destas doenças.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Com a finalidade compreender melhor o papel das espécies reativas de nitrogênio (ERNs), especialmente do •NO no metabolismo lipídico, objetivamos detectar e caracterizar produtos nitrados derivados do ácido linoleico e do linoleato de colesterol no plasma e nas lipoproteínas e a propriedade destes compostos liberarem •NO. Para isso foi necessário:

I. Sintetizar os padrões nitrados derivados do ácido linoleico e do linoleato de colesterol.

II Padronizar sistemas para detecção e caracterização química dos produtos nitrados sintetizados.

III Padronizar sistemas para extração e detecção dos produtos nitrados no plasma e nas lipoproteínas isoladas de indivíduos hiperlipidêmicos e de indivíduos normais.

III Comparar os níveis destas substâncias entre os indivíduos hiperlipidêmicos e normolipidêmicos.

IV. Verificar e estudar os mecanismos da liberação de •NO pelos compostos sintetizados utilizando: (i) a análise direta do •NO liberado por quimiluminescência; (ii) a formação dos complexos Fe(II)-•NO-MGD_2, Carboxi-PTIO-•NO e DBNBS-•CHO por ressonância paramagnética eletrônica; ou, (iii) pelo efeito de relaxamento em anéis aórticos de ratos.

Material e métodos

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Para realização dos experimentos foram utilizados os reagentes de mais altos graus de pureza comercialmente disponíveis. Os padrões de 18:2, linoleato de colesterol (Ch18:2), microperoxidase e isoluminol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Nitrito de sódio marcado com [^{15}N] e tetrafluoroborato de nitrônio e nitrosônio foram obtidos da Aldrich (Milwaukee, WI). O 2,2´-azobis-2,4-dimethilvalenonitrila (AMVN) foi obtido da Wako Chemical (Tokyo, JP). O Ch18:2 marcado com [^{3}H] foi obtido da Amersham Int. (Buckinghamshire, UK). Todos os demais reagentes e solventes foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany). A água deionizada utilizada nos experimentos foi tratada previamente por um sistema Mill-Q, Millipore® (Belfford, TA).

3.2 Equipamentos

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, CA). O plasma e os sistemas de extrações foram centrifugados em uma centrífuga de mesa Beckman Allegra 21R (Fullerton, CA). As lipoproteínas foram isoladas em ultracentrífuga Hitachi 70P-72 (Hitachi Koki Co. Ltda, Taked Hitachinaka, Japan). As análises dos hidroperóxidos lipídicos foram realizadas por HPLC-CL Perkin-Elmer (Norwalk, U.S.A.). Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro triplo quadrupolo Quatro II (Micromass, Manchester, U.K.). Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando o espectrômetro Bomen MB 100 (Quebec, CA). Os espectros de ^{15}N-RMN foram adquiridos no espectrômetro DRX-500 MHz (Bruker, MA). A detecção e

quantificação do •NO foram realizados no Analisador de •NO (NOA™, Sievers Instruments, Boulder, CO). O experimento do relaxamento em anéis aórticos de ratos foi realizado utilizando um transdutor de tensão BIOPAC System® TSD105A (Goleta, CA) Os espectros de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) foram obtidos no espectrômetro Bruker ER 200 D-SRC (Bruker, MA).

3.3 Obtenção das amostras

Foi coletado sangue periférico (10 mL) de voluntários normolipidêmicos (colesterol plasmático < 200 mg/dL), e pacientes hiperlipidêmicos (colesterol plasmático entre 200 - 400 mg/dL) atendidos no Instituto de Cardiologia "Dante Pazzanese. O sangue foi colhido com os indivíduos em jejum de 12 horas, por punção da veia cubital, utilizando-se tubos Vacutainer® contendo EDTA (1 mg/mL). Em seguida, o sangue foi centrifugado (2500 rpm por 10 min) para separação do plasma. Ao plasma, foram acrescentados os inibidores de proteases, aprotinina (2μg/ml), benzamidina (2mM) e PMSF (1mM), além do antioxidante BHT (20mM). Após isso, as lipoproteínas foram imediatamente isoladas por ultracentrifugação seqüencial (55.000 rpm, a 4°C) (SILVA *et al.*, 1995). As lipoproteínas isoladas foram dessalinizadas através de diálise de 12 h com uma solução Tris pH 7,4 (150 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 3mM NaN_3 e 10mM Tris). As amostras de plasma e lipoproteínas foram armazenadas a –20°C ou -70°C até as análises. Todas as análises comparativas dos produtos nitrados no plasma entre os grupos foram realizadas no mesmo dia da coleta. O protocolo para realização dos experimentos foi aprovado pelos Comitês de Ética do Instituto de Cardiologia "Dante Pazzanese e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.4 Síntese dos padrões de lipídios nitrados e nitrosilados

3.4.1 Síntese, purificação e quantificação do padrão de 18:2-OOH

O hidroperóxido do 18:2 (18:2-OOH) foi sintetizado de acordo com o método proposto por Yamamoto *et al* (1994), com algumas modificações. Sucintamente, 20 mg de 18:2, foram dissolvidos em 1 mL de tolueno, adicionando-se a seguir 2 mM de 2,2´-azobis (2,4-dimethilvalenonitrile) (AMVN) e incubando-se durante 2 horas, sob agitação, a 37°C, a fim de promover oxidação. Em seguida, evaporou-se o solvente sob nitrogênio, ressuspendendo-se o resíduo em 1 mL de clorofórmio/metanol 2:1(v/v). Para purificação do hidroperóxido formado (18:2-OOH) alíquotas destas amostras (50 μL) foram filtradas em filtro de 0,22μ e injetadas, através de injeção automática, num cromatógrafo Shimadzu, acoplado a uma bomba LC10AD, ao detector UV SPD-M10A, ao módulo de comunicação CBM-10A e a um sistema de aquisição de dados. Usou-se fase móvel constituída de 100% de metanol, com fluxo de 1 mL por minuto, e coluna e pré-coluna C-8 Inertisil (GL Sciences, Inc.). Os hidroperóxidos foram detectados por monitoramento da absorção no UV a 234 nm, coletando-se manualmente o pico principal; 15 mL do material coletado foram evaporados sob fluxo de N_2 e ressuspenso em 1 mL de clorofórmio/metanol 2:1(v/v).

O 18:2-OOH isolado foi então identificado e quantificado no sistema de cromatografia líquida de alta resolução, com detector de quimiluminescência (HPLC-CL). O equipamento utilizado para separação e quantificação do hidroperóxido consistiu de: sistema de injeção manual, bomba quaternária Perkin-Elmer série 200, sistema de derivatização pós-coluna, bomba de injeção da solução de derivatização Radpump Series III, detector de fluorescência LC-240 da Perkin-Elmer, software

Turbochrom Navigator, acoplados a um processador Pentium. Como solução de derivatização, utilizou-se uma mistura 1:1 de metanol e tampão borax pH 10,0, contendo 1,5 mg de microperoxidase e 177,2 mg de isoluminol, a um fluxo de 1 mL/min. A quantificação do padrão de hidroperóxido foi realizada através de curva de calibração a partir de um padrão primário de hidroperóxido do 18:2 (13-[S]HPODE, Sigma Chemical CO , St. Louis, MO).

3.4.2 Reação do 18:2-OOH com nitrito de sódio

O 18:2-OOH (500 μM), obtido conforme descrito no item 3.4.1, foi adicionado a nitrito de sódio (com [^{14}N] ou [^{15}N]) (1mM) em 200 μL de clorofórmio/metanol 2:1(v/v). Em seguida, acidificou-se o meio para pH 3,0 com HCl 1N e incubou-se a 25° C por 15 minutos, adicionando-se 1 mL de tampão PBS pH 7,4 e 4 mL de éter ditetílico, agitando-se em vortex por 2 minutos. A fase orgânica foi extraída, evaporada sob fluxo de nitrogênio e o resíduo ressuspenso em isopropanol/metanol (1:1v/v) até as análises de caracterização química.

3.4.3 Reação do 18:2 ou 18:2-OOH com NO_2BF_4

A nitração do 18:2 ou 18:2-OOH foi realizada segundo método descrito por Napolitano *et al.* (2000), com algumas modificações. Tetrafluoroborato de nitrônio (0,12 mmol) foi adicionado ao 18:2 (0,16 mmol) ou 18:2-OOH (500μM), em 2 mL de clorofórmio, deixando-se em agitação durante 1 hora, a 25°C, em tubos vedados sob atmosfera de nitrogênio. A reação foi subseqüentemente bloqueada pela adição de 2 mL de tampão TBS, pH 7,4 e em seguida extraída com 5 mL de éter dietílico, onde a fase orgânica foi separada e evaporada sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi

ressuspenso em 500 μL de isopropanol/metanol (1:1v/v) para realização das análises de detecção e caracterização química.

3.4.4 Reação do Ch18:2 com nitrito de sódio ou NO_2BF_4

A reação do Ch18:2 com o NO_2BF_4 ou nitrito de sódio foram realizadas nas mesmas condições daquelas padronizadas para o 18:2. Tetrafluoroborato de nitrônio (0,12 mmol) foi adicionado ao Ch18:2 (0,16 mmol) em 2 mL de clorofórmio, deixando-se em agitação durante 1 hora, a 25°C, em tubos vedados sob atmosfera de nitrogênio. A reação foi subseqüentemente bloqueada pela adição de 2 mL de tampão PBS, pH 7,4 e em seguida extraída com 5 mL de hexano:éter dietílico 80:20 (v/v), onde a fase orgânica foi separada e evaporada sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi ressuspenso em 500 μL de isopropanol/metanol (1:1v/v) até as realização das análises de detecção e caracterização química. Para as análises de espectrometria de massa, o Ch18:2 foi reagido com nitrito de sódio marcado isotopicamente com [^{15}N]. Neste caso, 0,10 mmol do nitrito foi adicionado a 0,16 mmol do Ch18:2 dissolvido em 2 mL de metanol:clorofórmio 2:1, acidificado a pH 3,0 e deixado em agitação, em tubo fechado por 30 min. Em seguida a reação foi bloqueada pela adição de 2 mL de tampão PBS, pH 7,4 e extraída com 5 mL de hexano:éter dietílico 80:20 (v/v), onde a fase orgânica foi separada, evaporada sob fluxo de nitrogênio, e ressuspensa em 500 μL de isopropanol/metanol (1:1v/v) até a realização das análises.

3.4.5 Isolamento e purificação dos padrões de lipídios nitrados

O isolamento e purificação dos padrões de lipídios nitrados foram realizados por cromatografia em coluna ou por cromatografia em camada delgada. Os produtos

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

da síntese da reação do 18:2 com NO_2BF_4 foram isolados por TLC utilizando uma placa de sílica gel 60H (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). O resíduo lipídico foi aplicado na placa e em seguida separado utilizando hexano: éter dietílico: ácido fórmico (50:50:2) como fase móvel. Após a separação as bandas foram raspadas e extraídas com 4 mL de éter dietílico e levadas a resíduo até as análises. Para isolar os produtos nitrados derivados do Ch18:2, o extrato lipídico foi passado através de uma coluna de sílica gel (200-400 mesh, 2.5 cm x 5.5 cm) equilibrada com hexano. Os produtos nitrados foram separados do Ch18:2 utilizando um gradiente de hexano: éter dietílico (aumentando 5% de 0 a 20% de éter dietílico), com os produtos nitrados eluindo principalmente nas proporções 80:15 e 80:20 v/v. Estas frações foram separadas, o solvente evaporado e o resíduo aplicado numa placa de TLC de fase reversa (RP-18 F_{254s}, 5 x 10 cm) e eluídas com metanol:clorofórmio (1:1 v/v). Após a separação as bandas foram raspadas e extraídas com 4 mL de hexano: éter dietílico 80:20 (v/v) e levadas a resíduo até a realização das análises.

3.5 Caracterização química dos lipídios nitrados

3.5.1 Análises por cromatografia líquida acoplada á espectrometria de massa

A detecção dos *produtos* nitrados foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massa seqüencial ou em *tandem* com sistema de ionização da amostra por electrospray (**LC-ESI/MS/MS**). Os experimentos foram realizados em um espectrômetro triplo quadrupolo Quattro II (Micromass, Manchester, UK) acoplado a um HPLC Shimadzu LC-10AD Class VP no Laboratório de Lesões em Biomoléculas do Instituto de Química, em colaboração com o Prof. Dr. Paolo Di Mascio.

3.5.1.1 Produtos derivados do 18:2

Os produtos derivados do 18:2 foram separados por HPLC em fase reversa numa coluna 20 x 4 mm, MercuryMS (Phenomenex, Torrance,CA), com fluxo de 0,2 ml/min, usando como fase móvel um gradiente de 0-50% de isopropanol em um intervalo de 15 minutos sob uma solução de metanol/H_2O 75:25 (v/v). O eluente da coluna foi totalmente para o espectrômetro, produzindo um ionspray entre as fases, onde os íons negativos foram separados e detectados. O 18:2 e seus derivados oxidados e nitrados foram analisados no modo negativo (detecção dos íons negativos) com potenciais de 3,5 kV no capilar de ESI e uma voltagem no cone de 20V, observados como ânion molecular $[M-H]^-$. Nesta análise foram utilizados os seguintes modos: varredura total do scan (*full scan*) de *m/z* 40 a 350, SIR para íons de *m/z* 340, 324 e 269, *daughter íons* para *m/z* 340 e 324 e *multiple reaction monitoring* (MRM) selecionando os íons de *m/z* 340 e 46 no primeiro(Q_1) e terceiro(Q_3) quadrupolos, respectivamente, para o produto nitrohidroxilado e os íons de *m/z* 324 e 46 no Q_1 e Q_3, respectivamente, para o produto nitrado. No sistema ESI/MS/MS utilizou-se uma pressão de argônio no segundo quadrupolo (Q_2) igual a 5,4 x10^{-4} *mbar* e uma energia de colisão de 20 eV.

3.5.1.2 Produtos derivados do Ch18:2

Os produtos derivados do Ch18:2 foram separados por HPLC em fase reversa numa coluna 20 x 4 mm, MercuryMS (Phenomenex, Torrance,CA), com fluxo de 0,4 ml/min, usando metanol/tert-butanol 75:25 (v/v), contendo 10mM de acetado de amônio como fase móvel no intervalo de 20 minutos. O eluente da coluna foi totalmente para o espectrômetro, produzindo um ionspray entre as fases

onde os íons positivos foram separados e detectados, principalmente como adutos de amônio $[M+NH_4]^+$. O Ch18:2 e seus derivados oxidados e nitrados foram analisados com potenciais de 3,5 kV para o capilar de ESI e uma voltagem de 20V no cone. As análises foram realizadas utilizando os seguintes modos: varredura total do scan (*full scan*) de *m/z* 300 a 800; SIR de *m/z* 666, 668 e 711, para o Ch18:2, ^{3}H-Ch18:2 e o produto nitrado, respectivamente e *daughter íons* para *m/z* 666, 668 e 711 para obtenção dos espectros de fragmentação. A detecção dos padrões sintetizados e das amostras biológicas foram realizadas no modo *multiple reaction monitoring* (MRM) selecionando os íons de *m/z* 666 ou 711 no Q_1 e m/z 369 no Q_3, para o Ch18:2 e o produto nitrado, respectivamente ou íons de *m/z* 668 e 371 no Q_1 e Q_3, respectivamente, na análise do Ch18:2 marcado com [^{3}H]. No sistema ESI/MS/MS utilizou-se uma pressão de argônio no segundo quadrupolo (Q_2) igual a 5,4 x10^{-4} *mbar* e uma energia de colisão de 35 eV.

3.5.2 Análises por absorção no infravermelho

Foram obtidos espectros dos padrões sintetizados a partir do 18:2-OOH com o nitrito de sódio e do 18:2 ou Ch18:2 com NO_2BF_4, a fim de se obter informações sobre suas conformações estruturais e especificamente fazer distinção entre os grupos -ONO e -NO_2 ligados ao carbono. O experimento foi realizado no equipamento Bomen MB 100 do Laboratório de Infravermelho da Central Analítica do Instituto de Química da USP. Os espectros foram obtidos através da soma de 128 *scan* na região do infravermelho (700-4000nm), após confecção de uma película do resíduo lipídico entre duas placas seleneto de zinco, comparando o espectro dos produtos formados com o espectro do 18:2-OOH, 18:2 ou Ch18:2, utilizados nas reações de síntese.

3.5.3 Análises por ressonância magnética nuclear

Após completamente seco, o resíduo lipídico obtido, foi dissolvido em aproximadamente 800 μL de Cd Cl_3. O espectro ^{15}N-RMN foi adquirido a 300 K para a confirmação da presença do grupamento C-NO_2 no produto da reação do 18:OOH com [^{15}N]-Nitrito. Utilizou-se o deslocamento químico do nitrometano (CH_3-NO_2) como referência. Os espectros foram obtidos no expectrômetro DRX-500 MHz da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.5.4 Testes de estabilidade química

Testes para verificar a estabilidade química dos produtos nitrados foram realizados no plasma e padrões sintetizados derivados do 18:2 estocados em diferentes condições de temperatura. Alíquotas do plasma foram alíquotadas, congeladas a –20 °C e analisadas por LC-ESI/MS/MS em intervalos de 24 horas durante 7 dias. Os padrões de *m/z* 340 e 324 sintetizados, mantidos em isopropanol ou adicionados ao plasma, foram também aliquotados e estocados a 4 e -70°C durante 7 dias, período em que foram analisados por LC-ESI/MS/MS em intervalos de 24 horas.

3.6 Detecção e caracterização dos lipídios nitrados no plasma e nas lipoproteínas

3.6.1 Extração dos lipídios nitrados

O sistema de extração dos produtos nitrados derivados do 18:2 foi realizado segundo O'Donnell *et al* (1999b) com algumas modificações. Em tubos de vidro âmbar, foram adicionados 500 μL de plasma, 500 μL de metanol acidificado com HCl

(pH 3,0) e 100 pmol de ácido heptadecanóico (padrão interno); homogeneizou-se rapidamente em vortex por 30 segundos e, em seguida, adicionou-se 4 mL de éter dietílico. Os tubos foram deixados em um agitador a 8 rpm durante 20 min. Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente em vortex por 2 minutos e centrifugados a 2500 rpm por 5 min, a 4° C. Após a centrifugação, a fase superior foi coletada, filtrada em membrana millipore® 0,22μ e evaporada a baixa pressão em Speed Vac® SC110 (Sanvant Instruments). O resíduo foi dissolvido em 100 μL de isopropanol/metanol 1:1 (v/v), injetando-se 20 μL no sistema de LC-ESI/MS/MS.

Para certifica-se de que os produtos nitrados e nitrosilados detectados no plasma não estavam sendo gerados devido ao baixo pH utilizado durante o processo de extração, o mesmo procedimento foi conduzido sob condições de pH neutro (pH 7,0) pela adição de tampão PBS (pH 7,4) e sem a presença de HCl no sistema de extração. Além disso, outros sistemas de extração foram testados a fim de se obter a maior recuperação dos produtos. Inicialmente testou-se o sistema tradicional para extração de ácidos graxos livres (Método de Doles), no qual trata-se a amostra com uma solução de heptano-isopropanol acidificado com ácido fosfórico ou sulfúrico, seguindo-se uma extração orgânica (MEHTA *et al.*, 1998).

Para análise dos produtos nitrados do Ch18:2 no plasma e nas lipoproteínas foram coletados 20 mL de sangue por punção da veia cubital em indivíduos normolipidêmicos (colesterol plasmático < 200 mg/dL) em jejum de 12 h. O plasma então foi separado por centrifugação (2500 rpm, 15 min) e imediatamente inibidores de protease e antioxidantes foram adicionados para evitar degradação das lipoproteínas plasmáticas. As lipoproteínas foram isoladas por ultracentrifugação seqüencial e dializadas por 12 h contra tampão Tris pH 7,4, contendo 3mM de azida

de sódio. A extração lipídica das frações de LDL, VLDL, HDL (1mg/mL de proteína) foram realizadas por adiçao de 500 uL de metanol a1 mL da fração lipoprotéica, agitação por 30 segundo em votex e adição de 5 mL de hexano: éter dietílico 80:20 (v/v) contendo 0,02% de BHT. O tubo em seguida foi agitado por 2 minutos em votex, a fase superior foi coletada e seca até resíduo sob vapor de nitrogênio. O resíduo foi redissolvido em 100 µl de *tert*-butanol/metanol 1:1 (v/v) e 20 µl imediatamente injetados no sistema de LC-ESI/MS/MS nos mesmos parâmetros utilizados para os produtos sintetizados. O mesmo sistema de extração foi usado para as amostras de plasma (1mL). Também, para verificar uma possível nitração artefactual do Ch18:2 durante o procedimento de extração, uma amostra de plasma foi extraída adicionando-se Ch18:2 marcado com ^{3}H, o qual pode ser identificado separadamente do ^{1}H-Ch18:2 , presente no plasma, por LC-ESI/MS/MS pelo aumento de duas unidades de massa.

3.6.2 Análise dos lipídios nitrados derivados do 18:2 no plasma

O sistema de LC-ESI/MS/MS utilizado para a detecção e caracterização dos produtos nitrados e nitrosilados no plasma, foi o mesmo utilizado para a análise dos padrões sintetizados (ver item 3.5.1.1). As detecções no plasma foram feitas nos modos *scan* (*m/z* 40 a 350), *daughter íons* (selecionando filhos do íon de *m/z* 340 para o LNO_2OH e filhos do íon de *m/z* 324 para os $LONO/LNO_2$), SIR [para os íons de *m/z* 340, 324, 269 (padrão interno)] e MRM (340→46, para LNO_2OH e 324→46 para $LONO/LNO_2$). A detecção no modo MRM é mais específica em relação aos demais modos anteriormente citados, uma vez que são detectados apenas os íons que apresentam o padrão específico de fragmentação selecionado. Por este motivo,

este modo foi escolhido para detecção dos produtos nitrados no plasma. As condições de fragmentação para detecção em plasma foram as mesmas utilizadas para os padrões sintetizados, conforme descrito no item 3.5.1.1.

3.6.3 Análise dos lipídios nitrados derivados do 18:2 no plasma e nas lipoproteínas

Para análise dos produtos nitrados da LDL, após extração estes foram separados por HPLC em fase reversa numa coluna 20 x 4 mm, MercuryMS (Phenomenex, Torrance,CA), com fluxo de 0,4 ml/min, usando metanol/tert-butanol 75:25 (v/v), contendo 10mM de acetado de amônio, como fase móvel, num intervalo de 20 minutos. O eluente da coluna totalmente direcionado ao espectrômetro produzindo um ionspray entre as fases, onde os íons positivos foram detectados. Os produtos nitrados foram detectados como adutos de amônio $[M + NH4]^+$ e analisados no modo positivo, com potenciais de 3,5 kV no capilar de ESI e uma voltagem de 20V no cone, exatamente conforme realizado para o padrão de $ChLNO_2$ sintetizado (ver item 3.5.1.2).

3.7 Caracterização da liberação de •NO pelos lipídios nitrados

3.7. Detecção direta por quimiluminescência

A liberação direta de •NO foi determinada através do analisador de •NO (NOA™, Sievers Instruments, Boulder, CO) que utiliza detecção por quimiluminescência, através do decaimento do radical dióxido de nitrogênio triplete ($NO_2^{\bullet}$) formado pela reação do O_3 com o •NO presente. A liberação de •NO foi

estudada na presença de ascorbato, que agiria como redutor induzindo a liberação de •NO, de carboxy-PTIO e hemoglobina, ambos *scanvenger* de •NO. Sucintamente, 100 nmol dos produtos nitrados foram introduzidos em um sistema de vidro vedado contendo 2 mL de tampão PBS (pH 7.4) e 0.5% de SDS. Após 15 minutos todo •NO produzido foi direcionado para o detector (**Figura 4**). Para avaliar a ação dos inibidores ou redutores da liberação de •NO pelos produtos nitrados, 100 nmol foram adicionados a tubos de vidros vedados contendo 2 mL de tampão PBS (pH 7.4) contendo 0.5% de SDS contendo carboxy-PTIO (1mM), ascorbato (10m*M*) ou hemoglobina (0,1%), mantidos a 25°C, em atmosfera de nitrogênio). Após 15 min, uma alíquota (0.5 mL) do •NO acumulado no espaço gasoso foi recolhido e injetado no analisador de •NO por meio de um Seringa Hamilton Gastight®. Também foi plotada uma curva da liberação de •NO pelo produto da nitraçao do 18:2 na presença de quantidades crescentes de ascorbato (0,01; 0,1; 1 e 2 μmol), a qual foi correlacionada com o decaimento do produto analisado por LC-ESI/MS/MS no modo MRM (324→46). A quantificação do •NO liberado, expresso em *pmoles*, foi determinada através de uma curva de calibração plotada a partir de $NaNO_2$, utilizando cloreto de vanádio como agente redutor.

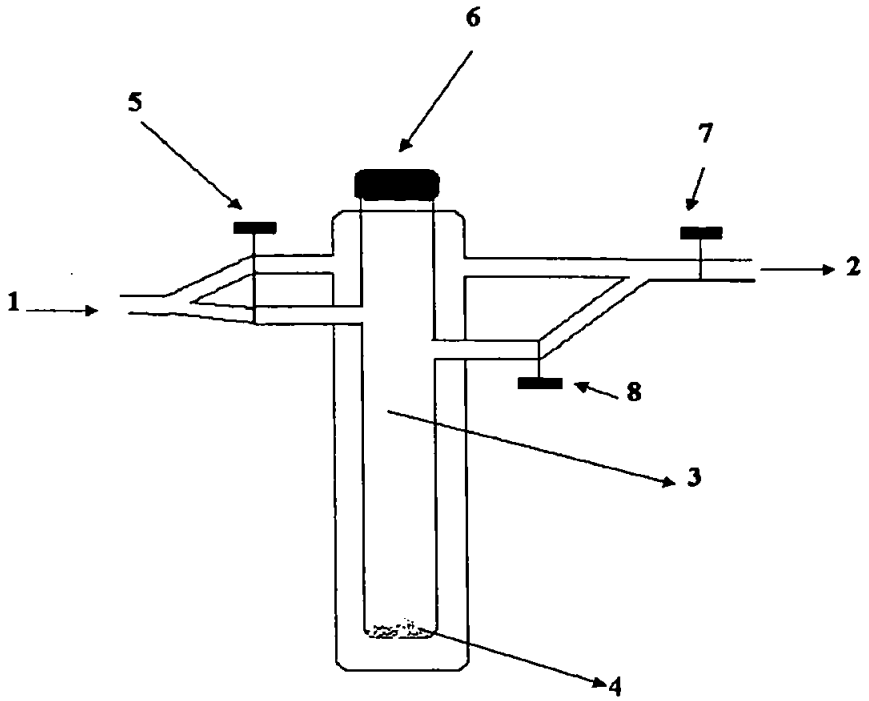

Figura 4: Sistema utilizado nos experimentos de liberação de •NO. (1) entrada de nitrogênio; (2) saída de N_2; (3) espaço onde o •NO liberado é armazenado; (4) amostra em análise; (5) torneira de duas vias; (6) êmbolo por onde é adicionado o inibidor ou indutor; (7 e 8) torneiras de uma via.

3.7.2 Análises de ressonância paramagnética eletrônica

A liberaçao de •NO pelos produtos sintetizados a partir do 18:2 seu hidroperóxido ou Ch18:2 foi analisada por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) utilizando a propriedade do •NO de reagir com complexos de Ferro-ditilcarbamato, ou carboxi-PTIO formando adutos de espectros característicos. Os espectros foram registrados a temperatura ambiente em um espectrômetro de EPR Bruker modelo EMX. O complexo de Fe(II) com N-metil-D-glucamina ditiocarbamato [Fe(II)MGD_2] foi preparado por adição de $FeSO_4$ (0,5 mM) a uma solução do ligante (1 mM) em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4). O produto lipídico obtido (0.25 μmol) foi dissolvido em etanol e adicionado a solução contendo o captador de spin na ausência de oxigênio em tubos vedados. Os espectros foram obtidos 15 minutos após a incubação. Para certificar-se que o •NO presente no complexo Fe-NO-MGD_2 não seria proveniente de uma potencial contaminaçao de nitrito, também foi analisado um produto nitrado sintetizado com [^{15}N], uma vez que este produziria um espectro diferente do complexo contendo •NO com [^{14}N]. Incubações do LNO_2 (10 mM) também foram realizadas com carboxi-PTIO (10mM) em tubos vedados e a formação do complexo carboxi-PTIO-•NO foi monitorada entre 2 minutos e 1 hora de incubação. Para estudar uma possível formação de radicais lipídicos durante o processo de decomposição dos nitrolipídios, 10mM de LNO_2 foi incubado com 10 mM de DBNBS (Sulfonato de 3,5-dibromo-4-nitrosobenzeno) em tampão PBS pH 7,4, em tubos abertos, à temperatura ambiente e a possível formação do complexo DBNBS-radical de carbono foi examinada após 2, 15 e 60 minutos de incubação. Os principais parametros do equipamento utilizados nas análises foram: Potência, 20

mW; Constante de tempo, 163 ms; Velocidade de varredura, 0.6 G/s; Amplitude de modulação, 1 G.

3.7.3 Efeito de relaxamento em anéis aórticos de ratos

Para mimetizar o efeito da liberação de •NO *in vivo* pelos produtos nitrados, foi avaliado o efeito do relaxamento em anéis aórticos de ratos. Após toracotomia e dissecção, a aorta torácica foi retirada, limpa e seccionada em fragmentos de 4-5 mm, dos quais foram ou não retirados o endotélio por fricção mecânica. Os anéis de aorta com ou sem endotélio foram colocados em cubas para órgão isolado com solução de Krebs-Henseleit (composição em mMol/L: $CaCl_2$ 1.6, $MgSO_4$ 1.17, EDTA 0.026, NaCl 130, $NaHCO_3$ 14.9, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, glicose 11) aquecidas a 37° C e aerados com carbogênio (O_2 95%, CO_2 5%). Estes segmentos permaneceram suspensos por um período de estabilização de 60 minutos com uma tensão de 1,5g por duas hastes de aço inoxidável que tracionam os anéis; a cada 20 minutos foi trocada a solução de Krebs-Henseleit e reajustada a tensão. A haste inferior fica fixa na própria cuba de órgão isolado e a superior fica conectada a um transdutor de tensão (BIOPAC System® TSD105A), onde após o período de estabilização, o vaso foi contraído pela adição de noradrenalina ($3x10^{-7}$ M). Após o período de estabilização (5 min) foi testada a resposta do vaso com ou sem endotélio a doses crescentes dos produtos nitrados ($1x10^{-8}$M, $3x10^{-8}$ M, $1x10^{-7}$ M, $3x10^{-7}$ M, $3x10^{-6}$ M). O efeito de vasorelaxamento do produto nitrado derivado do 18:2 também foi estudado adicionando-se ODQ (0,1mM), um inibidor da guanilato ciclase solúvel, diretamente na cuba contendo o vaso, 10 minutos antes da adição no lipídio nitrado. Controles com os resíduos lipídicos obtidos após extração sem adição da fonte de nitração foram também analisados.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção dos padrões de produtos nitrados e nitrosilados

4.1.1 Reação do 18:2-OOH com nitrito de sódio

Quando analisado por LC-ESI/MS/MS, nas condições cromatográficas e espectrométricas descritas no item 3.5.1.1, a reação do 18:2-OOH com nitrito de sódio em meio ácido levou à geração de um produto principal de *m/z* 340 $[M-H]^-$, com tempo de retenção igual a 6,5 minutos (**Figura 5A**). Na análise do espectro de fragmentação, foi detectado um íon principal de *m/z* 46, característico da presença do grupo nitro no íon pai (**Figura 5B**). Quando o 18:2-OOH reagiu com nitrito marcado isotopicamente ($Na^{[15]}NO_2$), nas mesmas condições do nitrito não marcado, houve a geração de um produto eluindo no mesmo tempo de retenção daquele sintetizado com nitrito não marcado, de *m/z* 341 $[M-H]^-$. Após fragmentação, este produto gerou como íon filho principal um fragmento de *m/z* 47 (**Figura 6**), confirmando a presença do grupo nitro no íon pai.

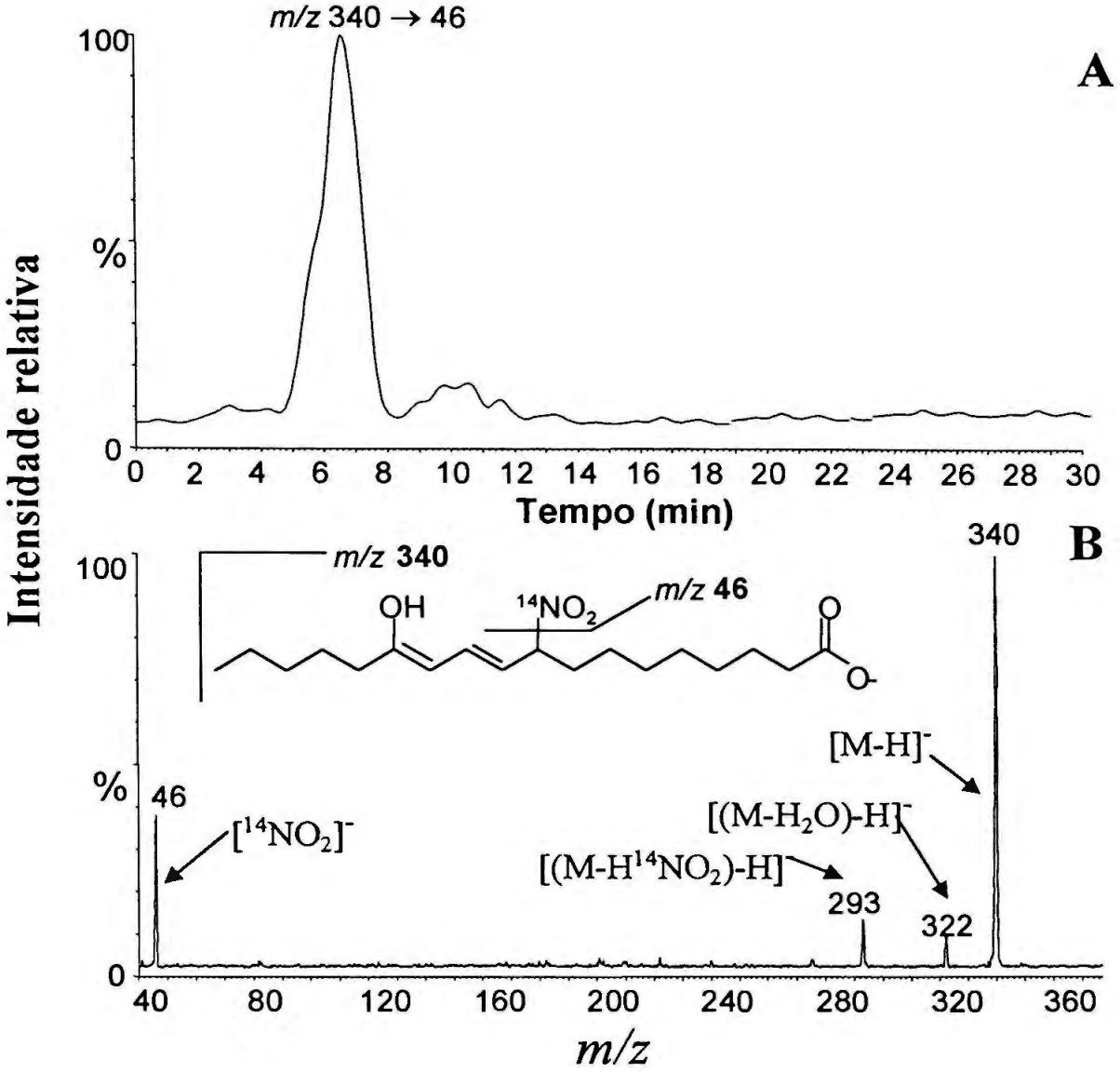

Figura 5: Análise por LC-ESI/MS/MS do principal produto da reaçao do 18:2-OOH com nitrito de sódio em meio ácido. (**A**) Cromatograma da detecção *por MRM* (340→46) $[M-H]^-$; (**B**) Espectro de fragmentaçao no modo íons-filhos do produto de *m/z* 324. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.1.1.

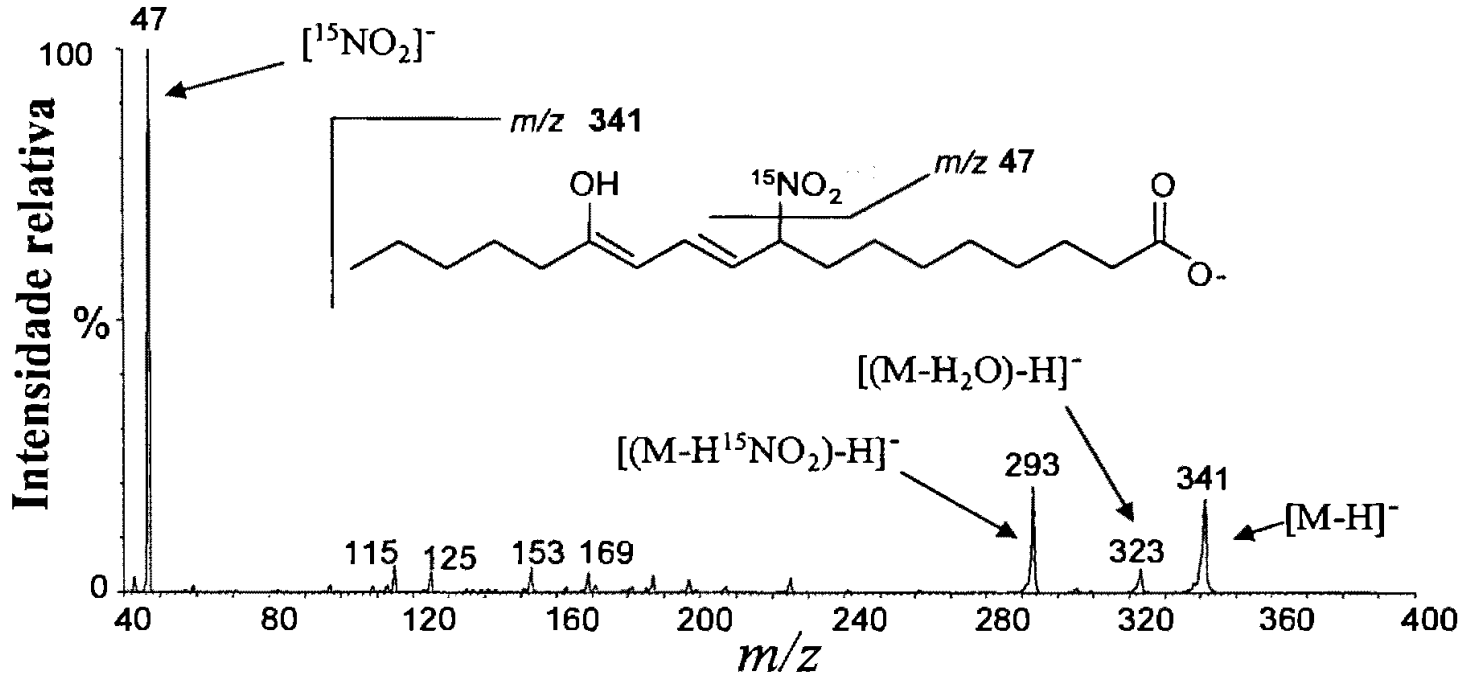

Figura 6: Análise por LC-ESI/MS/MS do principal produto da síntese do 18:2-OOH com nitrito marcado isotopicamente com $^{[15]}N$. Espectro MS/MS no modo íons-filhos do produto de *m/z* 341. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.1.1.

4.1.2 Reação do 18:2 ou 18:2-OOH com NO_2BF_4 ou $NOBF_4$

A reação do 18:2 com NO_2BF_4 resultou na geração de um produto principal com íon molecular de *m/z* 324, eluindo em aproximadamente 10 minutos, quando a análise foi realizada nas condições cromatográficas e espectrométricas descritas no item 3.5.1.1 (**Figura 7A**). Quando este produto foi fragmentado por MS/MS revelou a presença de um íon principal de *m/z* 46, característico do grupo nitro presente no íon pai (**Figura 7B**). Outros fragmentos característicos como *m/z* 306, referente a perda de uma moléula de água; *m/z* 277, característico da perda do grupo nitro (-HNO_2) também foram observados. Os melhores resultados na geração dos produtos de *m/z* 324 foram obtidos pela reação do 18:2 com NO_2BF_4, contudo este produto também foi obtido pela reação do 18:2-OOH com NO_2BF_4 ou tetrafluoroborato de nitrosônio ($NOBF_4$). Na reação do 18:2 com NO_2BF_4 nenhum produto de *m/z* 340 foi detectado, contudo quando este foi reagido com 18:2-OOH, o íon de *m/z* 340, com as mesmas características daquele produto sintetizado com nitrito de sódio pôde ser detectado. Também, quando 18:2-OOH foi tratado com $NOBF_4$ houve a geração de um produto de *m/z* 308 $[M-H]^-$, característico do nitrosolinoleato (LNO). Este produto (*m/z* 308) também foi obtido pela reação do 18:2 com NO_2BF_4, representando aproximadamente 10 % do produto principal (*m/z* 324) (**Figura 8**). A reação do 18:2 com nitrito marcado isotopicamente com ^{15}N, levou a geração de um produto de *m/z* 325 que se fragmentou em um íon principal de *m/z* 47, característico do grupo ^{15}N-nitro presente na molécula pai (**Figura 9**). Nas condições cromatográficas e espectrométricas utilizadas, além do produto nitrado, o 18:2 e seus produtos de oxidação foram também detectados e caracterizados segundo dados apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 : Propriedades cromatográficas e espectrométricas dos produtos derivados do 18:2 + PI, analisados por LC-ESI/MSM/MS, segundos as condições analíticas descritas no item *material e métodos 3.5.1.1.*

Produto	LNO_2OH	LNO_2	18:2-OH	18:2-OOH	18:2	17:0 (PI)
m/z $[M-H]^-$	340	324	293	311	279	269
Tempo de retenção (min)	6-7	10-11	8-9	8-9	14-15	16-17

PI = padrão interno

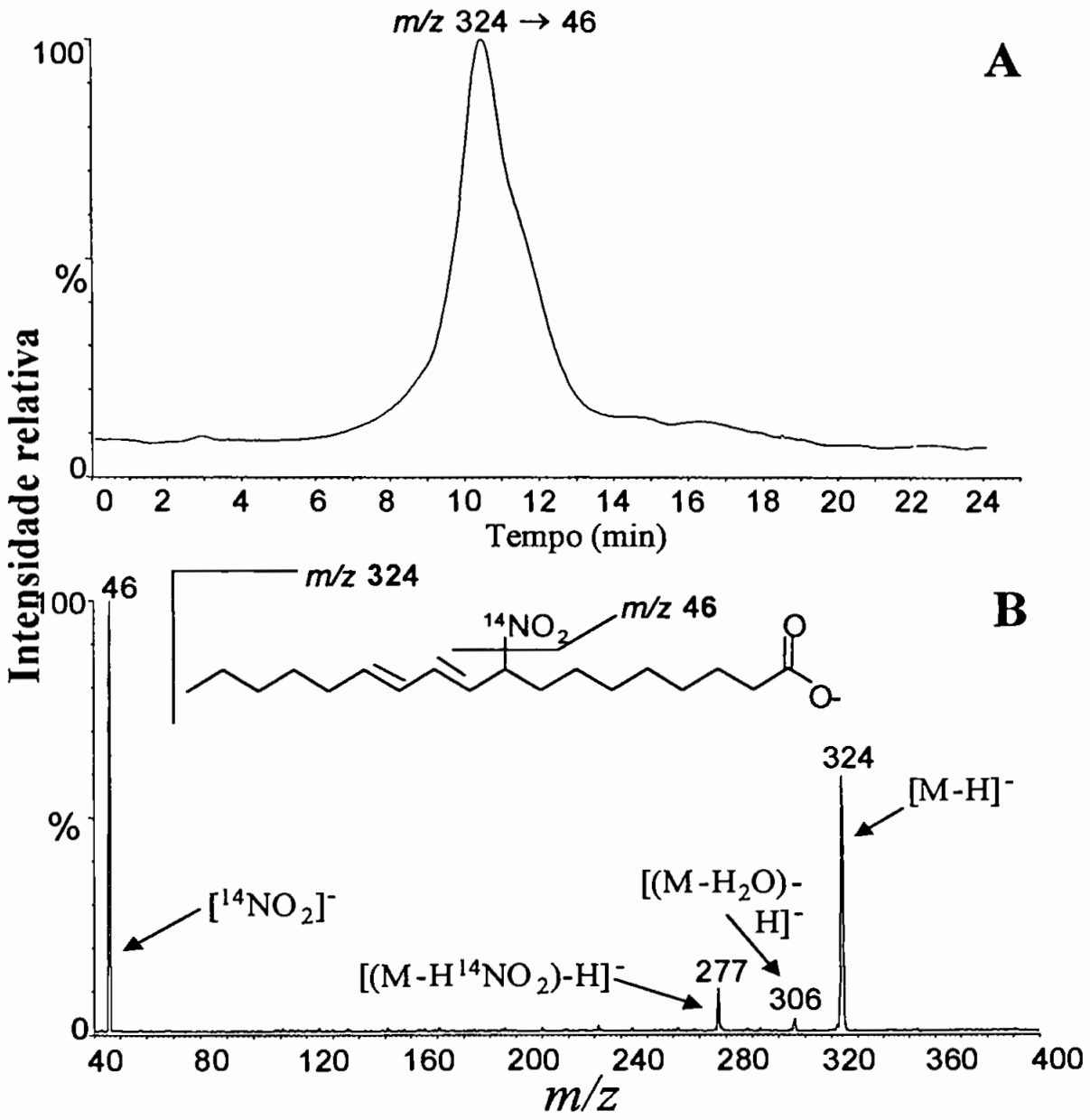

Figura 7: Análise por LC-ESI/MS/MS do principal produto da reação do 18:2 com NO_2BF_4 (A) Cromatograma da detecção *por MRM* (340→46) [M-H] $^-$;(B) espectro de fragmentaçao MS/MS do íon de *m/z* 324 obtido do pico eluído entre 10-11 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.1.1

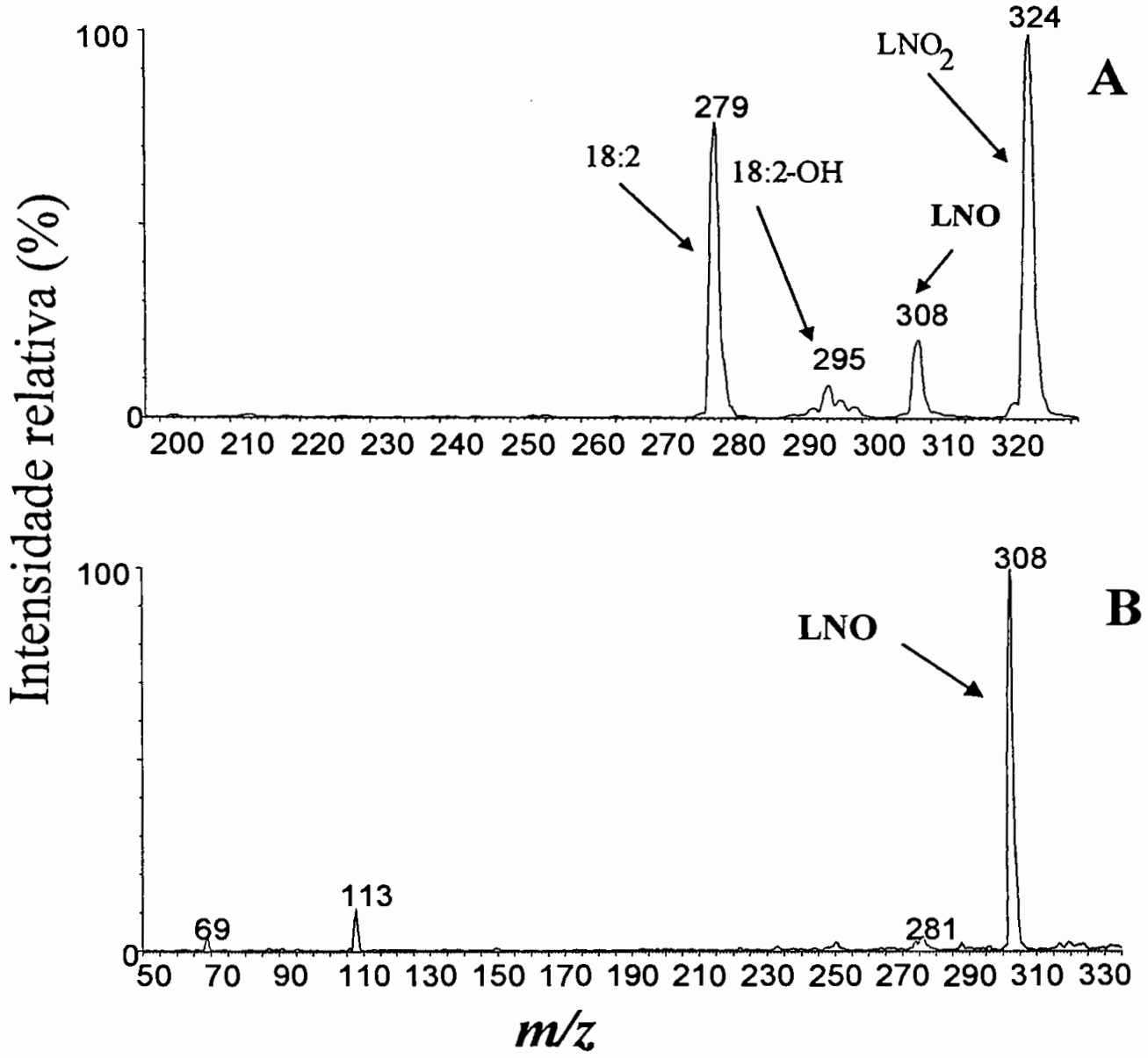

Figura 8: Análise por LC-ESI/MS/MS dos produtos da reação do 18:2 com NO_2BF_4. Espectro de massa no modo *scan* dos produtos gerados a partir do pico eluído em 10-11 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.1.1

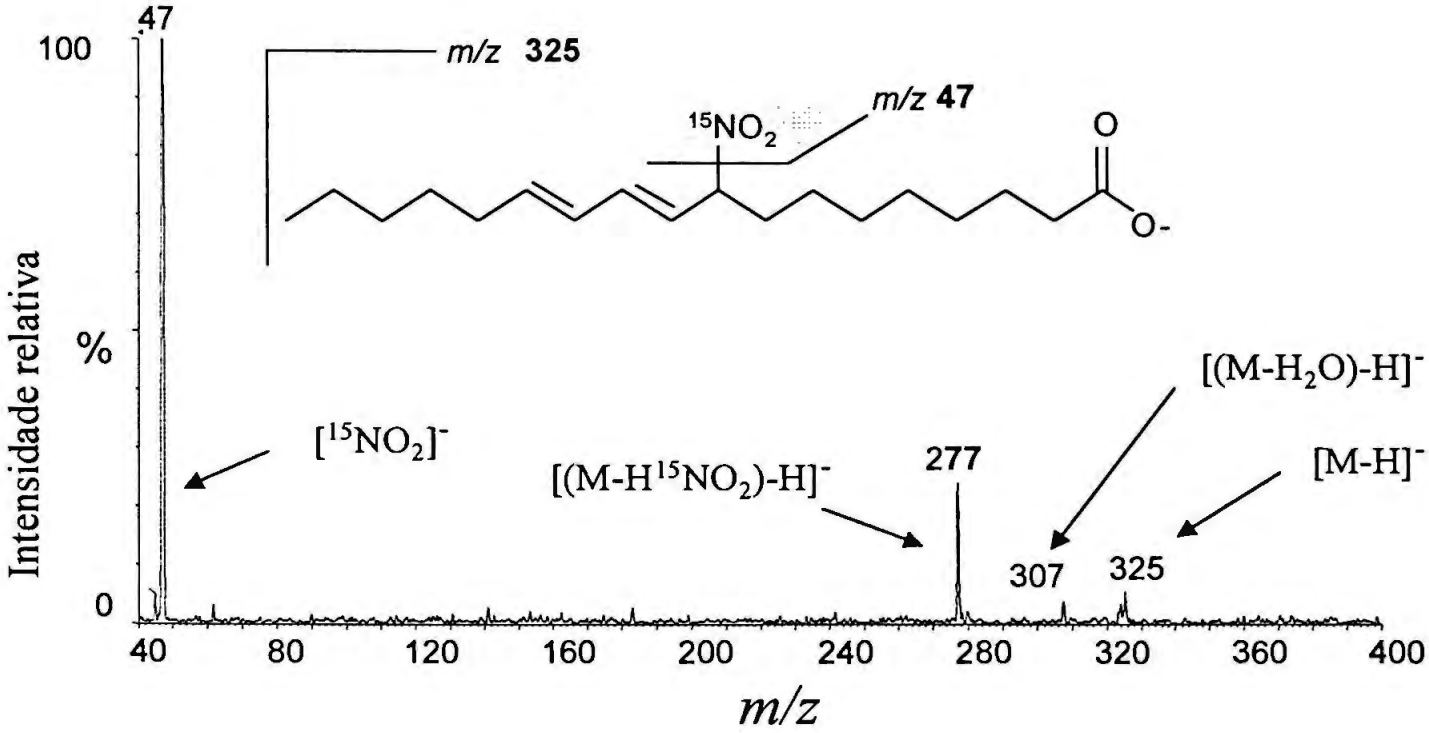

Figura 9: Análise por LC-ESI/MS/MS do principal produto da reação do 18:2 com ^{15}N-nitrito em meio ácido. (A) Cromatograma da detecção *por MRM* (325→47) [M-H]$^-$; (B) espectro de fragmentaçao MS/MS do íon de *m/z* 325 obtido do pico eluído entre 10-11 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.1.1.

4.1.3 Reação do Ch18:2 com $NaNO_2$ ou NO_2BF_4

A análise por LC-ESI/MS/MS do produto da síntese do Ch18:2 com NO_2BF_4, conforme descrito no item 3.5.1.2, mostrou um íon principal, eluindo a 5,9 minutos, de *m/z* 711, característicos de um aduto de amônio do produto nitrado $[M+NH_4]^+$ (**Figura 10A**). Quando fragmentado por MS/MS, este produto mostrou como fragmento principal um íon de *m/z* 369, característico do grupo colesterol presente na molécula pai $[(colesterol)-OH]^+$. Íons de *m/z* 716, indicativos de adutos de sódio $[M+Na]^+$ e de *m/z* 664, formados pela perda de $-NO_2$ a partir do aduto de amônio do produto nitrado $[M-(HNO_2)+H]^+$, também foram observados (**Figura 10B**). A presença do grupo nitro no produto de *m/z* 711 foi confirmado por LC-ESI/MS/MS, sintetizando este produto pela reação do Ch18:2 com nitrito de sódio marcado isotopicamente com $[^{15}N]$. Esta reação produziu um íon molecular de *m/z* 712, mostrando o mesmo perfil cromatográfico, espectrométrico e abundância isotópica do produto sintetizado com ^{14}N-nitrito ou NO_2BF_4 (**Figura 11**). O tratamento do Ch18:2 com NO_2BF_4 gerou aproximadamente 70% do produto nitrado, que foi o melhor rendimento entre os demais procedimentos de síntese testados. Além do produto nitrato, o Ch18:2 e seus produtos de oxidação (hidroxi, hidroperóxidos) foram detectados e caracterizados conforme dados apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 : Propriedades cromatográficas e espectrométricas dos produtos nitrados e oxidados derivados do Ch18:2, analisados por LC-ESI/MSM/MS, segundos as condições analíticas descritas no item *3.5.1.2 de Material e Métodos.*

Produto	**Ch18:2NO$_2$**	**Ch18:2-OH**	**Ch18:2-OOH**	**Ch18:2**
m/z $[M+NH4]^+$	711	682	698	666
Tempo de retenção (min)	5-6	9-10	9-10	14-15

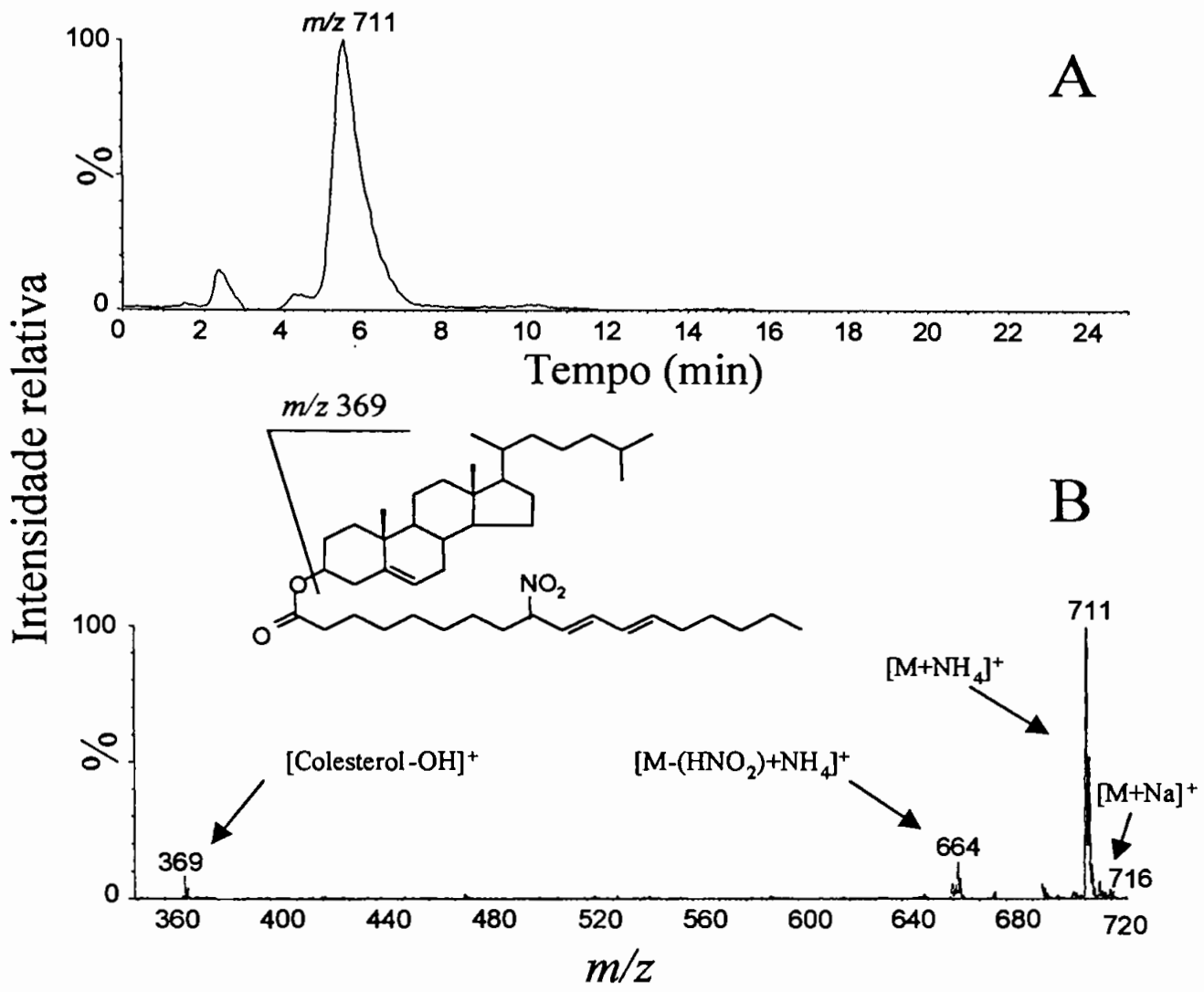

Figura 10: Análise por LC-ESI/MS/MS do principal produto da reação do Ch18:2 com NO_2BF_4 (**A**) Cromatograma da detecção *por MRM* (711→369) [M+NH4]$^+$;(**B**) espectro de fragmentaçao MS/MS do íon de *m/z* 711 obtido do pico eluído entre 5-6 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.1.2

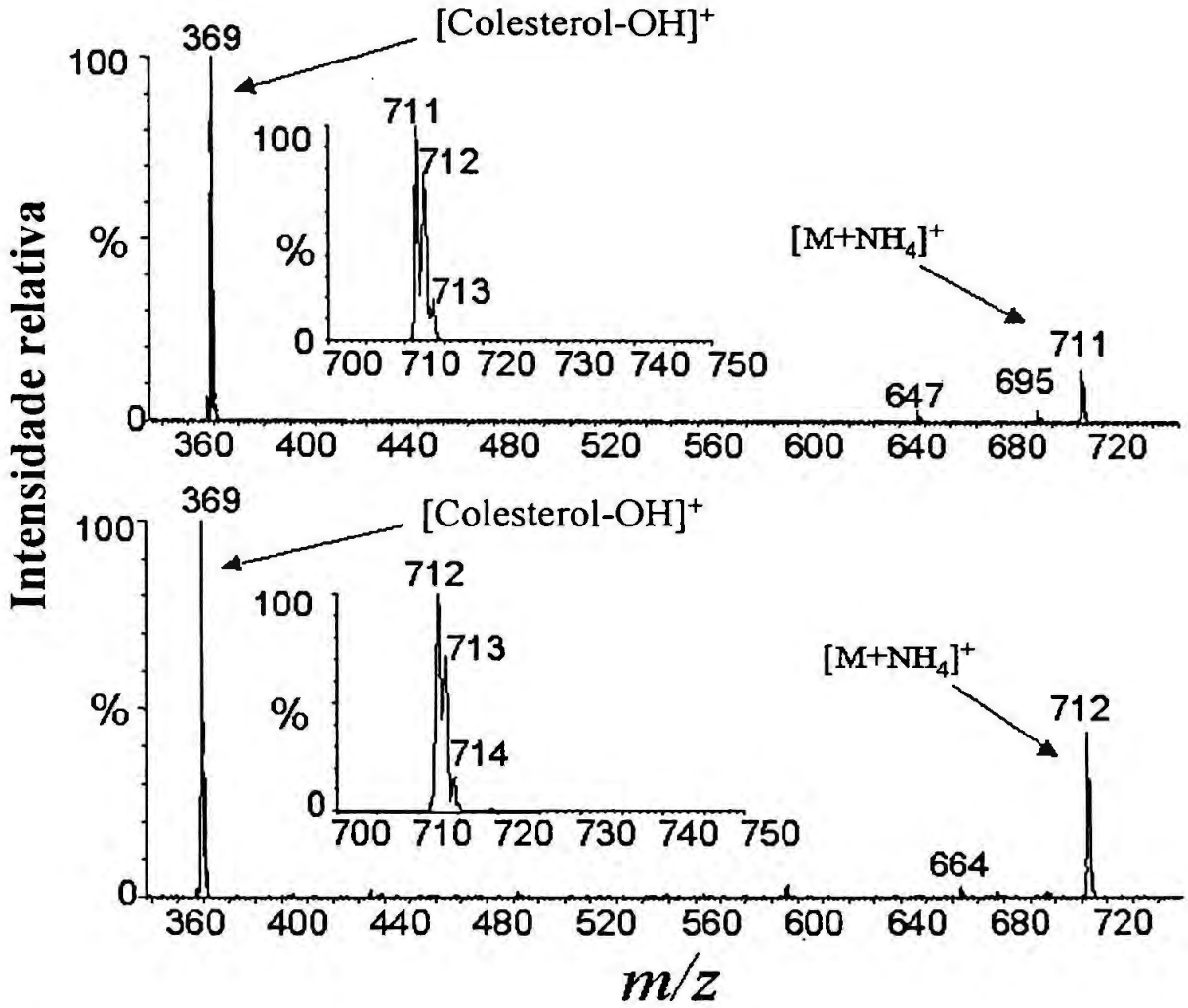

Figura 11: Análise por LC-ESI/MS/MS do principal produto da reação do Ch18:2 com nitrito de sódio em meio ácido. (**A**) espectro de fragmentaçao MS/MS do produto sintetizado com ^{14}N-nitrito e ampliaçao da região do íon de *m/z* 711. (**B**) Espectro de fragmentaçao MS/MS do produto sintetizado com ^{15}N-nitrito e ampliaçao da região do íon de *m/z* 712. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.1.2.

4.2 Análises por absorção no infravermelho

O espectro de infravermelho do padrão sintetizado pela reação do 18:2 com NO_2BF_4 (*m/z* 324) revelou a presença de duas novas bandas de absorção nas regiões de 1374 e 1552 quando comparado com o expectro do 18:2 (**Figura 12**). Também, na análise do produto da síntese do 18:2-OOH com nitrito (*m/z* 340), duas novas bandas de absorção em 1553 e 1374 cm^{-1} e outra banda que fortemente absorveu na regiao de 3400 cm^{-1} foram observadas. (**Figura 13**). A **Tabela 3** apresenta o resumo das principais bandas obtidas nos espectros do 18:2 e dos padrões sintetizados, comparando com dados teóricos da literatura. A análise por infravermelho do produto de *m/z* 711, quando comparada com a análise do Ch18:2, apresentou características de absorçao do grupo nitro ligado diretamente a cadeia carbônica (1549 e1374 cm^{-1}, (**Figura 14**). Para nenhum dos compostos analisados, foram observadas bandas de absorção na região onde nitritos (-ONO) ou nitratos (-OONO) ligados a cadeias carbônicas, fortemente absorvem (1600-1680 cm^{-1}).

Tabela 3 : Dados da literatura e das análises por absorção no infra-vermelho dos produtos nitrados e nitrosilados derivados do 18:2.

Grupo Funcional	18:2	Padrões sintetizados	Dados da literatura
N=O de nitro assimétrico; LNO_2	---	**1549, 1552,1553**	1500-1565
N-O de nitro simétrico; LNO_2	---	**1374**	1290-1390
OH do grupo carbonila	3009	3012	3335-2500
C=O	1710	1712	1740
C-H	2919	2928, 2956	2940
OH do grupo hidroxila	---	**3490***	3570
N=O do nitrito; LONO	---	---	1680-1610
N=O do nitrato; $LONO_2$	---	---	1660-1625

* Produto de *m/z* 340 (LNO_2OH)

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

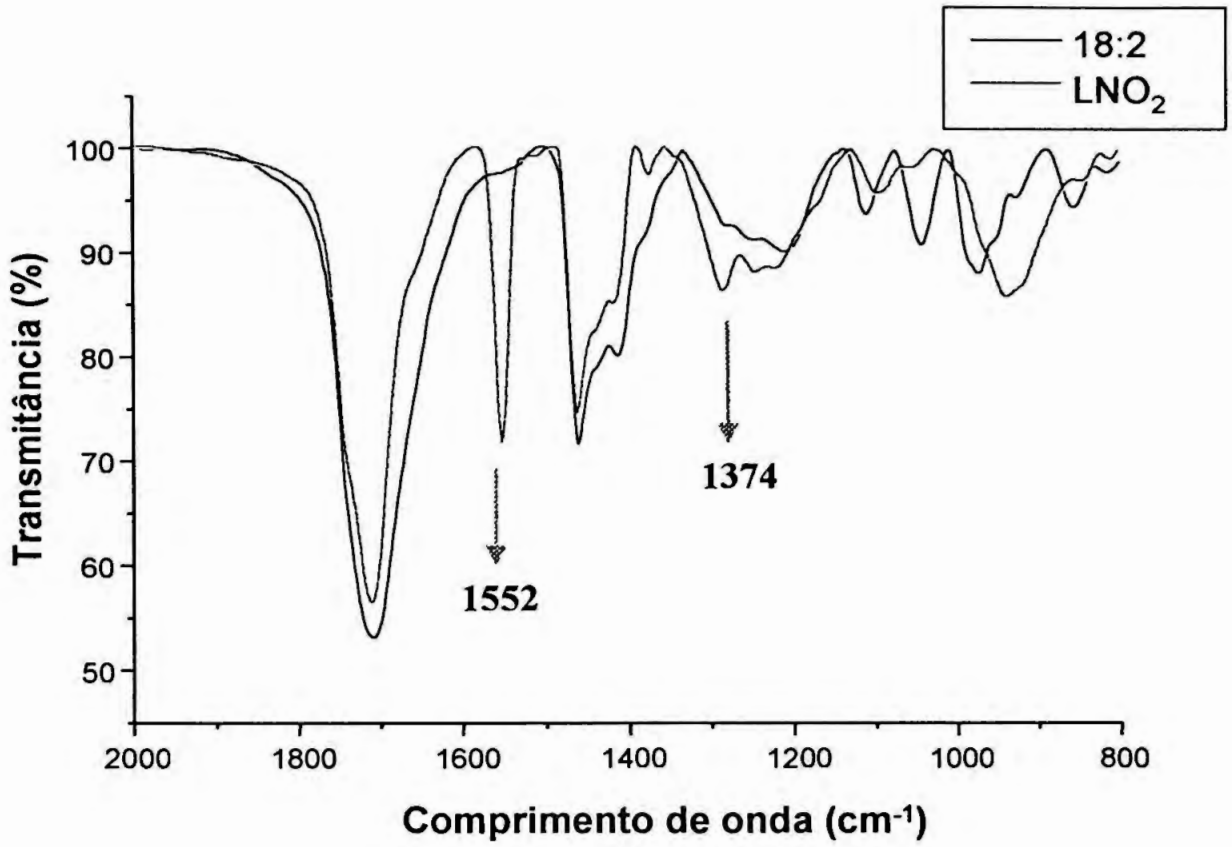

Figura 12: Análise por absorção no infra vermelho do produto da síntese do 18:2 com NO_2BF_4. Os espectros foram obtidos na função *scan*, pelo acúmulo de 128 espectros entre 700 e 4000 nm..

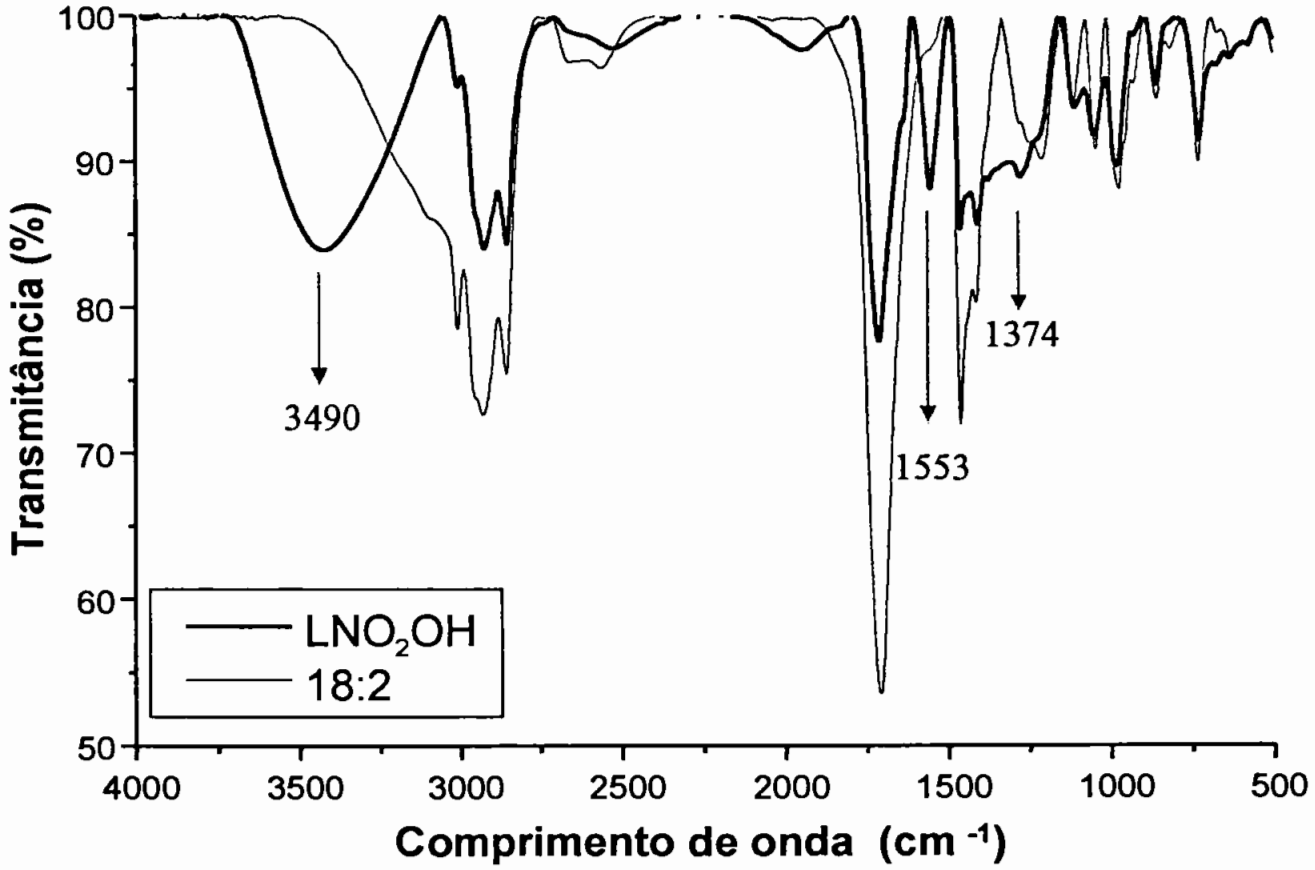

Figura 13: Análise por absorção no infra vermelho do produto da síntese do 18:2-OOH com nitrito de sódio em meio ácido. Os espectros foram obtidos na função *scan*, pelo acúmulo de 128 espectros entre 700 e 4000 nm..

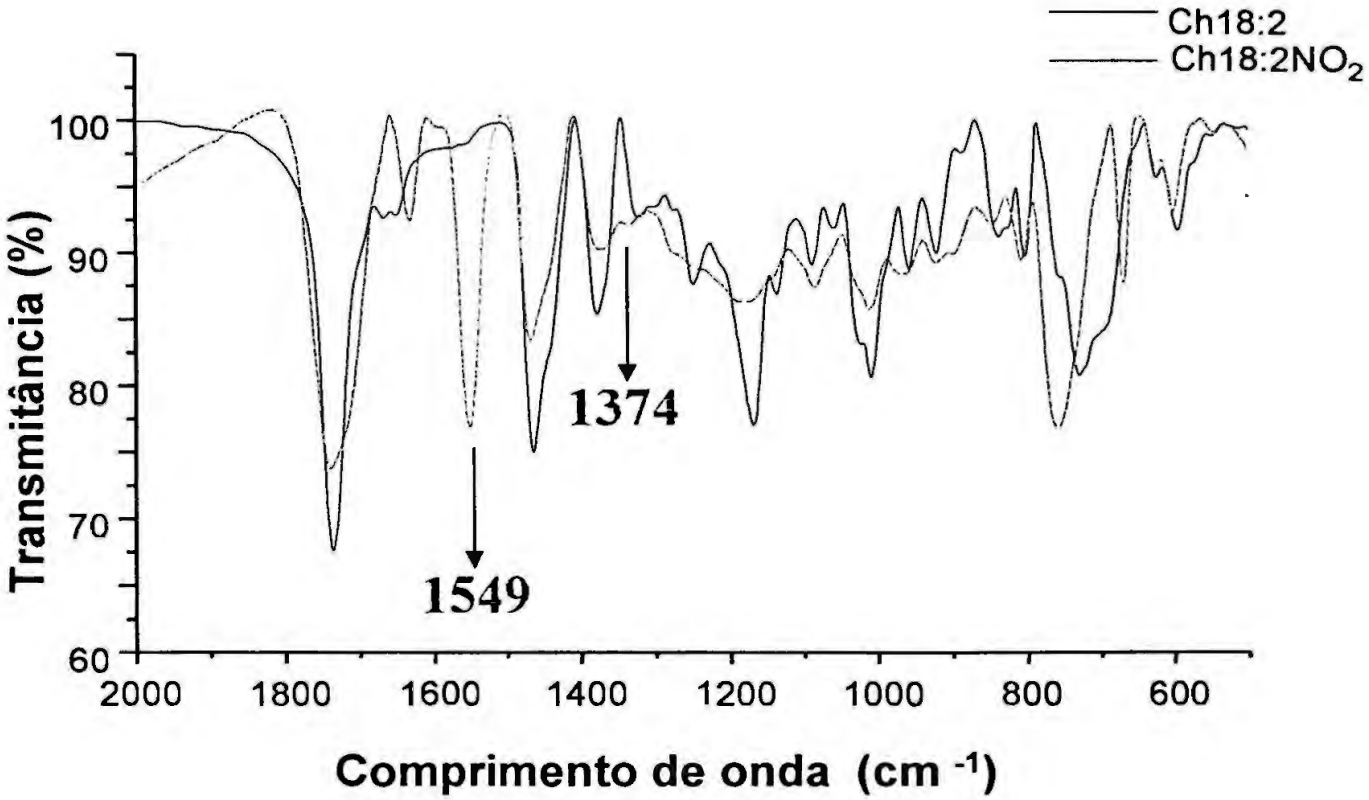

Figura 14: Análise por absorção no infra vermelho do produto da síntese do Ch18:2 com NO_2BF_4. Os espectros foram obtidos na função *scan*, pelo acúmulo de 128 espectros entre 700 e 4000 nm.

4.3 Análises por ressonância magnética nuclear

O espectro de ^{15}N-RMN apresentou sinal em 375,9 *ppm*, característico do grupamento ($C-NO_2$), (**Figura 15A**). A análise do nitrometano, utilizado como padrão de referência, mostrou um sinal característico em 376,1 *ppm* (**Figura 15B**), muito próximo do deslocamento químico do produto nitrado.

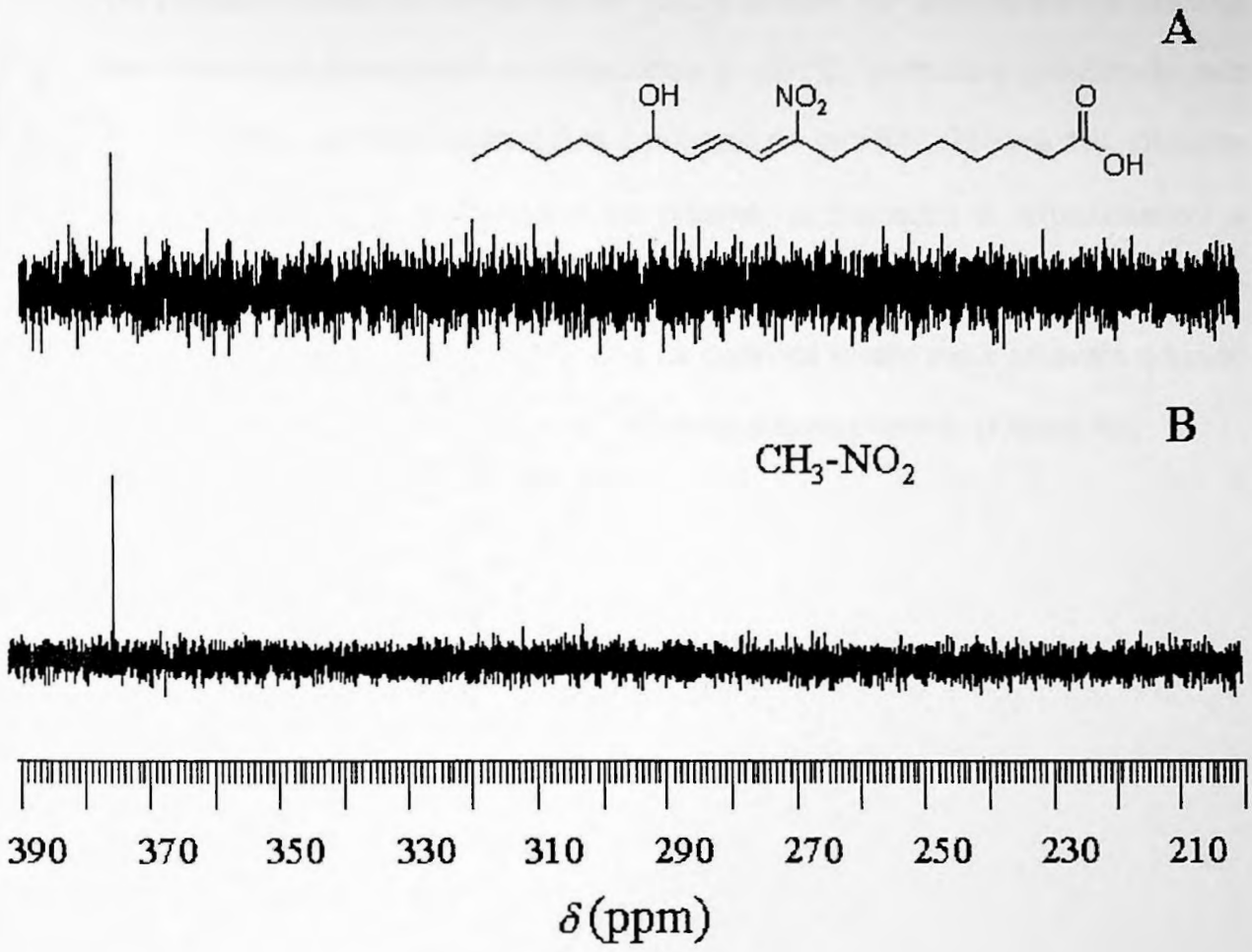

Figura 15: Espectro de ^{15}N-RMN do produto da síntese do 18:2-OOH com ^{15}N-nitrito de sódio em meio ácido (A) e do nitrometano (B). Os espectros foram obtidos segundo condiçoes descritas no item 3.5.3 de *material e métodos*.

4.4 Teste de estabilidade química

Os produtos nitrados derivados do 18:2 puderam ser detectados no plasma até 7 dias depois de aliquotados e congelados a –20 °C, contudo o produto de *m/z* 324 (LNO_2) mostrou-se mais estável que o produto de *m/z* 340 (**Figura 16**). Quando ambos os padrões foram adicionados ao plasma, aliquotados e armazenados a diferentes condições de temperatura (4 e –70°C), o LNO_2 também mostrou-se mais estável que o LNO_2OH (**Figura 17**). Ambos os padrões foram mais estáveis quando mantidos em isopropanol, do que quando adicionados ao plasma. (**Figura 18**)

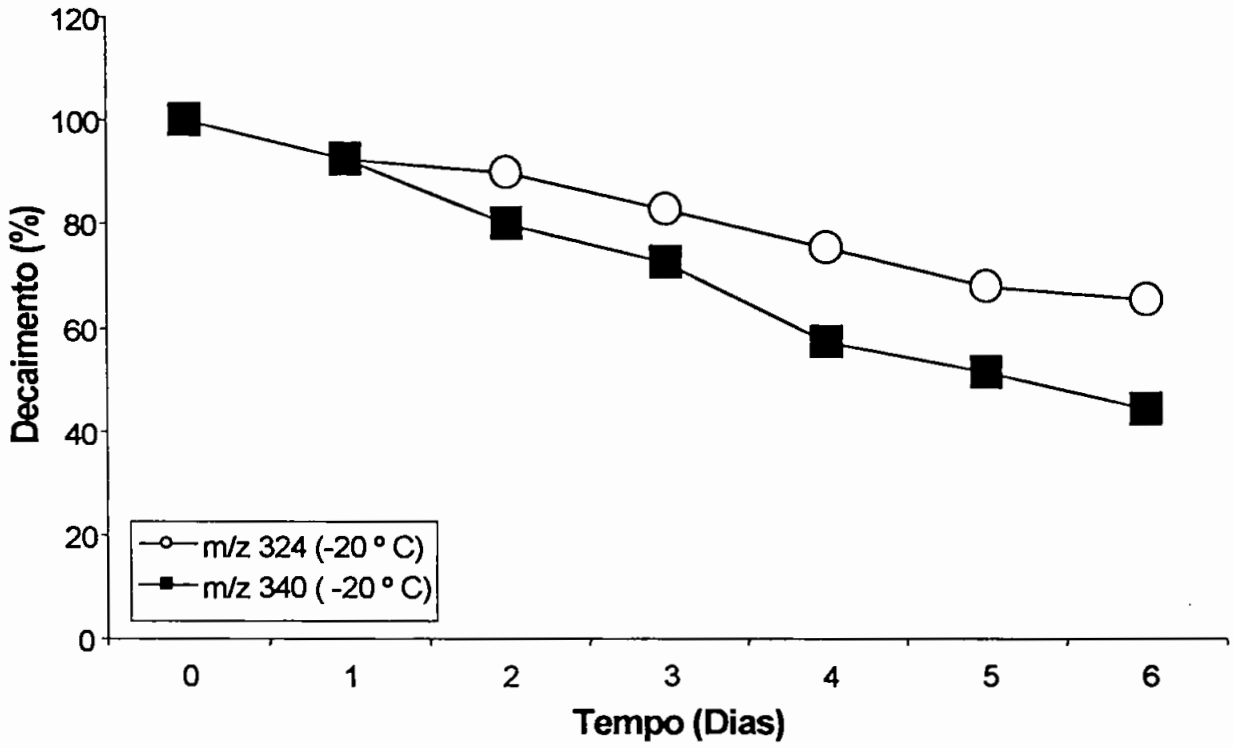

Figura 16 : Estabilidade dos produtos nitrados derivados do 18:2 no plasma. Percentagem de decaimento dos produtos armazenado a –20°C e analisados por LC-ESI/MS/MS em intervalos de 24 horas durante 7 dias.

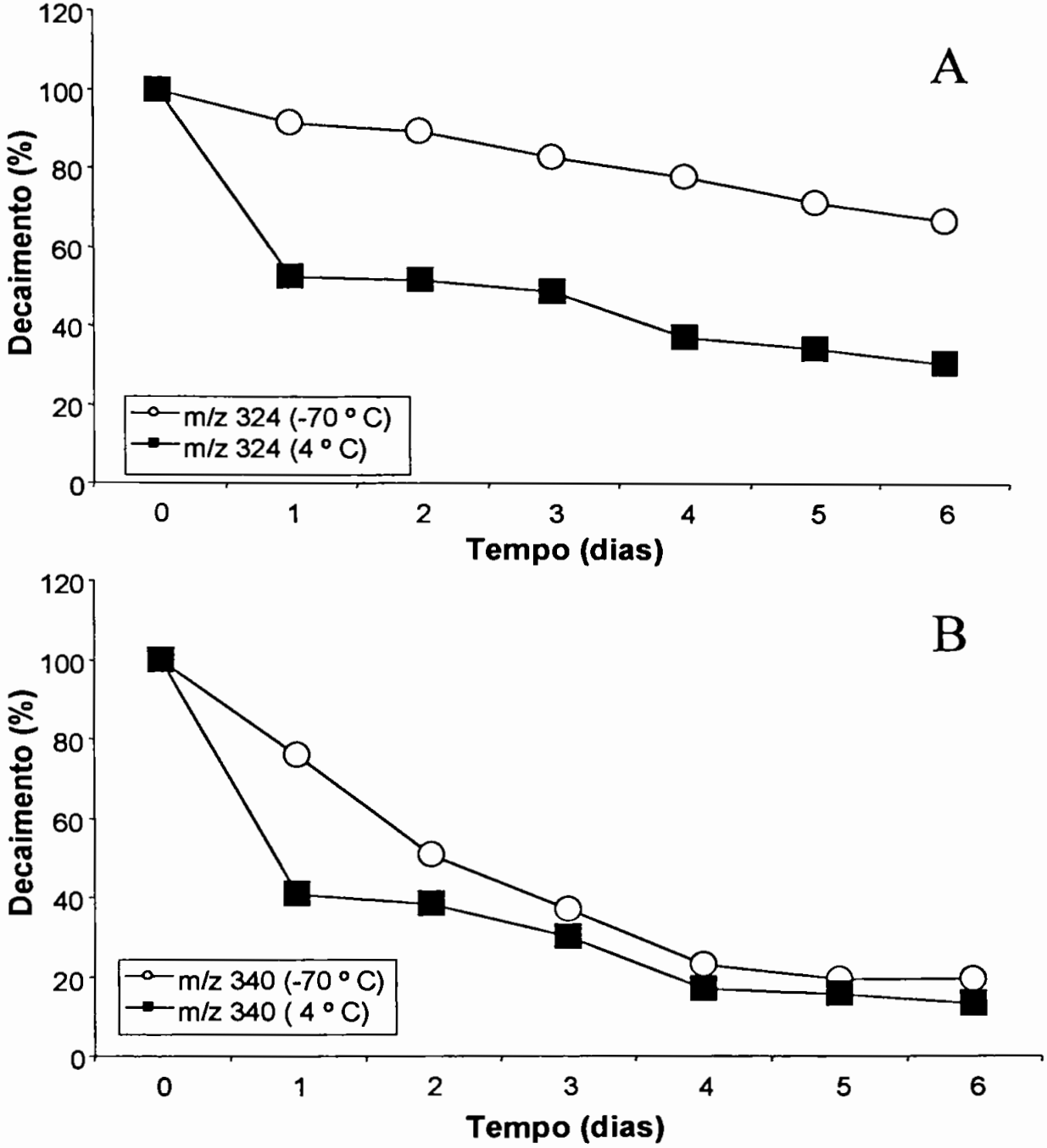

Figura 17 : Estabilidade dos padrões LNO_2 (*m/z* 324) (A) e LNO_2OH (*m/z* 340) (B) adicionados ao plasma humano. Os produtos foram armazenados a 4 e –70°C e analisados por LC-ESI/MS/MS em intervalos de 24 horas durante 7 dias.

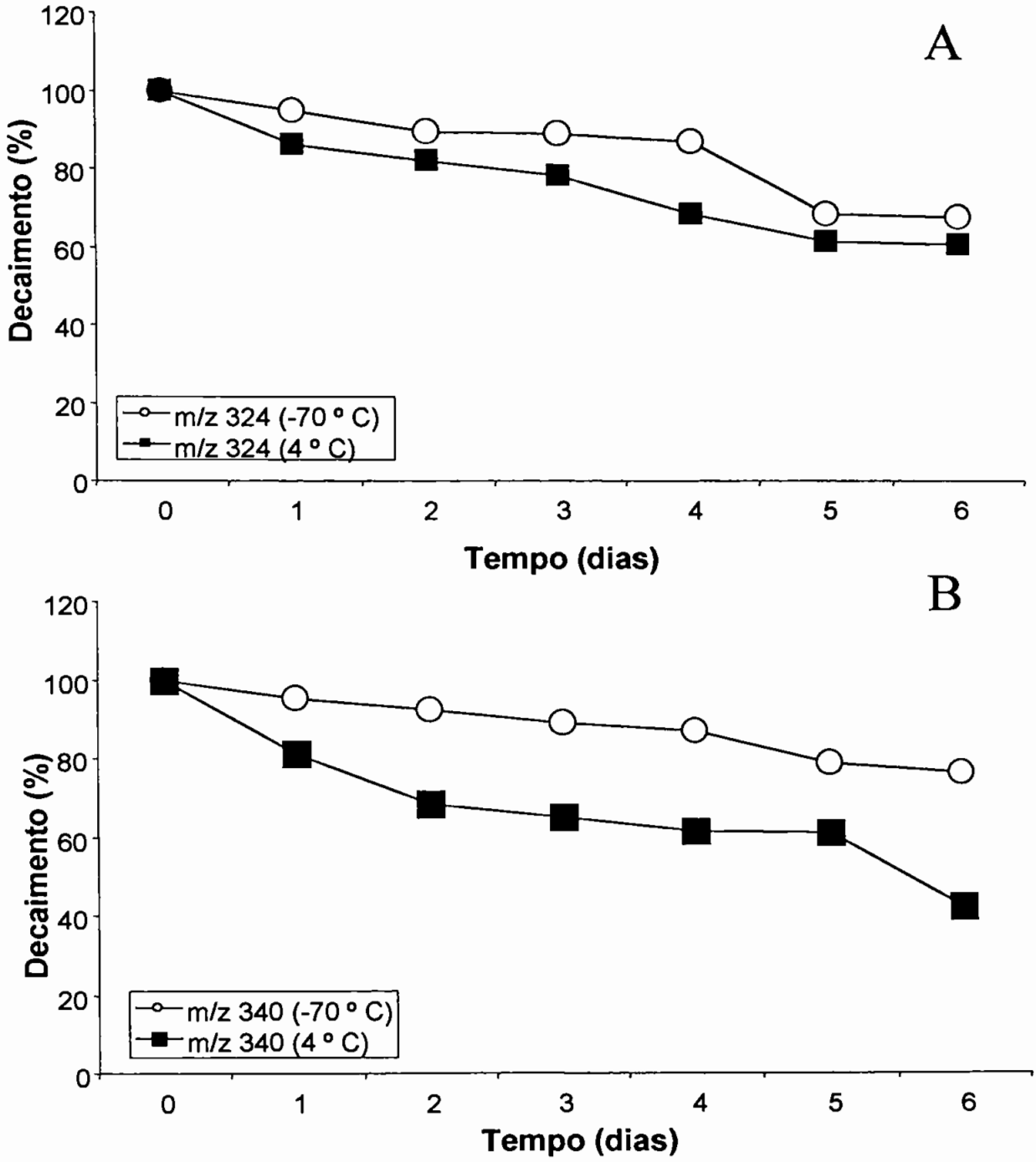

Figura 18: Estabilidade dos padrões sintetizados LNO_2 (*m/z* 324) (A) e LNO_2OH (*m/z* 340) (B). Os produtos foram mantidos em isopropanol, armazenados a 4 e –70°C e analisados por LC-ESI/MS/MS em intervalos de 24 horas durante 7 dias.

4.5. Sistema de extração dos produtos nitrados derivados do 18:2

Utilizando o método tradicional para extração de ácidos graxos livres do plasma, através da extração do padrão sintetizado, do padrão adicionado ao plasma e comparando com a recuperação do padrão interno (ácido heptadecanóico, 17:0), pôde-se observar melhor recuperação do produto nitrado pelo método proposto no presente trabalho, conforme apresentado na **Tabela 4**. O melhor rendimento na recuperação dos produtos nitrados também foi obtido quando realizou-se a extração em pH ácido (pH 3,0), contudo estes produtos puderam ser detectados com o extração realizada em pH 7,0, conforme mostra a **Figura 19**.

Tabela 4 : Comparação da recuperação do produto nitrado e padrão interno em diferentes sistemas de extração.

Método	Produto nitrado (% recuperação)	Padrão interno (% recuperação)
Doles	< 85	>90
O'Donnell modificado	> 90	>90

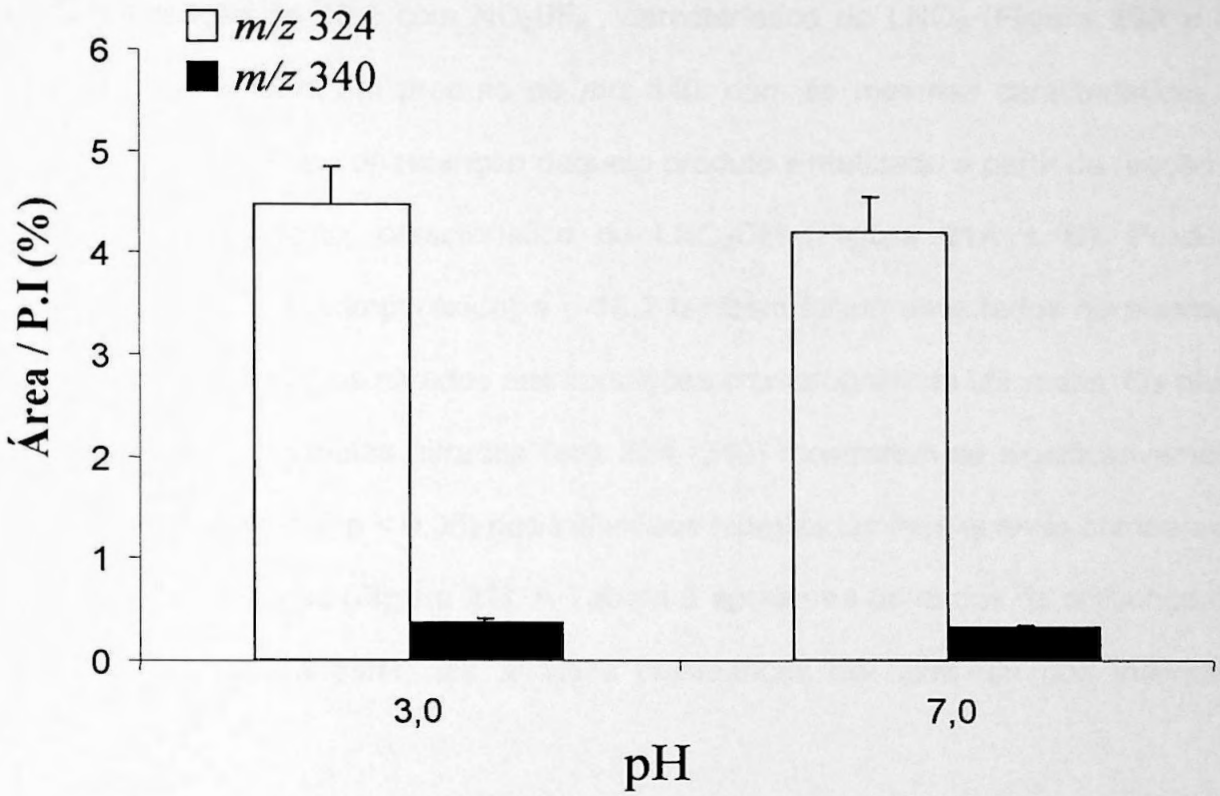

Figura 19 : Efeito da variação do pH na extração dos produtos nitrados e nitrosilados do plasma. Análise por LC-ESI/MS/MS conforme condições experimentais descritas no item 4.5.2.2.

4.6. Detecção dos produtos nitrados derivados do 18:2 no plasma

As análises do plasma humano, utilizando as condições analíticas descritas nos itens 3.5.1.1 e 3.6.3, revelaram a presença de um produto de *m/z* 324 eluído entre 10-12 minutos, com o mesmo perfil de fragmentação do produto sintetizado a partir da reação do 18:2 com NO_2BF_4 , característico do LNO_2 (**Figura 20A e B**). Detectou-se também um produto de *m/z* 340, com as mesmas características de fragmentação e tempo de retenção daquele produto sintetizado a partir da reação do 18:2-OOH com nitrito, característico do LNO_2OH (**Figura 21A e B**). Produtos oxidados (hidroxi e hidroperóxido) e o 18:2 também foram detectados no plasma e separados dos produtos nitrados nas condições cromatográficas utilizadas. Os níveis plasmáticos dos produtos nitrados (*m/z* 324, 340) mostraram-se significativamente mais elevados (*test T*, $p < 0,05$) nos indivíduos hiperlipidêmicos quando comparados aos normolipidêmicos (**Figura 22**). A **Tabela 5** apresenta os dados da presença dos produtos nitrados a partir das análises plasmáticas de cada um dos indivíduos estudados.

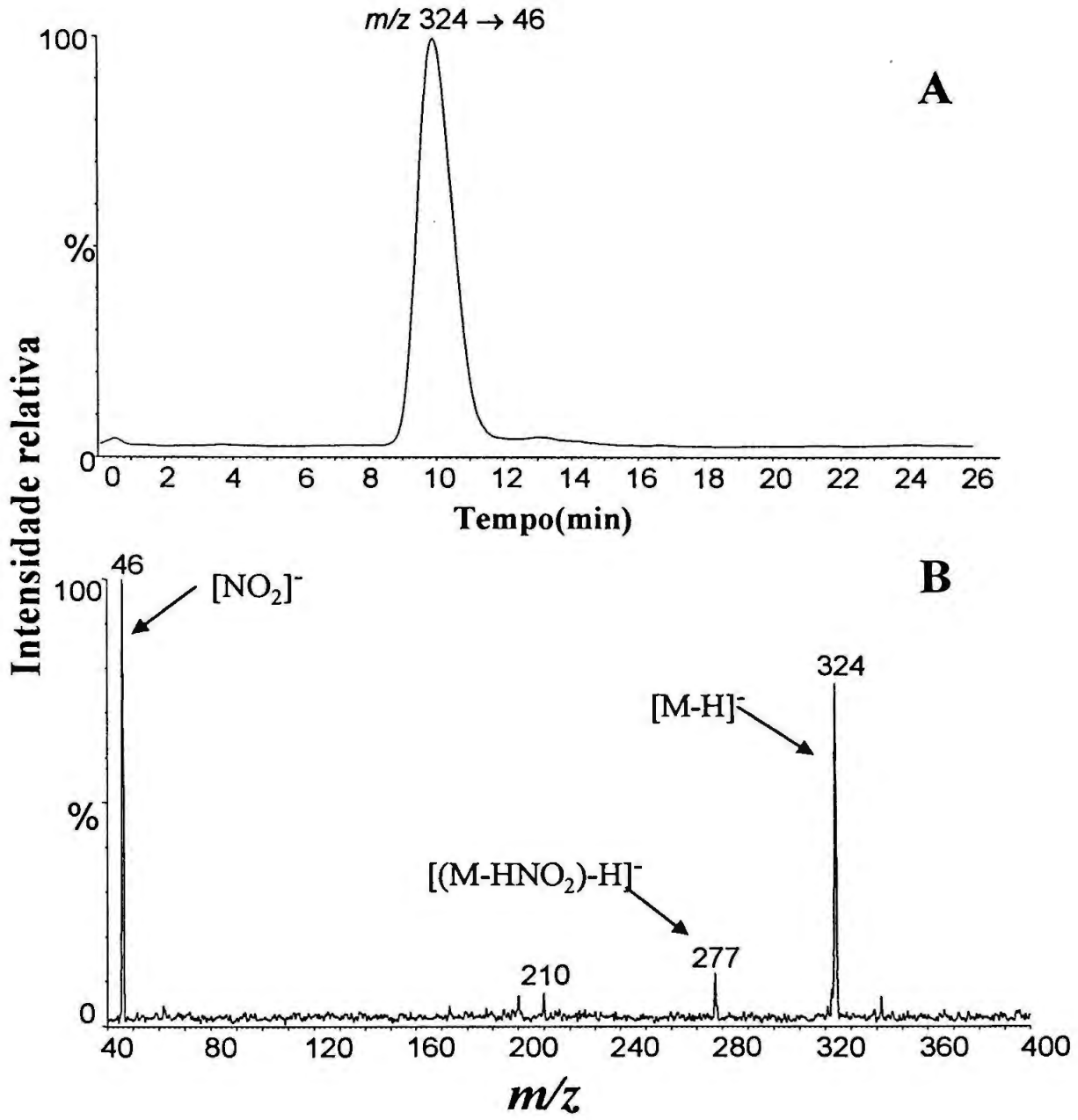

Figura 20: Análise por LC-ESI/MS/MS do produto de *m/z* 324 detectado em plasma. (A) Cromatograma da detecção *por MRM* (324→46) [M-H] $^-$;(B) espectro de fragmentaçao MS/MS do íon de *m/z* 324 obtido do pico eluído entre 10-12 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.2.

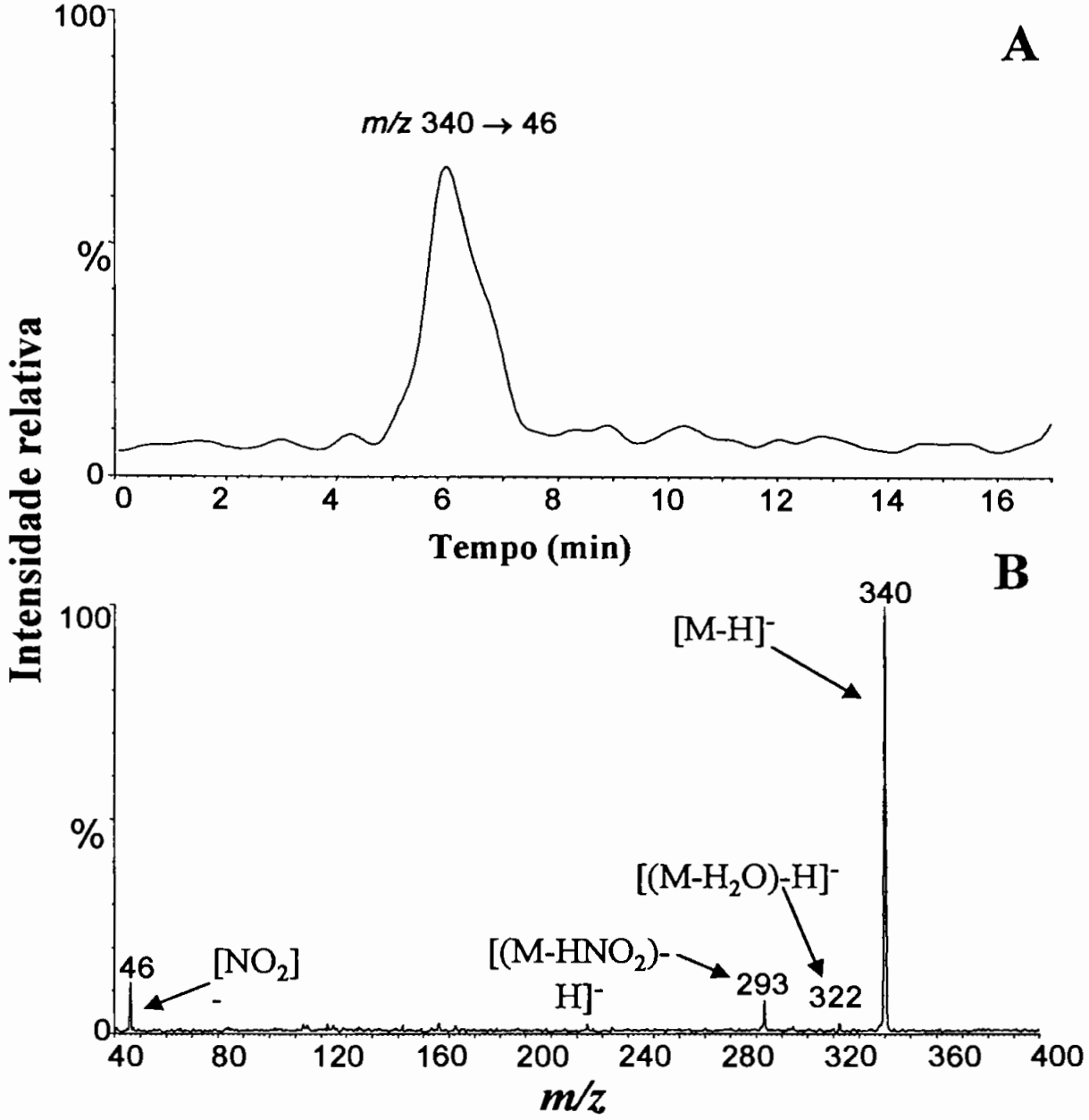

Figura 21: Análise por LC-ESI/MS/MS do nitrohidroxilinoleato (*m/z* 340) no plasma. (A) Cromatograma da detecção *por MRM* (340→46) [M-H] $^-$;(B) espectro de fragmentaçao MS/MS do íon de *m/z* 340 obtido do pico eluído entre 6-8 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.2.

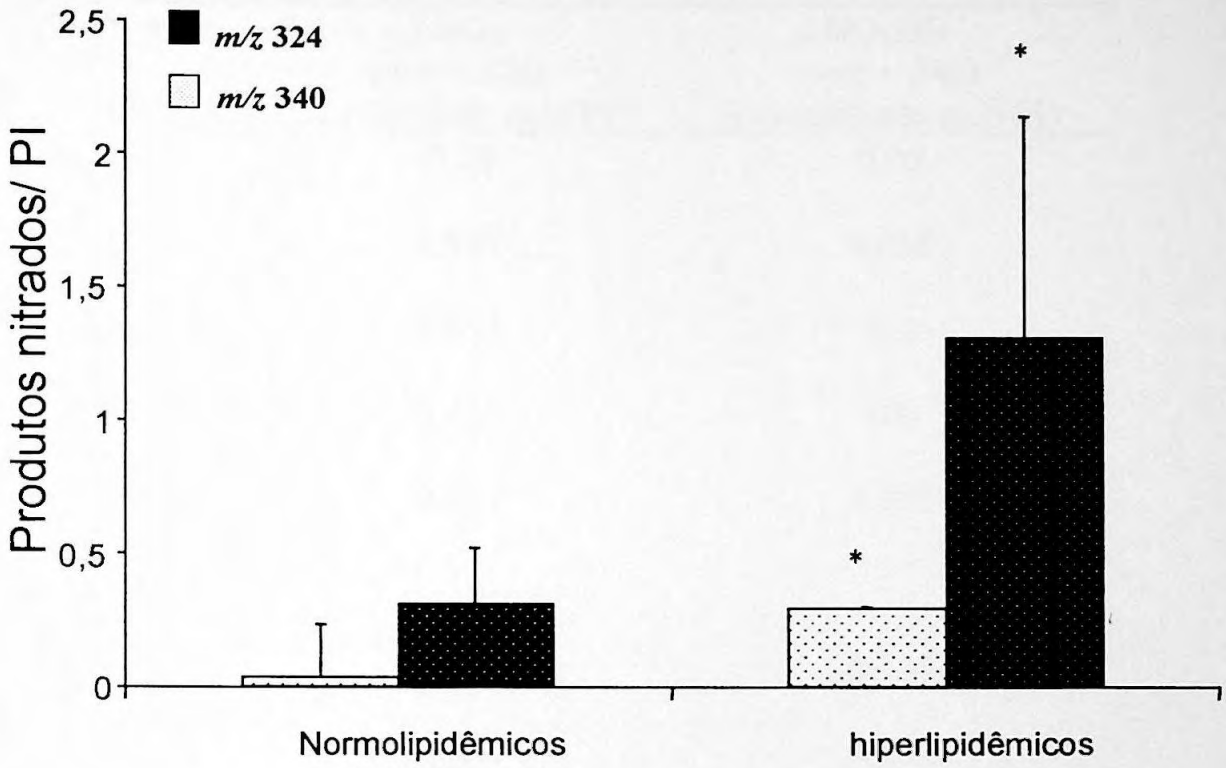

Figura 22 : Níveis plasmáticos de LNO_2/LONO (*m/z* 324) e LNO_2OH (*m/z* 340) em indivíduos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos. * Os valores foram normalizados pelo padrão interno (PI). As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.1.1.

Tabela 5: Níveis plasmáticos de LNO_2/LONO (*m/z* 324) e LNO_2OH (*m/z* 340) em indivíduos normolipidêmicos e hiperlipidêmicos

Indivíduos	LNO_2 (*m/z* = 324) (normalizado pelo PI)	LNO_2OH (*m/z* = 340) (normalizado pelo PI)
5N† (H 26) *	0,58	0,05
6N (M 25)	0,169	0,038
7N (M 47)	0,053	ND
8N (M 27)	0,426	ND
9N (M 20)	0,337	0,033
1H (M57)	0,96	0,217
2H (M58)	0,57	0,182
3H (M 56)	1,23	0,59
4H (H 61)	2,5	0,19

* H= homem; M= mulher; número= idade
† N= normolipidêmico; H= hiperlipidêmico
PI= Padrão interno (Ácido heptadecanóico, 17:0)

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

4.7. Detecção e caracterização dos lipídios nitrados derivados do Ch18:2 no plasma e nas lipoproteínas

Quando o plasma de indivíduos normolipidêmicos (n=4) foram analisados por LC-ESI/MS/MS, segundo condições cromatográficas e espectrométricas descritas no ítem 3.5.1.2, um íon de *m/z* 711 apresentando um fragmento de *m/z* 369 [(cholesterol)-OH]$^+$ foi detectado (**Figura 23A, traço a**). Este produto apresentou as mesmas características cromatográficas e perfil de fragmentação do produto sintetizado a partir da reaçao do Ch18:2 com NO_2BF_4 ou com nitrito de sódio em meio ácido (**Figura 23B**). Nestas condições, nenhum produto de massa característica do produto nitrado do 3H-Ch18:2 adicionado ao plasma (transição MRM 713→371) foi detectado (**Figura 23A, traço b**). O produto nitrado também foi detectado nas frações lipoprotéicas (VLDL, LDL, HDL) isoladas do plasma de indivíduos normolipidêmicos. (**Figura 24**).

O linoleato de cholesterol foi também detectado nas amostras de plasma e lipoproteínas analisadas, eluindo depois do produto nitrado (aproximadamente 14 minutos). Este produto foi detectado como um íon de *m/z* 666, relativo ao aduto de amônio formado [M+NH_4]$^+$, que quando analisado por MS/MS apresentou como fragmento principal um íon-filho de *m/z* 369, característico do grupo colesteril [colesterol-OH]+ (**Figura 25A e B**). O ^{3}H-Ch18:2 foi detectado, eluindo no mesmo tempo do Ch18:2, como um íon molecular de *m/z* 668 apresentando como íon-filho principal um fragmento de *m/z* 371 relativo ao colesterol marcado com 3H [(colesterol)-OH]$^+$ (**Figura 26 A e B**). A proporção do produto nitrado (*m/z* 711) foi de aproximadamente 0,26% quando comparado com o Ch18:2 presente no plasma, observando-se proporções equivalentes nas frações lipoprotéicas (**Figura 27**). As

concentrações para o Ch18:2 e para o produto nitrado (média ± desvio padrão) observadas no plasma foram foram 76,9 ± 10,7 (nmol/L) e 30 ± 8.7 (µmol/L) para Ch18:2-NO_2 e Ch18:2, respectivamente. Nenhum produto nitrado foi observado quando o procedimento de extração foi realizado apenas com o Ch18:2.

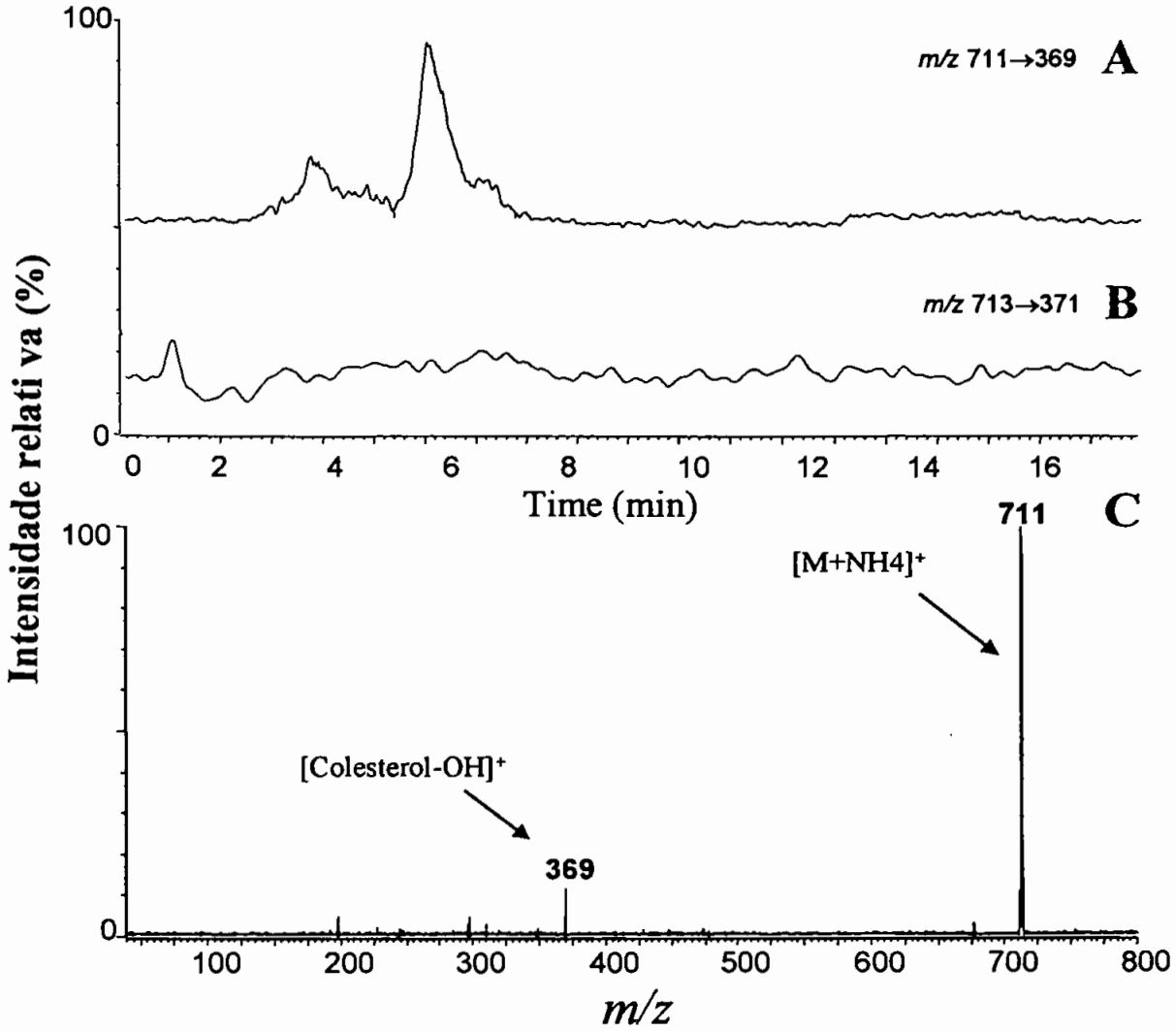

Figura 23: Análise por LC-ESI/MS/MS do nitrolinoleato de colesterol (*m/z* 711) no plasma. (**A**) Cromatograma da detecção *por MRM* (711→369) [M-H] $^-$;(**B**) espectro de fragmentação MS/MS do íon de *m/z* 711 obtido do pico eluído entre 5-6 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.2.

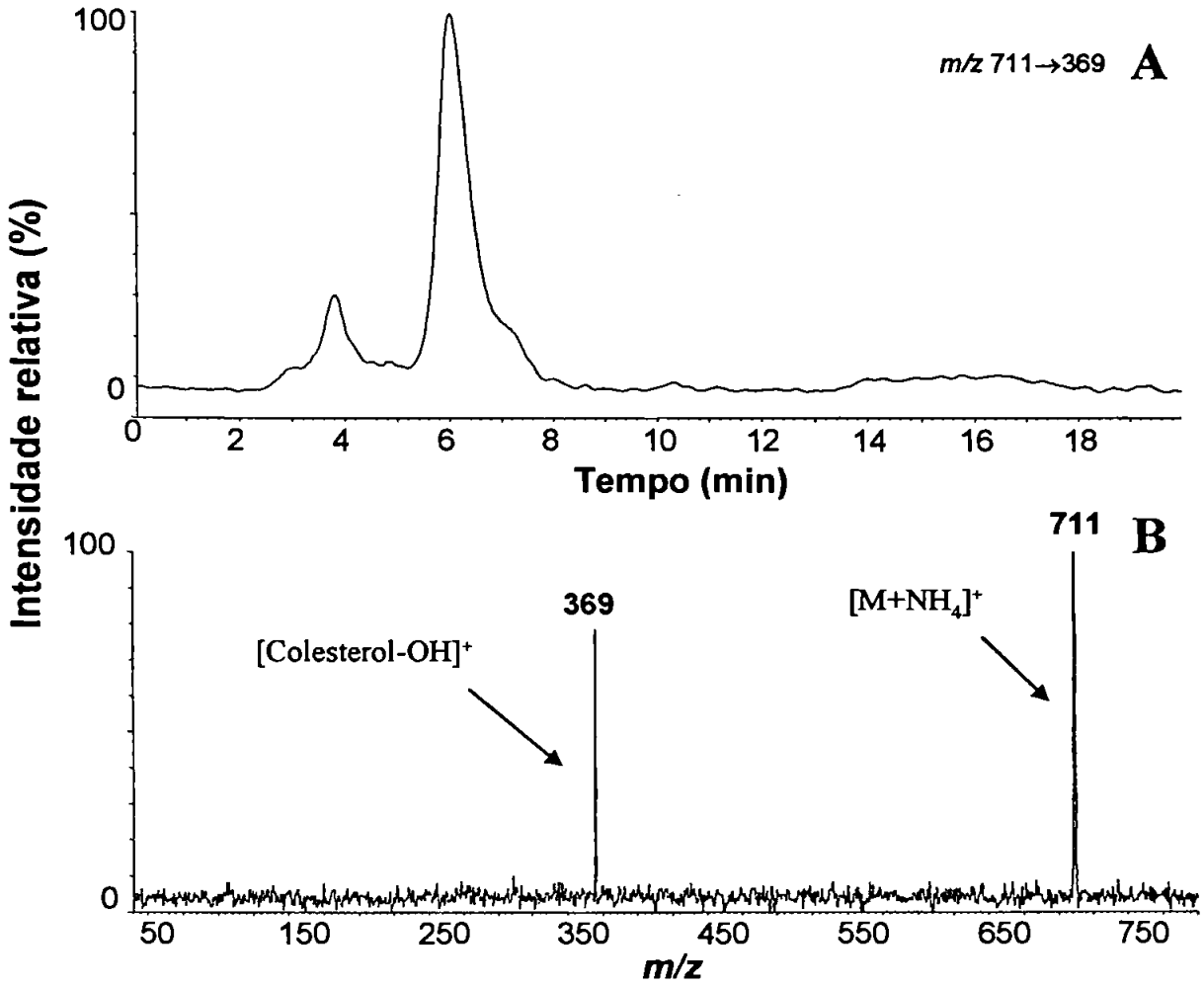

Figura 24: Análise por LC-ESI/MS/MS do nitrolinoleato de colesterol (*m/z* 711) na fração plasmática da LDL. (A) Cromatograma da detecção *por MRM* (711→369) [M-H] ⁻;(B) espectro de fragmentação MS/MS do íon de *m/z* 711 obtido do pico eluído entre 5-6 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 3.5.2.

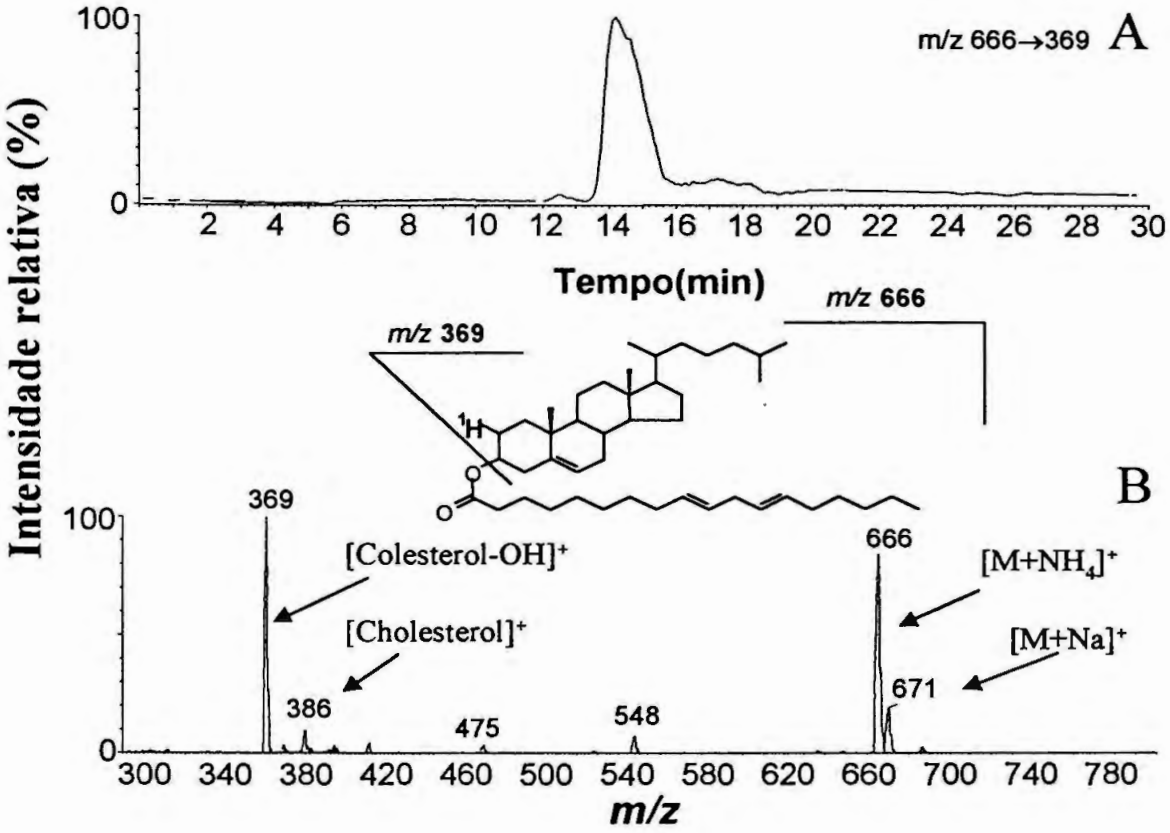

Figura 25: Análise por LC-ESI/MS/MS do Ch18:2 (*m/z* 666) no plasma. (A) Cromatograma da detecção *por MRM* (666→369) $[M+NH4]^+$;(B) espectro de fragmentação MS/MS do íon de *m/z* 666 obtido do pico eluído entre 14-15 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 4.5.1.2.

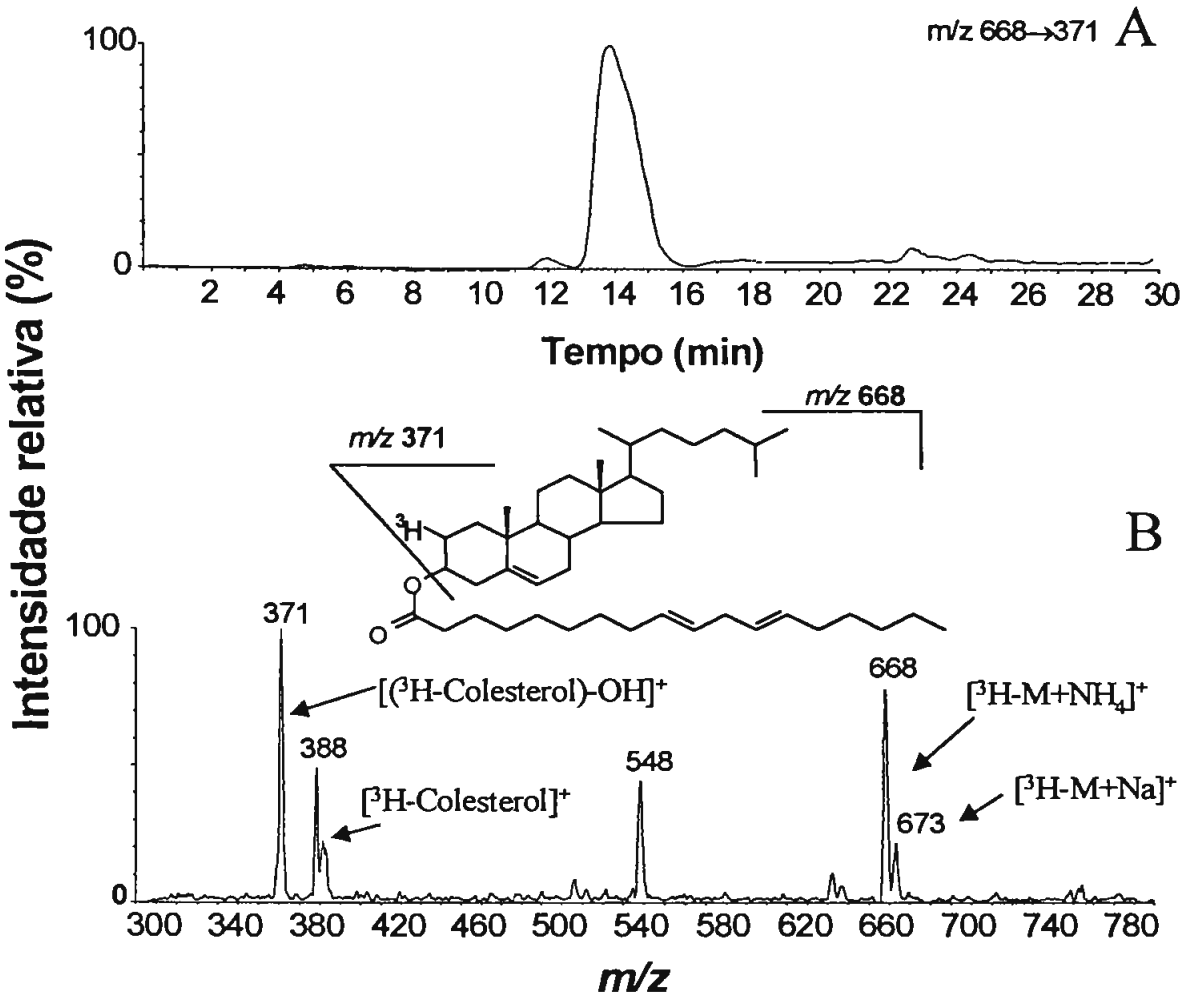

Figura 26: Análise por LC-ESI/MS/MS do Ch18:2 marcado com ^3H (*m/z* 668) adicionado ao plasma. (A) Cromatograma da detecção *por MRM* (668→371) $[M+NH_4]^+$;(B) espectro de fragmentaçao MS/MS do íon de *m/z* 668 obtido do pico eluído entre 14-15 minutos. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 4.5.1.2.

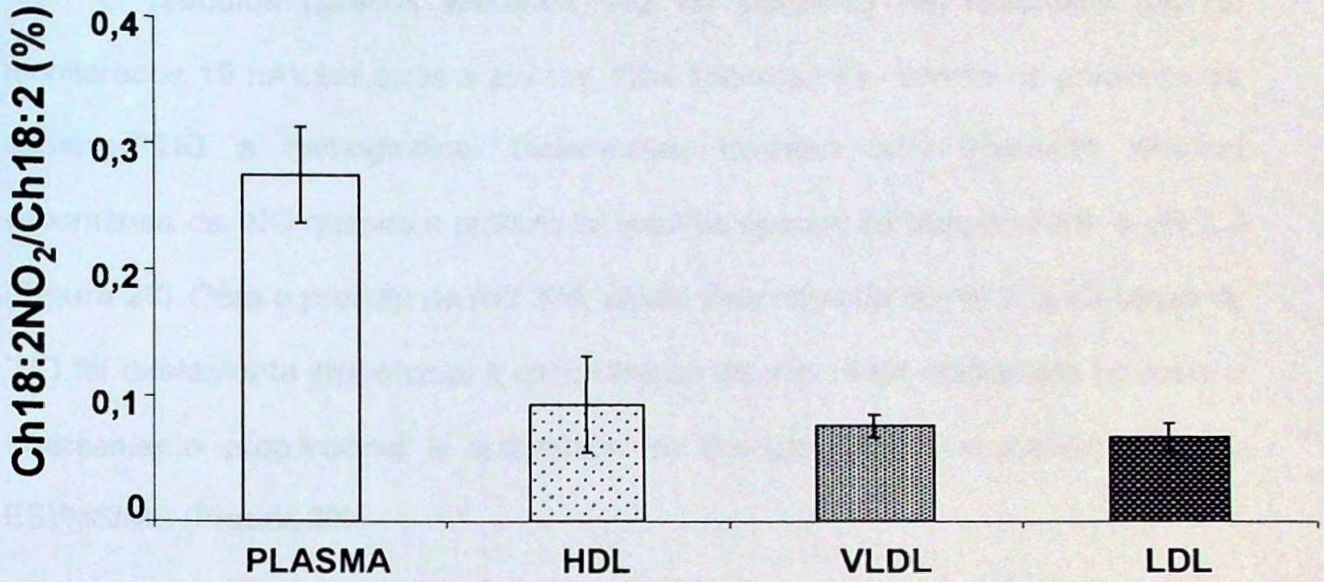

Figura 27: Análise por LC-ESI/MS/MS do nitrolinoleato de colesterol (*m/z* 711) no plasma e nas frações lipoprotêicas de indivíduos normolipidêmicos. Os resultados estão apresentados como proporçao do produto nitrato ($Ch18:2NO_2$) em relação ao Ch18:2. As análises foram realizadas conforme condições experimentais descritas no item 4.5.1.2.

4.8 Caracterização da liberação de •NO pelo lipídios nitrados

4.8.1 Liberação direta detectada por quimiluminescência

O produtos nitrados liberaram •NO na presença de ascorbato quando monitorados 15 minutos após a síntese. Esta liberação foi inibida na presença de carboxy-PTIO e hemoglobina. Observou-se também uma liberação residual expontânea de •NO quando o produto foi mantido apenas no tampão PBS a pH 7,4 (**Figura 28**). Para o produto de *m/z* 324, obtido pela nitração do 18:2, a liberação de •NO foi diretamente proporcinal à concentraçao de ascorbato adicionada no meio e inversamente proporcional à quantidade do produto nitrado analisado por LC-ESI/MS/MS (**Figura 29**).

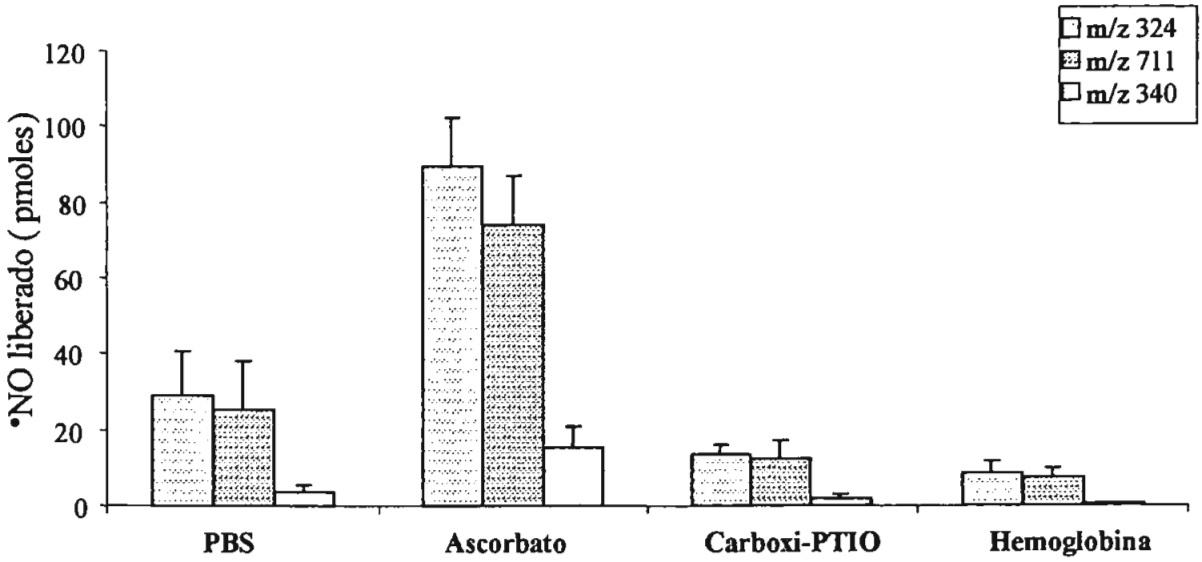

Figura 28: Efeitos do ascorbato (1 mM), do carboxi-PTIO (1mM) e da hemoglobina (0,1%) na liberação de •NO (pmol, media± desvio padrão, n>4), após incubação por 15 minutos dos lipídios nitrados a temperatura ambiente e mantidos em tampão PBS (pH 7.4) contendo 0,5% de SDS.

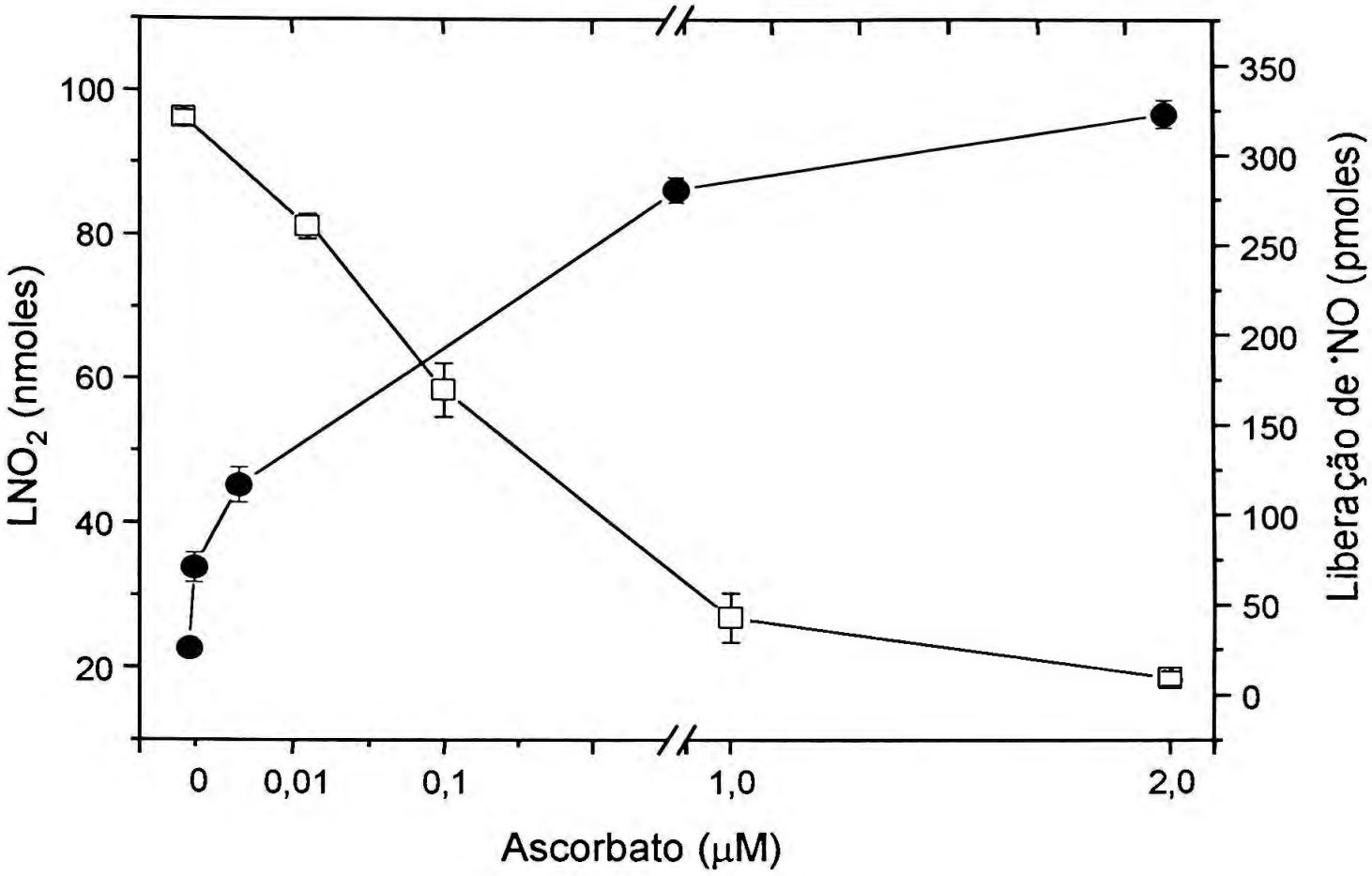

Figura 29: Efeitos da presença de ascorbato (0; 0,01; 0,1; 1 e 2 μmol) na liberação de •NO e no decaimento do nitrolinoleato (%, media ± desvio padrão, n=3) analisado LC/ESI/MS/MS.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

4.8.2 Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica

A incubação do produto da reação do ácido linoléico e do NO_2BF_4 com o captador de spin (Fe^{2+}MGD), após 15 minutos resultou na detecção de um espectro característico do complexo (Fe-•NO-MGD), indicando que o •NO foi liberado e captado pelo complexo Fe^{2+}MGD (**Figura 30B**). Este mesmo resultado foi observado quando o produto nitrado derivado 18:2-OOH e do Ch18:2 foi analisado. O sinal do espectro para ambos os produtos foi intensificado quando a incubação foi realizada na presença de ascorbato (**Figura 30C**). Quando a incubação foi realizada com o produto sintetizado com ^{15}N, um espectro dubleto, contrastando com o tripleto do ^{14}N, foi detectado (**Figura 31**). Isto confirma que o •NO que reagiu com o complexo Fe^{2+}MGD foi aquele proveniente do NO_2BF_4 ou do nitrito utilizado na síntese e não de uma fonte de contaminação. A incubação do LNO_2 com carboxi-PTIO gerou um expectro característico do complexo Carboxi-PTIO-•NO, contudo observou-se um consumo do carboxi-PTIO durante o procedimento de incubação (**Figura 32**). Também, quando o LNO_2 foi incubado na presensa de DBNBS, houve a formação de um espectro *sexteto*, característico da presença de um complexo DBNBS-•CHO (**Figura 33**)

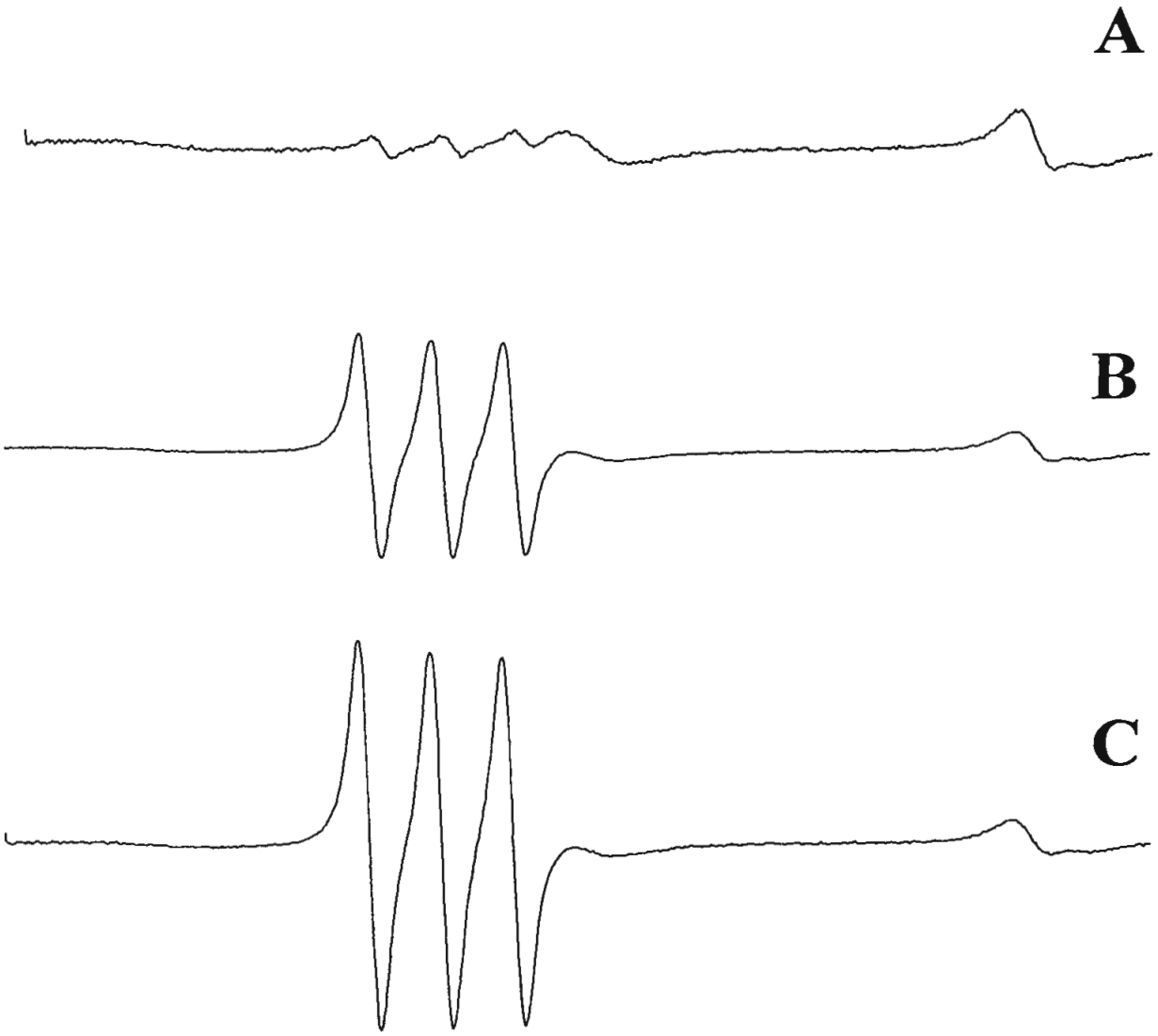

Figura 30 : Espectros obtidos por RPE do LNO_2 após a incubação por 15 min com 0,5 mM de $Fe(II)MGD_2$, a pH 7,4 e temperatura ambiente: (**A**) controle da reação, (**B**) produto da reação do 18:2 com o NO_2BF_4, (**C**) produto da reação do 18:2 com o NO_2BF_4 adicionando-se ascorbato.

Figura 31: Espectros obtidos por RPE do LNO_2 após a incubação por 15 min com 0,5 mM de Fe(II)MGD_2, a pH 7,4 e temperatura ambiente: (**A**) controle da reação, (**B**) produto da reação do 18:2 com ^{15}N-nítrito em meio ácido.

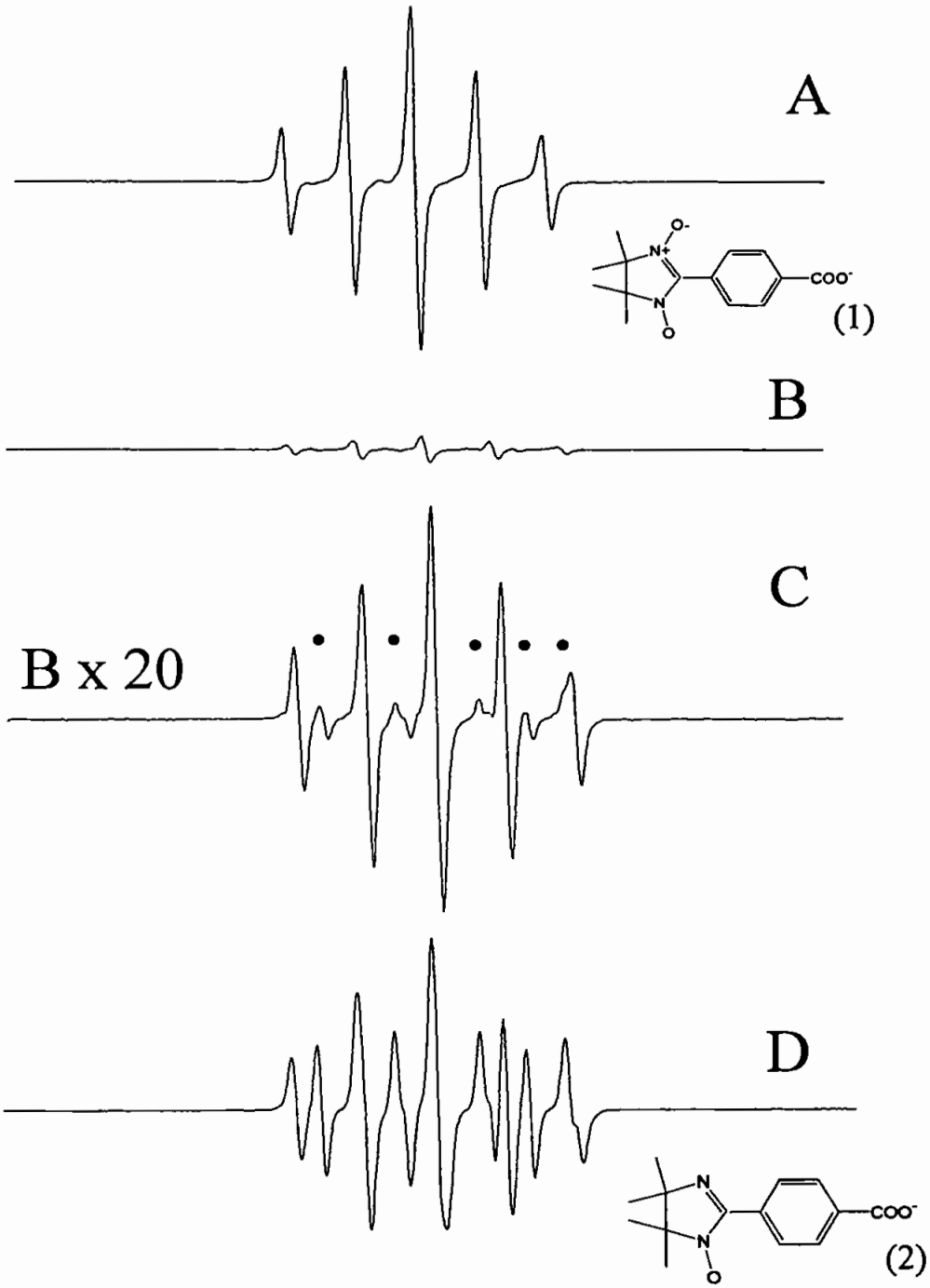

Figura 32: Espectros de RPE de incubações de Carboxy-PTIO (0.5 mM) (**A**) com nitrolinoleato (10 mM). Após 2 min (**B**) 30 min (**C**); B ampliado 20 vezes (**D**). O espectro **E** refere-se ao Carboxy-PTIO exposto a um fluxo de ·NO produzido incubando-se NO_2^- com HCl (concentrado). A fase gasosa desta incubação foi arrastada com argônio e borbulhada através de uma solução contendo (1).As componentes visíveis no espectro (C) estão marcadas (•).

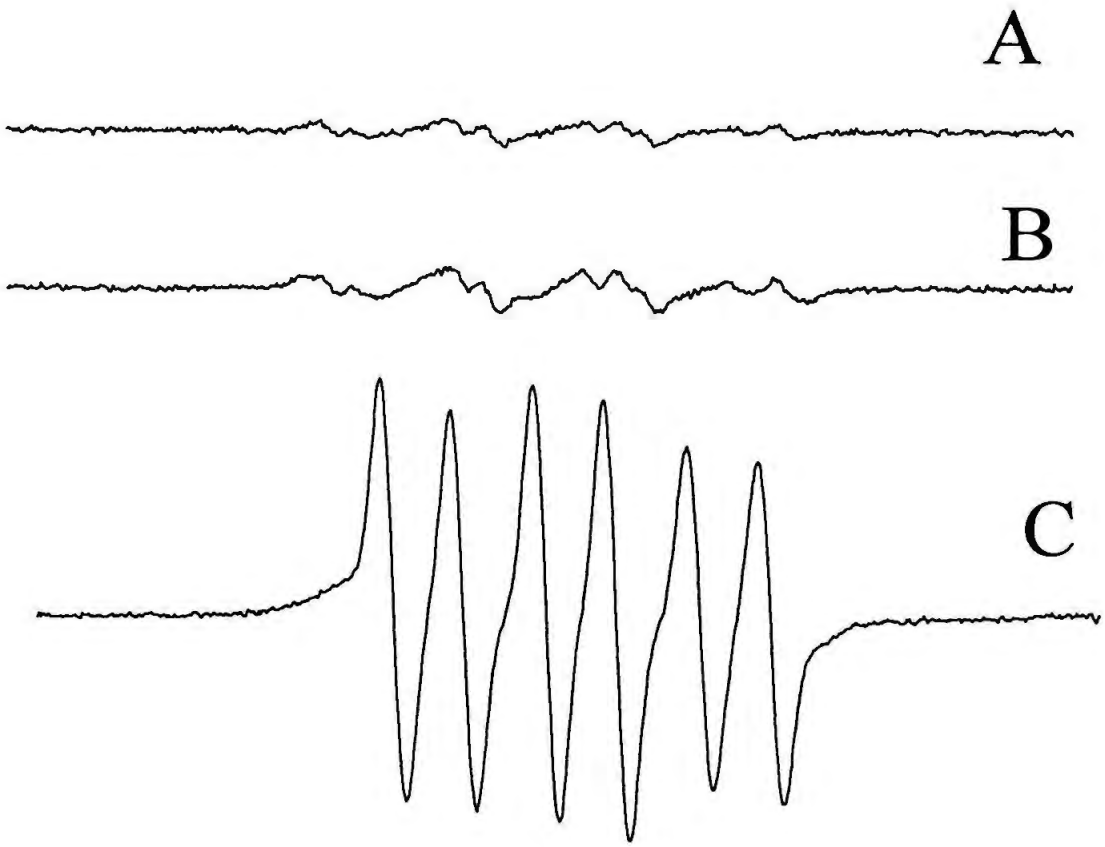

Figura 33. Espectros de RPE de adutos de DBNBS (10 mM) (**A**). Incubação de DBNBS (10 mM) em tampão fosfato (pH 7.4; 125 mM) à temperatura ambiente, sob agitação, por 5 minutos em presença de oxigênio com ácido linoleico (**B**) ou LNO_2 (10 mM) (**C**).

4.8.3 Efeito de relaxamento em anéis aórticos de ratos

Tanto os produtos nitrados sintetizados derivados do ácido linoléico (LNO_2) e do seu hidroperóxido (LNO_2OH), quanto aquele derivado do Ch18:2, causaram relaxamento em anéis aórticos de ratos, pré-contraídos com norepinefrina (3×10^{-7} M). Este relaxamento também ocorreu quando o endotélio foi retirado por fricção mecânica (**Figuras 34-36**). O vasorelaxamento foi inibido na presença de ODQ, um inibidor da guanilato ciclase solúvel (**Figura 37**). Adicionalmente, controles feitos com os reagentes utilizados na síntese como os lipídios, o nitrito e o NO_2BF_4, não causaram nenhum efeito sobre o relaxamento.

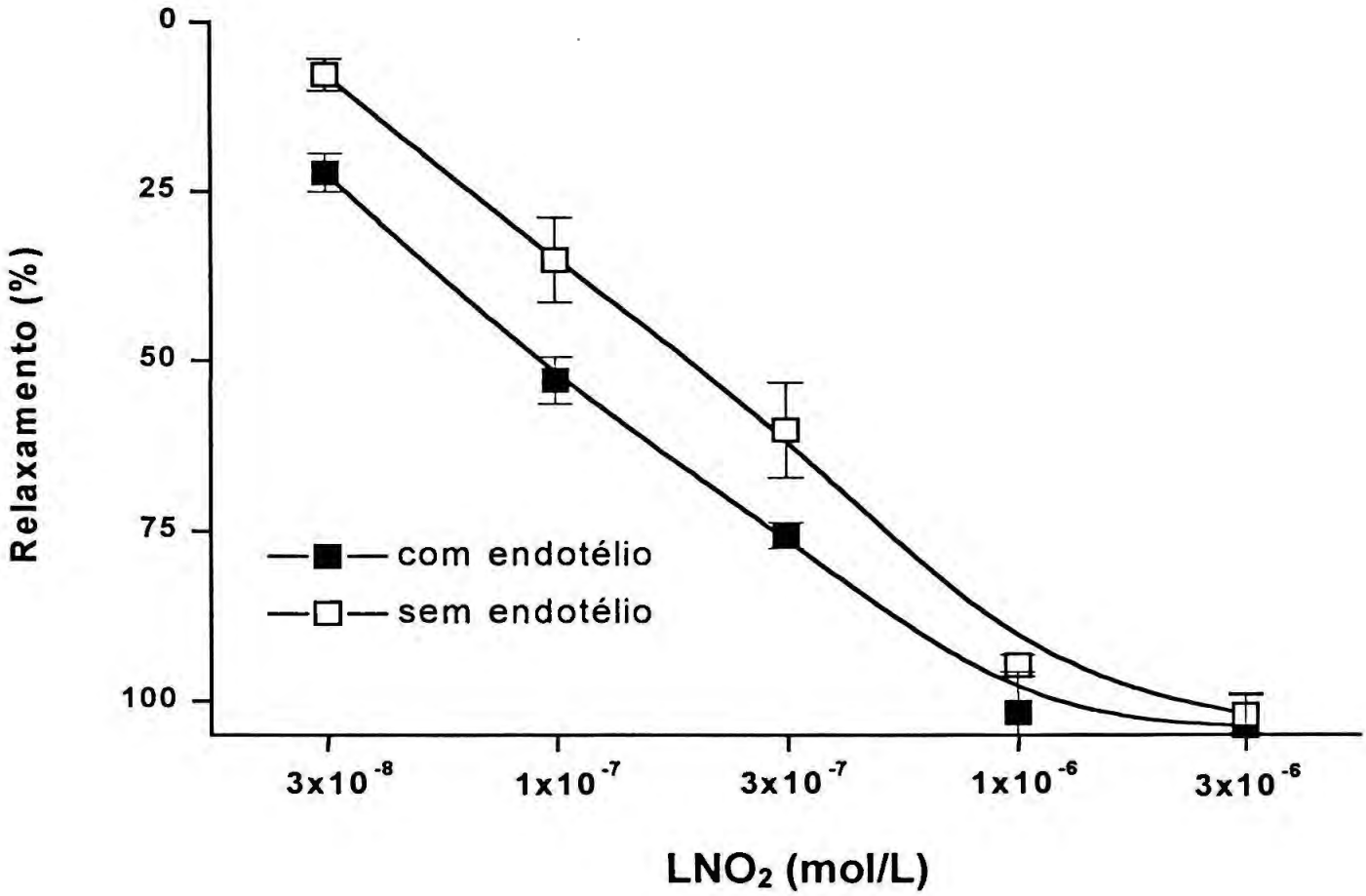

Figura 34: Efeito do produto da nitração do 18:2 (LNO_2) no relaxamento de anéis aórticos de ratos (n=4) pré-contraídos com norepinefrina (3×10^{-7}M), tanto na presença e quanto na ausência do endotélio.

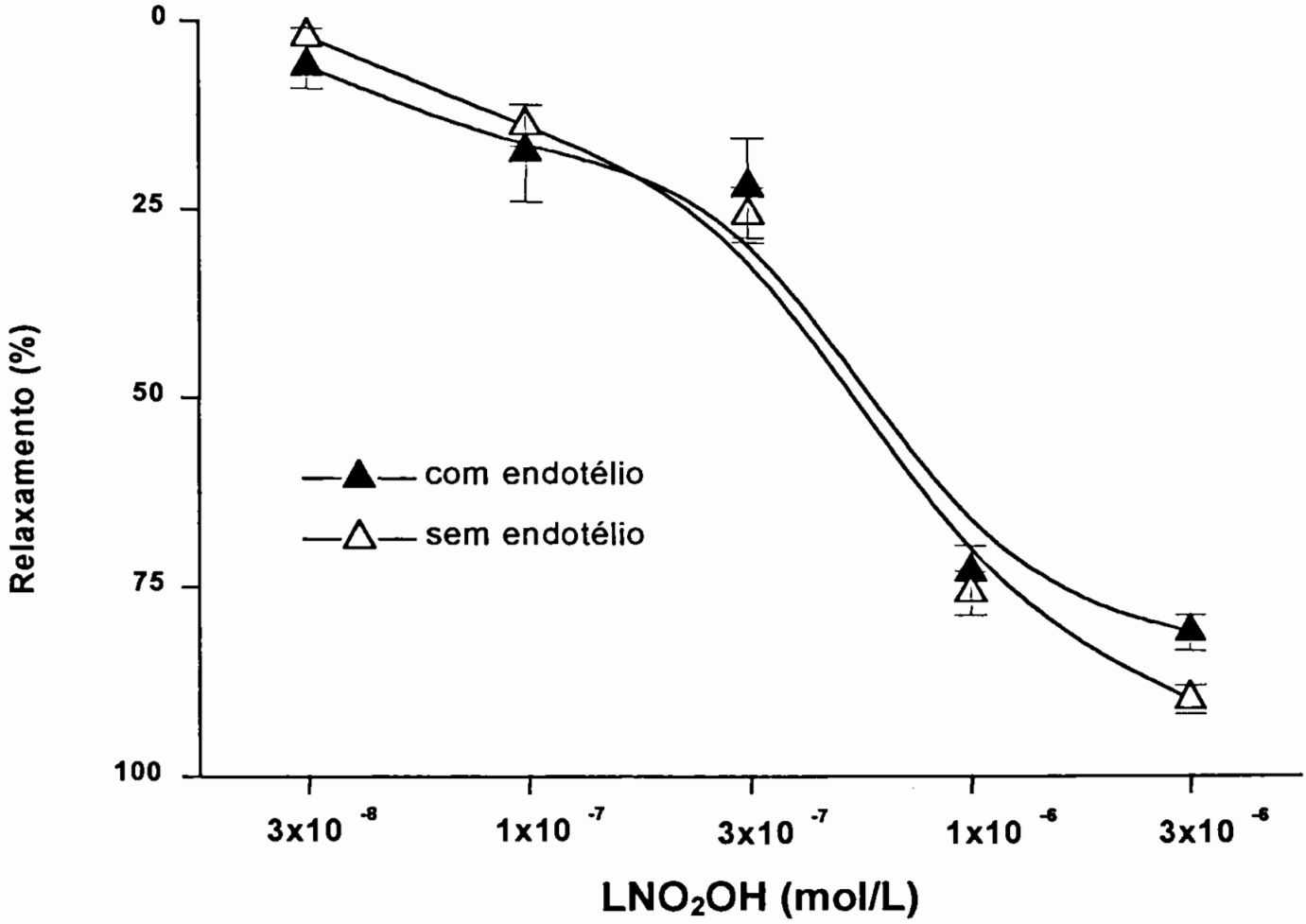

Figura 35: Efeito do produto da nitração do 18:2-OOH (LNO_2OH) no relaxamento de anéis aórticos de ratos (n=4) pre-contraídos com norepinefrina (3×10^{-7}M), tanto na presença e quanto na ausência do endotélio.

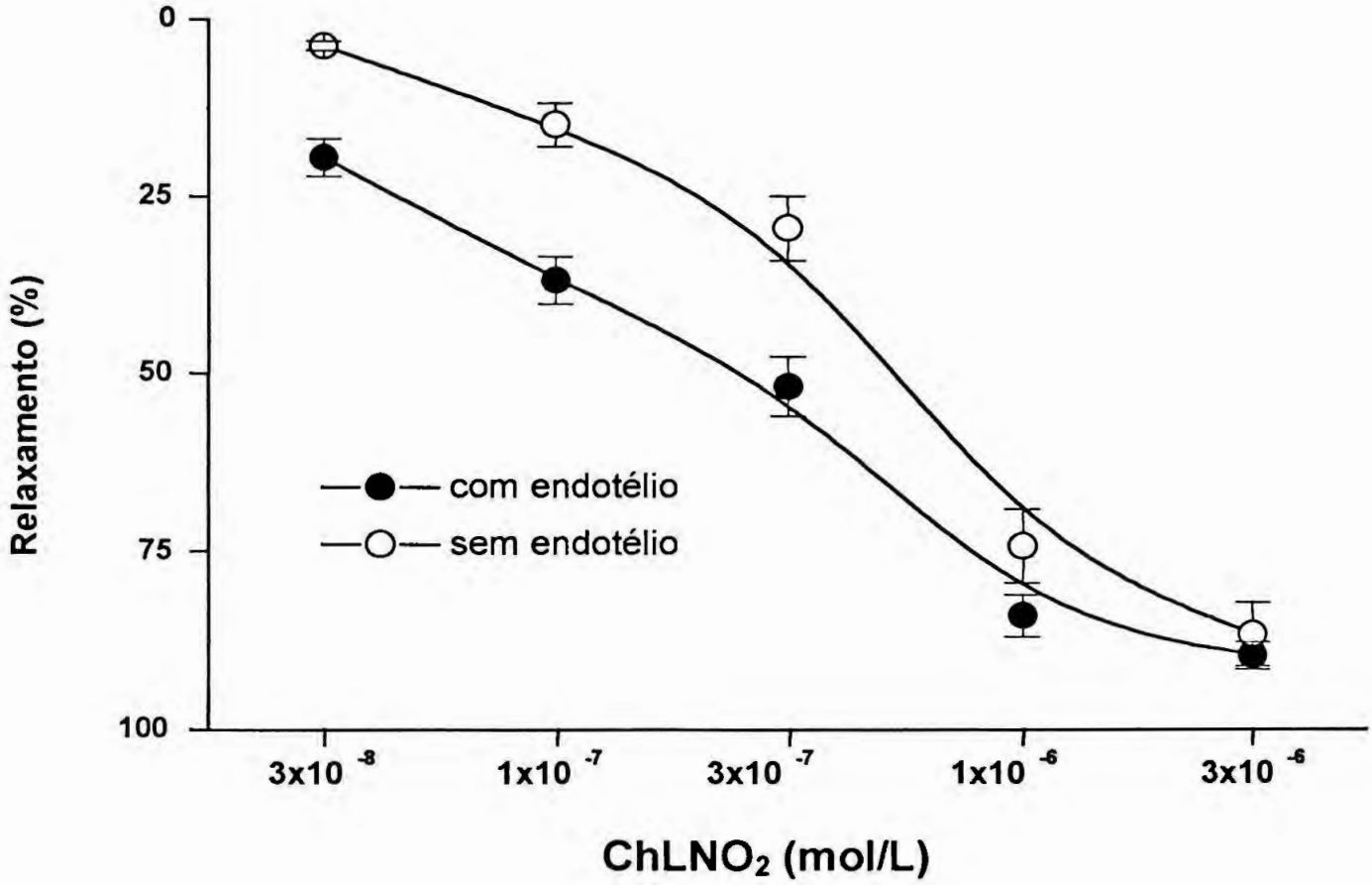

Figura 36: Efeito do produto da nitração do Ch18:2 ($ChLNO_2$) no relaxamento de anéis aórticos de ratos (n=4) pré-contraídos com norepinefrina (3×10^{-7}M), tanto na presença e quanto na ausência do endotélio.

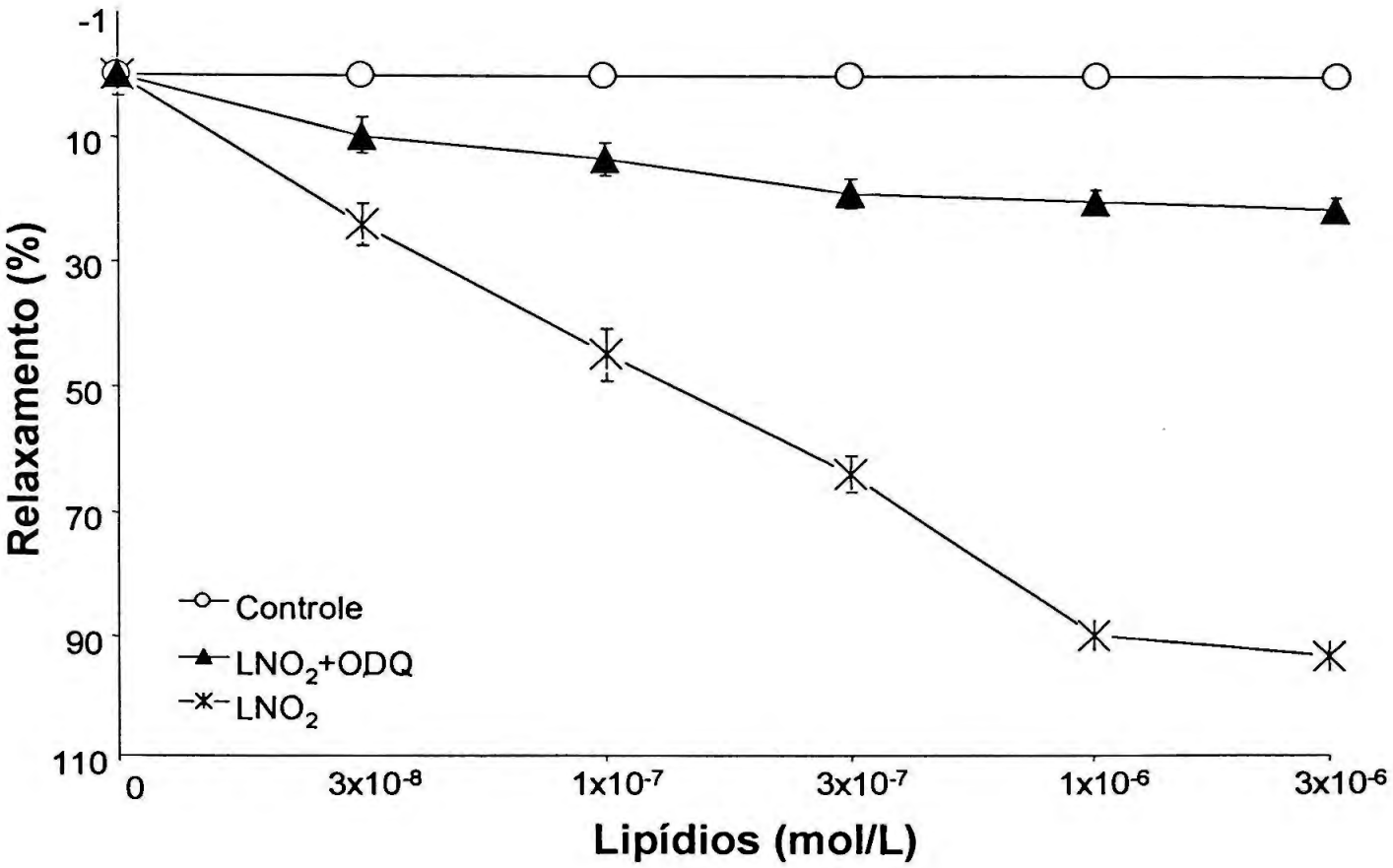

Figura 37: Efeito do ODQ no relaxamento induzido pelo produto da nitração do 18:2 (LNO_2), em anéis aórticos de ratos com endotélio (n=4) pré-contraídos com norepinefrina.

Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Síntese, caracterização e detecção no plasma dos lipídios nitrados derivados do 18:2

A reação do 18:2-OOH com nitrito de sódio gerou um produto principal com íon molecular de *m/z* 340, eluindo em aproximadamente 6,5 minutos e apresentando como fragmento principal um íon de *m/z* 46. Além disso, quando esta síntese foi realizada com nitrito de sódio marcado isotopicamente com [^{15}N], um produto de *m/z* 341, apresentando um íon principal de *m/z* 47 foi gerado, eluindo no mesmo tempo de retenção daquele produto de *m/z* 340. Quando o 18:2-OOH foi tratado com NO_2BF_4 um produto de *m/z* 340, com características similares às daquele produto sintetizado com nitrito, foi observado. Isto fortemente poderia sugerir a formação de produtos como LOONO, $LONO_2$ ou $L(O)NO_2$, uma vez que a reação de um LO$^{\bullet}$ formado com $^{\bullet}NO_2$, poderia gerar estes produtos conforme previamente descrito (D'ISCHIA, REGA,& BARONE, 1999; O'DONNELL *et al.*, 1999;). Apesar disso, as análises de caracterização química demonstraram que o principal produto formado nesta reação era o nitro-hidroxilinoleato (LNO_2OH), conforme também anteriormente descrito para a reação do 18:2-OOH com nitrito (NAPOLITANO *et al.*, 2002).

A confirmação da estrutura do produto de *m/z* 340 foi realizada por ^{15}N-RMN onde este apresentou um pico a 375,9 *ppm,* relativo à ligação do grupo nitro diretamente na cadeia carbônica. Esta evidência foi confirmada nas análises de absorção no infravermelho onde duas novas bandas de absorção em 1553 e 1374 cm^{-1}, referentes à presença do nitro ligado ao carbono, foram observadas. A presença do grupo hidroxila ligado à cadeia carbônica foi confirmada pela presença de outra banda absorvendo na região de 3400 cm^{-1}, que é a região onde o grupo

hidroxila absorve fortemente (SILVERSTEIN *et al.,* 1991). Nenhuma banda de absorção ocorreu na região onde nitratos ou grupos nitrosos normalmente absorvem (1640-1620) ou na região de 877-830 cm^{-1}, característica da presença de grupos epóxidos (SILVERSTEIN *et al.,* 1991). Estes dados sugerem fortemente que o principal produto sintetizado a partir da reação 18:2-OOH com o nitrito em meio ácido, é o nitrohidroxilinoleato (LNO_2OH). Apesar do LNO_2OH ter sido detectado como produto principal, outros produtos de menor rendimento na reação também puderam ser detectados como o nitrosolinoleato (*m/z* 308), nitronitrosolinoleato (*m/z* 357) e nitro-hidroperoxilinoleato (*m/z* 356). A reação do NO_2BF_4 com 18:2-OOH também gerou um produto de *m/z* 340 com as mesmas características do LNO_2OH.

A reação do 18:2 com o NO_2BF_4 gerou um produto principal de *m/z* 324. Este produto apresentou como fragmento principal um íon de *m/z* 46. Um íon de *m/z* 306, característico da perda de água e outro de *m/z* 277, relativo à perda do grupo nitro, também foram observados. Quando a reação foi realizada com nitrito de sódio em meio ácido, uma pequena quantidade do produto de *m/z* 324 também foi gerada. A presença do grupo nitro na molécula foi confirmada quando a reação foi realizada com nitrito marcado isotopicamente com ^{15}N. Esta reação resultou na geração de um produto de *m/z* 325 que se fragmentou em um íon principal de *m/z* 47, característico da presença do grupo ^{15}N-nitro no íon pai. Os dados da análise de infravermelho auxiliaram na elucidação da estrutura do composto formado. Nesta análise o produto apresentou duas novas bandas de absorção a 1552 e 1373 cm^{-1}, características da presença do grupo nitro ligado diretamente ao carbono (SILVERSTEIN *et al.,* 1991), enquanto bandas na região de 1600 a 1680 cm^{-1}, onde

os grupos nitrosos e os nitratos normalmente absorvem (SILVERSTEIN *et al.,* 1991) não foram observadas.

Após estas análises chegamos à conclusão de que o principal produto formado nesta síntese foi o nitrolinoleato (LNO_2), conforme anteriormente descrito (O'DONNELL *et al*, 1999; NAPOLITANO *et al*, 2001). O LNO_2 também foi sintetizado quando o 18:2 foi tratado com peroxinitrito em pH 7,4, demonstrando claramente a possibilidade da formação deste produto *in vivo*. Na reação do 18:2 com NO_2BF_4 nenhum produto de oxidação foi observado, contudo um produto secundário de *m/z* 308, de massa característica do nitrosolinoleato (LNO) foi observado com um rendimento de aproximadamente 10% em relação ao LNO_2 formado. Este produto (*m/z* 308) foi gerado majoritariamente pela reação do $NOBF_4$ com 18:2, confirmando o mecanismo de reação pela adição do NO^+ ao 18:2 para formação do produto nitrosilado (LNO), assim como a adição do NO_2^+ para a formação no produto nitrado (LNO_2).

Apesar dos procedimentos de purificação por TLC e separação por HPLC, ao analisarmos por LC-ESI/MS/MS, observamos que os produtos de *m/z* 324 e 308 eluíram no mesmo tempo de retenção. Também, não foi possível a separação dos compostos por HPLC. A otimização dos sistemas de separação e purificação, como uso de colunas quirais para separação de isômeros, seria provavelmente uma maneira possível de separar os compostos. No entanto, o isolamento destes produtos pode ser difícil devido à instabilidade química destes compostos, o que dificultaria a concentração do produto isolado para análises posteriores. Este isolamento seria muito importante para o estudo de possíveis atividades biológicas destes produtos *in vivo*. Também, apesar de nossa significante contribuição na

elucidação das estruturas desses produtos nitrados, não foi possível determinar a posição exata onde ocorrem a nitração ou a nitrosilação. É provável que diversos isômeros possam ser formados durante a síntese, principalmente a nitração nas posições C_9, C_{10}, C_{12} e C_{13}, além da formação de isômeros *cis e trans*. Neste sentido, seria importante estabelecer métodos que pudessem separar e quantificar estes diferentes isômeros formados, considerando-se que isto é biologicamente relevante e sabendo-se das diferentes ações de isômeros de ácidos graxos em sistemas biológicos (EVANS *et al.*, 2002; BANNI *et al.*, 2002, ALBERS *et al.*, 2003).

Os produtos derivados do 18:2 puderam ser detectados no plasma um mês após a coleta, quando congelados a -80 °C. Contudo, após sete dias, congelados a –20 ° C, houve cerca de 50 % de decaimento. O LNO_2OH se mostrou mais instável do que o LNO_2. Esta instabilidade pode estar relacionada à presença do grupo hidroxila na molécula, o que facilitaria a perda do grupo nitro (BALAZY *et al.*, 2001). Quando os padrões sintetizados foram adicionados ao plasma, observou-se decaimento semelhante àquele obtido nas análises feitas somente com o plasma, sugerindo que haja algum fator plasmático a considerar contribuindo para a instabilidade destes compostos. Ambos os produtos foram mais estáveis quando mantidos a –70 °C do que a 4 °C. Os produtos também foram mais estáveis quando mantidos em isopropanol do que quando adicionados ao plasma, sugerindo que pode estar ocorrendo hidrólise, conforme anteriormente descrito (EISERICH *et al.*, 1998). Estes resultados são extremamente importantes no delineamento de experimentos nos quais se pretenda comparar a concentração plasmática ou tecidual destas substâncias entre diferentes grupos de indivíduos, ou no estudo de suas atividades biológicas. No presente trabalho, para a realização dos

experimentos nos quais se comparou o nível dos produtos nitrados nos indivíduos normo e hiperlipidêmicos, as amostras de sangue foram colhidas no mesmo dia das análises para evitar as perdas devido ao efeito do decaimento.

Outro fator importante que possibilitou a detecção dos produtos derivados do 18:2 no plasma foi a otimização do sistema de extração. Utilizando os métodos convencionais de extração de ácidos graxos livres no plasma (MEHTA *et al.,* 1998) não obtivemos níveis adequados de recuperação dos produtos nitrados, apesar do padrão interno (um ácido graxo saturado) ser recuperado em quase sua totalidade. Deduzimos então, baseando-nos também pelo perfil de separação cromatográfica, que os produtos nitrados possuíam polaridade diferente do seu respectivo ácido graxo, o que poderia estar alterando a taxa de recuperação para a fase orgânica normalmente utilizada (heptano-isopropanol). Em decorrência disto, fez-se necessário estudar outros métodos que melhorassem e eficiência da extração com a maior recuperação dos compostos nitrados.

O método com o qual obtivemos os melhores resultados foi aquele no qual o plasma foi tratado com metanol acidificado e éter dietílico, segundo modificação de outro método anteriormente descrito (O'DONNELL *et al.*, 1999b). A acidificação do meio é essencial para a liberação do ácido graxo ligado à albumina, seu transportador no plasma (STORCH & THUMSER, 2000), aumentando o rendimento da extração, tendo em vista que em pH ácido a solubilidade de ácidos graxos na água é menor (PUTTMANN *et al.*, 1993). Com este método pudemos obter boas taxas de recuperação dos produtos nitrados do 18:2 o que possibilitou sua detecção no plasma. Para mostrar que os produtos detectados não estavam sendo gerados em decorrência do pH ácido utilizado durante a extração, experimentos foram

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

conduzidos em pH neutro mostrando que mesmo assim ambos os produtos puderam ser detectados no plasma.

Apesar dos compostos detectados no plasma serem compatíveis com as massas dos produtos LNO_2 e LNO_2OH, é possível que produtos com diferentes grupos de orientações da nitração estejam presentes *in vivo* (PRYIOR *et al.,* 1982; HUIE, 1994; MODIN *et al.,* 2001). Como a espectrometria de massa não consegue fazer distinção entre estes grupos, haja vista que ambos os produtos apresentam a mesma massa molar, é possível que no plasma as duas orientações de nitração (-NO_2 e -ONO) estejam presentes. Outra possibilidade é a degradação dos nitrito-lipídios (LONO), por exemplo, por transnitrosação na presença de metanol, durante o procedimento de extração da amostra ou purificação dos produtos sintetizados.

Quando comparados os níveis de LNO_2 e LNO_2OH, em indivíduos normo e hiperlipidêmicos, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, *teste T*) entre os grupos. Comparativamente, indivíduos normolipidêmicos apresentam níveis mais baixos destas substâncias em relação aos hiperlipidêmicos.Vários fatores poderiam estar contribuindo para o aumento destas substâncias nos indivíduos hiperlipidêmicos: (i) aumento da produção de ROS (JIRA *et al*, 1998; MORIEL *et al*, 1999; NOUROOZ-ZADEH *et al*, 2001); (ii) diminuição da concentração de antioxidantes lipossolúveis, principalmente alfa-tocoferol (SIMON *et al*, 1997; TONSTAND & AKSNES, 1997; TSAO & COOKE, 1998) e (iii) aumento da produção de $^{\bullet}NO$ (NAKASHIMA *et al.*, 1996; RAHMAN, VAGGHESE, MOORHEAD, 2001). Todos estes fatores podem estar agindo de modo favorável à formação de produtos como $LONO/LNO_2$ ou LNO_2OH.

Apesar de não termos dados exatos a respeito da concentração destes produtos, considerando-se a equivalência da área no cromatograma, observamos que os níveis de LNO_2 (*m/z* 324), que seriam principalmente indicadores da atividade antioxidante do $^{\bullet}NO$, são muito mais elevados do que os de LNO_2OH (*m/z* 340), que preferencialmente indicariam estresse oxidativo ou um *footprint* da formação de peroxinitrito (RUBBO, DARLEY-USMAR & FREEMAN, 1996). Apesar destes dados também poderem significar diferentes graus de estabilidade destes produtos *in vivo*, isto já nos dá uma idéia de que as duas reações podem ocorrer no organismo dependendo da presença de peroxinitrito e outros oxidantes e antioxidantes no local da reação. Assim, os resultados obtidos, os controles sobre as possíveis formações de artefatos e a reprodutibilidade das análises, tornam inequívocas as provas da presença do LNO_2 e LNO_2OH *in vivo*, o que até o então não havia sido descrito.

5.2 Síntese, caracterização e detecção no plasma e nas lipoproteínas dos lipídios nitrados derivados do Ch18:2

A reação do Ch18:2 com NO_2BF_4 gerou um produto principal com um íon molecular de *m/z* 711 quando analisado por LC-ESI/MS/MS, característico de um aduto de amônio $[M+NH_4]^+$ do nitrolinoleato de colesterol. O espectro de fragmentação deste produto revelou um íon característico de *m/z* 369, relativo ao grupo colesteril $[Colesterol\text{-}OH]^+$, como anteriormente reportado (HAFIDI *et al.*, 1999). Isto indica que a nitração do Ch18:2 ocorreu na cadeia carbônica e não no anel esteróide. Este mesmo produto foi obtido quando o Ch18:2 foi tratado com nitrito de sódio em meio ácido em condições aeróbias. O produto da síntese com o NO_2BF_4 foi usado para a realização dos experimentos de caracterização química por

causa do melhor rendimento obtido nesta reação quando comparada com a reação realizada com nitrito.

A caracterização da estrutura química do produto da nitração do Ch18:2 foi realizada por espectrometria de massa através da reação do Ch18:2 com nitrito marcado isotopicamente com [^{15}N]. Nestas condições um produto principal detectado como íon de *m/z* 712, apresentando as mesmas características cromatográficas, espectrométricas e isotópicas do produto sintetizado com NO_2BF_4 (*m/z* 711) foi observado. O perfil de abundância isotópica deste produto confirma que o espectro obtido se refere ao de um composto contendo aproximadamente 50 carbonos que é o caso do Ch18:2. O aumento de uma unidade de massa com a utilização do nitrito marcado com [^{15}N] indica que o composto sintetizado apresenta um átomo de nitrogênio por molécula o que é compatível com a estrutura do nitrolinoleato de colesterol. Esta evidência foi reforçada pela análise de infravermelho do produto nitrato que mostrou novas bandas de absorção em 1549 e 1373 cm^{-1}, correspondentes à ligação do grupo nitro diretamente à cadeia carbônica (SILVERSTEIN *et al.,* 2001). Estes resultados mostram claramente que o principal produto formado na síntese é o nitrolinoleato de colesterol ($ChLNO_2$), o qual pelo nosso conhecimento foi pela primeira vez sintetizado e caracterizado quimicamente. Não foi possível determinar a posição exata do grupo nitro na cadeia carbônica, tendo em vista que as condições cromatográficas não estavam padronizadas para a separação de isômeros desta natureza. Assim, é possível que uma mistura de isômeros seja formada durante a síntese como, por exemplo, C_9, C_{10}, C_{12}, ou C_{13} nitro-alquil ou isômeros *cis-trans*.

Os mecanismos de reação das sínteses realizadas com nitrito ou NO_2BF_4 são diferentes. Quando a síntese é realizada com o NO_2BF_4 a nitração ocorre pela adição do íon nitrônio (NO_2^+) na insaturação da cadeia carbônica do ácido graxo (NAPOLITANO *et al.*, 2000). Na reação com o nitrito, a nitração ocorre quando o $^{\bullet}NO_2$, formado pela acidificação do nitrito na presença de oxigênio, abstrai um átomo de hidrogênio da dupla ligação do ácido graxo formando um radical alquil que se estabiliza por ressonância. Este radical reage com outra molécula de $^{\bullet}NO_2$ formando um nitrolipídio (GIAMALVA *et al.*, 1987; MARIEQ & SZENTE, 1996). *In vivo,* a nitração de lipídios provavelmente ocorre por um mecanismo mediado por radicais, uma vez que o $^{\bullet}NO_2$ pode ser gerado em diversos sistemas biológicos como, por exemplo, na oxidação do nitrito mediada por peroxidases (VAN DER VLIET *et al.,* 1997; BYUN *et al.,* 1999; CARR *et al.,* 2000). O $^{\bullet}NO_2$ também pode ser gerado em outras condições, como por exemplo, nos estados inflamatórios, no compartimento gástrico e nas vesículas fagocíticas dos neutrófilos (O'DONNELL *et al.*, 1999a).

Foi possível detectar no plasma e nas frações lipoprotéicas de indivíduos normolipidêmicos por LC-ESIMS/MS, a presença de produtos com íon molecular de *m/z* 711 com as mesmas características cromatográficas e espectrométricas do Ch18:2NO_2 sintetizado. Uma possível nitração artefactual que poderia ocorrer durante o procedimento de extração da amostra foi excluída quando um isótopo do Ch18:2 marcado radioativamente com ^3H foi adicionado ao plasma antes da extração e nenhum produto nitrado do Ch18:2 marcado foi observado.

Pequenas diferenças observadas nos espectros de fragmentação das amostras biológicas, em relação ao do padrão sintetizado, podem ser explicadas pela presença de diferentes isômeros presentes *in vivo*. Na mesma análise também

foi detectada a presença de um produto com *m/z* 666 característico do aduto de amônio do Ch18:2, que apresentou um fragmento principal de *m/z* 369 característico do grupo colesterol, como previamente descrito (HADIFI *et al.*, 1999). O Ch18:2 foi escolhido como alvo na investigação da nitração *in vivo* por ser o éster de colesterol predominante na LDL e o mais susceptível a uma possível oxidação/nitração *in vivo* (SPITELLER & *SPITELLER*, 1998), considerando-se que a presença de uma dupla ligação é uma condição primordial para o ataque do $^{\bullet}NO_2$, que promoverá a nitração (GIAMALVA *et al.*, 1987).

A presença destes lipídios nitrados na LDL pode ser um indicador do papel antioxidante do $^{\bullet}NO$ durante o processo de lipoperoxidação, como anteriormente reportado em sistemas *in vitro* (YATES *et al.*, 1992; HAYASHI *et al.*, 1995; Rubbo *et al.*, 1995), indicando que a participação do $^{\bullet}NO$ na lipoperoxidação deve ser importante *in vivo*. Isto ocorre principalmente devido à sua hidrofobicidade, o que propicia sua fácil difusão na membrana lipídica celular ou núcleo lipídico da LDL, promovendo aumento de sua concentração local (DENICOLA *et al.*, 2002). Esta propriedade aumenta significativamente a eficiência do $^{\bullet}NO$ em inibir a lipoperoxidação. Lipídios nitrados também podem se formar *in vivo* e em microcompartimentos onde a taxa de autoxidação do $^{\bullet}NO$ é alta ou existe alta concentração de nitrito associada com baixo pH (O'DONNEL *et al.*, 1999a; NAPOLITANO *et al.*, 2002).

5.3 Liberação de óxido nítrico e efeito de vasorelaxamento

As análises de liberação de $^{\bullet}NO$ por quimiluminenscência mostraram que os três produtos sintetizados liberaram $^{\bullet}NO$ espontaneamente e na presença de ácido

ascórbico. Estes resultados estão de acordo com os dados recentemente publicados para um derivado nitrohidroxilado do ácido araquidônico (BALAZY *et al.*, 2001). Nitritos orgânicos também são capazes de liberar •NO espontaneamente ou na presença de indutores (CEDERQVIST *et al.*, 1994; ARTZ & THATCHER, 1998; HOMER & WANSTALL, 1998; ZAVORIN *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002).

A liberação de •NO foi aumentada na presença de quantidades crescentes de ácido ascórbico e inibida na presença de hemoglobina e carboxi-PTIO. A inibição causada pela hemoglobina está relacionada à propriedade do •NO de se ligar ao grupo heme desta molécula, formando o complexo nitrosil-hemoglobina (GOW *et al.*, 1999), o que tem sido identificado por várias metodologias incluindo técnicas espectrofotométricas e de RPE (SHARMA & RANNEY, 1978; WAJNBERG *et al.*, 1992; HAROLD HEROLD & REHMANN, 2003; HEROLD & ROCK, 2003). O carboxi-PTIO é uma molécula que tem a propriedade de ligar-se diretamente ao •NO e assim inibir a sua disponibilidade e tem sido usada em sistemas onde a inibição do •NO é requerida (PFEIFFER *et al.*, 1997).

O aumento da liberação de •NO observado na presença de ascorbato pode estar relacionado à sua propriedade de gerar •NO a partir da redução do nitrito (MODIN *et al.*, 2001), ou por um mecanismo semelhante àquele observado para os nitrosotióis como esquematizado nas reações **A** e **B** da **Figura 37**, respectivamente. No último caso, o ascorbato na sua forma aniônica, como é predominantemente encontrado no plasma, é capaz de reagir com o nitrosotiol formando um radical ascorbil e promover a liberação do •NO (SINGH *et al.*, 1996; SCORZA *et al.*, 1997; MAY, 2000). No caso dos produtos nitrados sintetizados, apesar dos experimentos de IV e RMN terem indicado a presença predominante do grupo nitro ligado

diretamente à cadeia carbônica formando um nitrolipídio (RNO_2), é possível que em solução o grupo nitro ($-NO_2$) e o nitrito (-ONO) estejam em equilíbrio (HUIE, 1994; ;NGUYEN *et al*, 1998; MODIN *et al.*, 2001;). Isto ocorre devido à densidade eletrônica do $^{\bullet}NO_2$, fazendo com que este se ligue à cadeia carbônica pelo oxigênio ou pelo nitrogênio por reações de adição ou abstração de um elétron (PRYOR, LIGHTSEY & CHURCH, 1982; HUIE, 1994; AUGUSTO *et al.*, 2002).

Assim, nos sistemas utilizados para verificação da liberação de $^{\bullet}NO$, um nitrito lipídio (RONO), deve estar presente em equilíbrio com o nitrolipídio (RNO_2) (GIAMALVA *et al.*, 1987). Assim, o ácido ascórbico então poderia liberar o $^{\bullet}NO$, a partir do RONO, gerando um hidróxido lipídico por um mecanismo semelhante àquele dos nitrosotióis (**Figura 37, reação C**). Este mecanismo também explicaria a liberação espontânea de $^{\bullet}NO$ observada nos diversos sistemas utilizados no presente estudo. A liberação ocorreria após clivagem homolítica do LONO havendo a geração de um radical alquila ou alcoxila, juntamente com o $^{\bullet}NO$ liberado. Mecanismo semelhante foi descrito para a liberação de $^{\bullet}NO$ a partir da nitro-glutationa (BALAZY *et al.*, 1998).

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

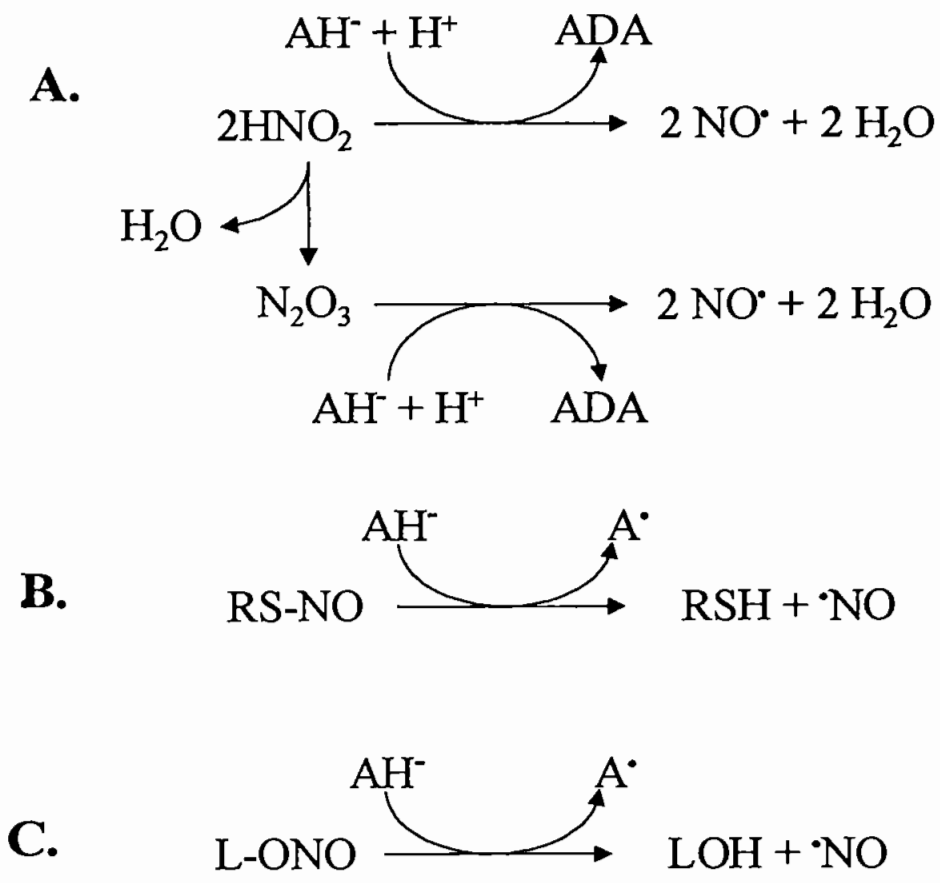

Figura 37: Mecanismos de redução pelo ascorbato de nitrito (reação A), nitrosotióis (reação B) e nitritolipídios (reação C). Abreviaturas: **AH⁻**, ascorbato; **A•**, radical ascorbil; **ADA**, ácido dehidroascórbico; **RS-NO**, S-nitrosotiol; **RSH**, tiol reduzido; **L-ONO**, nitrito lipídio; **LOH**, hidróxido lipídico.

A detecção do complexo Fe(II)-•NO-MGD_2 por RPE tem sido utilizada para caracterização da presença de •NO em diversos sistemas (TSUCHIYA *et al.,* 1999; XIA *et al.,* 2000; PORASUPHATANA *et al.,* 2001). Portanto, as análises de RPE confirmaram os dados obtidos pelo analisador de •NO através da formação do complexo Fe(II)-•NO-MGD_2 após a incubação do captador de spin com os produtos sintetizados. A formação de um espectro *dubleto* quando a síntese foi realizada com ^{15}N-nitrito, ao invés do espectro *tripleto* observado após a síntese com ^{14}N-nitrito ou $^{14}NO_2BF_4$, indica que o •NO, que reagiu com o captador de spin, era proveniente do produto sintetizado e não de fonte contaminante. A intensificação do sinal do espectro, quando a incubação foi realizada na presença de ascorbato, também confirma os dados obtidos no analisador de •NO, nos quais o ascorbato aumentou a liberação de •NO.

A presença de •NO no sistema também foi confirmada por RPE quando o LNO_2 foi incubado na presença de carboxi-PTIO, reconhecidamente um captador de •NO (PFEIFFER *et al.,* 1997). Neste experimento foi possível detectar a presença do complexo carboxi-PTIO-•NO, na forma característica de um espectro *quinteto.* Contudo, observamos que, apesar de haver um aumento na formação do complexo carboxi-PTIO-•NO, com maior tempo de incubação, ocorreu uma diminuição na intensidade do sinal, significando consumo do carboxi-PTIO no sistema. Isto pode ser explicado pela formação de um radical de carbono, que poderia está se ligando ao carboxi-PTIO, competindo com o •NO e assim inibindo a formação do complexo carboxi-PTIO-•NO. Radical este que foi identificado através da incubação do LNO_2

com DBNBS e consequente detecção por RPE de um espectro característico de um aduto DBNBS-•CHO (SMITH & ROBERTSON, 1988).

O efeito do vasorelaxamento independente do endotélio e dependente da presença da guanilato ciclase dá suporte à hipótese de que os RNO_2/RONO causam relaxamento por um mecanismo dependente da presença do •NO. Este mesmo resultado foi observado recentemente para o LNO_2 isolado (LIM *et al.*, 2003) e para o nitrohidroxiaraquidonato (BALAZY *et al.*, 2001). A inibição do efeito de relaxamento na presença de ODQ, que inibe a atividade da guanilato ciclase por oxidação do grupo heme impedindo a ligação do •NO (TSENG *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2000), comprovam que a vasodilatação causada pelos RNO_2/RONO se dá por um mecanismo via GMP cíclico.

A liberação do •NO *in vivo* por estes produtos pode ocorrer dependente ou independentemente de um mecanismo enzimático (**Figura 38**). Por via não enzimática a liberação pode ocorrer espontaneamente via isomerização a nitrito lipídio seguida de homólise, ou na presença de redutores orgânicos presentes no compartimento plasmático como ascorbato, uratos e glutationa (MODIN *et al.*, 2001; FORD, *et al.*, 2002). O mecanismo enzimático para liberação de •NO destes RNO_2/RONO *in vivo* pode ser semelhante àqueles que ocorrem para os ésteres de nitratos orgânicos e derivados nitrados do glicerol como a nitroglicerina, os quais liberam •NO via ação redutásica da aldeído desidrogenase mitocondrial (CERDERQVIST *et al.* 1994; CHEN *et al.*, 2002; IGNARRO, 2002). Também, este efeito de relaxamento *in vivo* pode ocorrer pela liberação e ação direta do •NO ou indiretamente pela transferência do •NO para um grupo tiol, por exemplo da glutationa. Esta hipótese se torna viável uma vez que o •NO liberado na presença de

O_2 é condição ideal para a formação de nitrosotióis (JOURD'HEUIL *et al.*, 2003, SCHRAMMEL *et al.*, 2003).

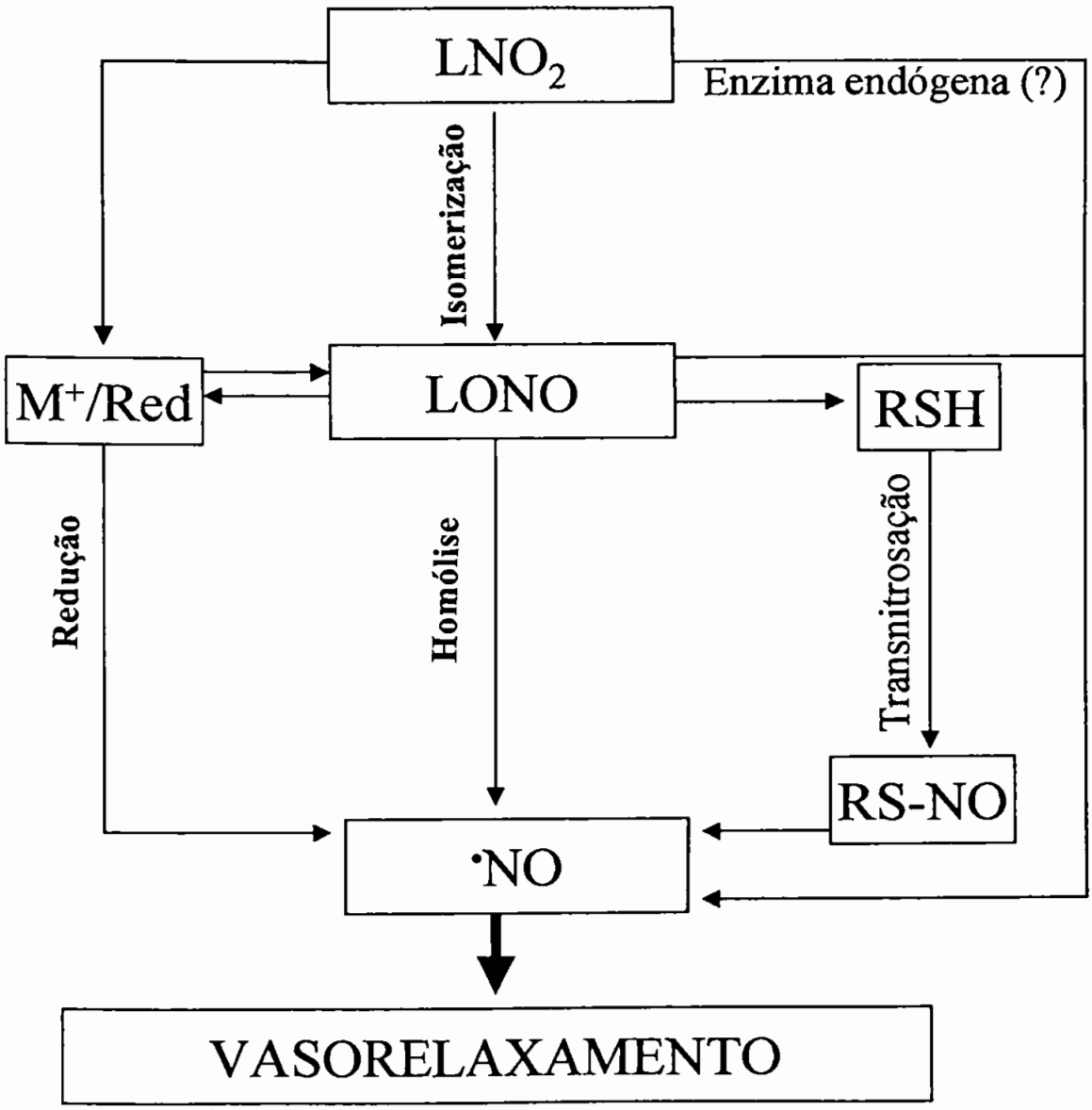

Figura 38: Possíveis mecanismos pelos quais os lipídios nitrados podem induzir vasorrelaxamento *in vivo*.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

A detecção de lipídios nitrados no plasma de indivíduos normolipidêmicos, níveis mais elevados em pacientes hiperlipidêmicos e a constatação de que estes compostos podem liberar •NO, trazem avanços importantes no entendimento da participação do •NO e de seus derivados no metabolismo lipídico e nos processos nitrativos/oxidativos das hiperlipidemias. Por exemplo, na hipercolesterolemia há um aumento na produção de EROs, o que induz a diminuição de antioxidantes e favorece a oxidação da LDL, que é uma etapa crucial na formação da placa aterosclerótica (ESTERBAUER *et al.*, 1992; CHISOLM & STEINBERG, 2000; HALLIWELL, 2000). Também, o estresse oxidativo causado pelo aumento da colesterolemia pode levar a uma diminuição da bioatividade do •NO, provavelmente pela formação de ERNs não vasodilatadoras como o $ONOO^-$ e a nitrotirosina (JACKSON *et al.*, 1998; TOMASIAN *et al.*, 2000; JOHN & SCHMIEDER, 2003). Neste contexto, estes lipídos nitrados ou nitritolipídios podem ser formados como um mecanismo compensador ao estresse oxidativo/nitrativo das hiperlipidemias que pode levar a um processo aterosclerótico (**Figura 39**). Por outro lado, a constatação de que estes lipídios nitrados liberam •NO, pode ser importante do ponto de vista farmacológico uma vez que isto pode ser explorado no desenvolvimento de uma nova classe de fármacos vasodilatadores.

Finalizando, os achados do presente trabalho são importante na elucidação do papel antioxidante do •NO *in vivo* através da formação de lipídios nitrados presentes no plasma e nas lipoproteínas. E, sabendo-se da propriedade destes produtos liberarem

•NO e causar vasorelaxamento, estes podem representar um mecanismo de proteção durante o estresse oxidativo/nitrativo presente nas hiperlipidemias.

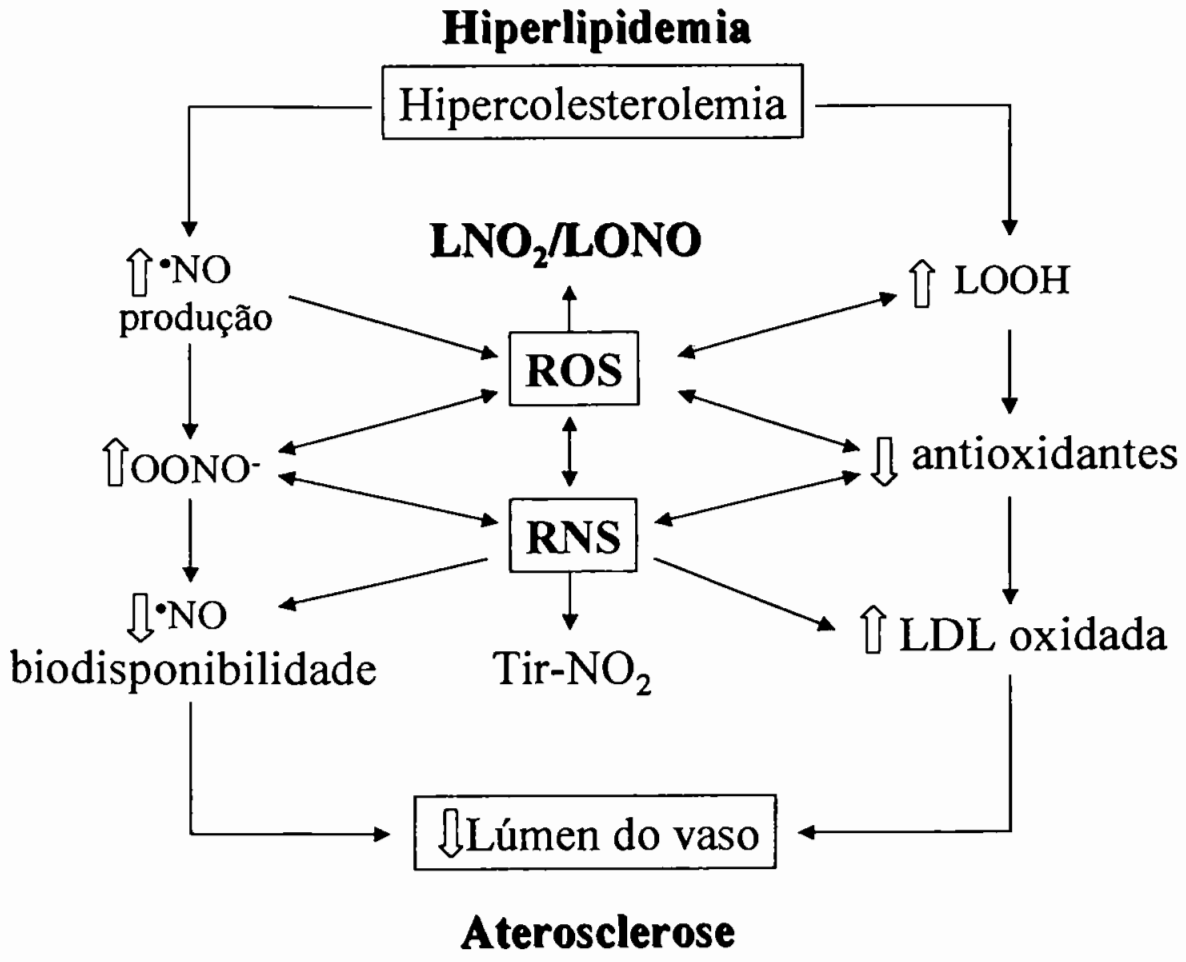

Figura 39: Representação esquemática da formação de LNO_2/LONO durante os processos oxidativos/nitrativos presentes na aterosclerose causada por hiperlipidemia.

Referências bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, R., VAN DER WIELEN, R.P., BRINK, E.J., HENDRIKS, H.F., DOROVSKA-TARAN, V.N., MOHEDE, I.C. Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *Eur. J. Clin. Nutr.,* v.57, n.4, p.595-603, 2003.

AL-SA'DONI, H.H., KHAN, I.Y., POSTON, L., FISHER, I., FERRO, A. A novel family of S-nitrosothiols: chemical synthesis and biological actions., *Nitric Oxide.*, v.4, n.6, p.550-560, 2000.

ARTZ, J.D., THATCHER, G.R. NO release from NO donors and nitrovasodilators: comparisons between oxyhemoglobin and potentiometric assays. *Chem. Res. Toxicol.,* v.11, n.12, p.1393-1397, 1998.

AUGUSTO, O., BONINI, M.G., AMANSO, A.M., LINARES, E., SANTOS, C.C.X., MENEZES, S.L. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology., *Free Radic. Biol. Med.*, v.32, n.9, p.841-859, 2002.

BALAZY, M., IESAKI, T., JIANG, H., PARK, J.L., KAMINSKI, P.M., WOLIN, M.S. Vicinal nitrohydroxyecosatrienoic acids: new vasodilatador lipids formed from nitrogen dioxide and arachidonic acid. *Circulation,* v.100(suppl I), p.I-814, 1999.

BALAZY, M., IESAKI, T., PARK, J.L., JIANG, H., KAMINSKI, P.M., WOLIN, M. Vicinal nitrohydroeicosatrienoic acids: vasodilatador lipids formed by reaction of nitrogen dioxide with arachidonic acid. *J. Pharm. Exper. Therap.,* v.299, n.2, p.1-9, 2001.

BALAZY, M., KAMINSKI, P.M., MAO, K., TAN, J., WOLIN, M.S. S-Nitroglutathione, a product of the reaction between peroxynitrite and glutathione that generates nitric oxide. J. Biol. Chem., v.273, n.48, p.32009-32015, 1998.

BANNI, S. Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.,* v.13, n.3, p.261-6, 2002.

BLOODSWORTH, A., O'DONNELL, V.B., FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler. Thromb .Vasc. Biol.,* 28 :1707-1715, 2000.

BRUCKDORFER, K.R., JACOBS, M., RICE-EVANS, C. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide), lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* v.18, n.6, p.1061-3, 1990.

BYUN, R., MUELLER, D.M., FABJAN, J.S., HEINECKE, J.W. Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoprotein., *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, v.455, p.243-246, 1999.

CALO, L., SARTORE, G., BASSI, A., BASSO, C., BERTOCCO, S., MARIN, R., ZAMBON, S., CANTARO, S., D'ANGELO, A., DAVIS, P. A., MANZATO, E., CREPALDI, G. Reduced susceptibility to oxidation of low-density lipoprotein in patients with overproduction of nitric oxide (Bartter's and Gitelman's syndrome). *J. Hypert.*, v.16, n.7, p.1001-1008, 1998.

CARR, A.C., McCALL, M.R., FREI, B. Oxidation of LDL by mieloperoxidase and Reactive Nitrogen Species- Reaction pathways and antioxidants protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.,* v.20, p.1716-1723, 2000.

CEDERQVIST, B., PERSON, M.G., GUSTAFSSON, L.E. Direct demonstration of NO formation *in vivo* from organic nitrites and nitrates, and correlation to effects on blood pressure and to *in vitro* effects., *Biochem. Pharmacol.*, v.47, n.6, p.1047-1053, 1994.

CHEN, Z., ZHANG, J., STAMLER, J.S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A,* v.99, n.12, p.8306-8311, 2002.

CHIRICO, S., SMITH, C., MARCHANT, C., MITCHINSON, M.J., HALLIWELL, B. Lipid peroxidation in hyperlipidemic patients. A study of plasma using na HPLC-based thiobarbituric acid test. *Free Rad. Res. Comms.,* v.19, n.1, p.51-57, 1993.

CHISOLM, G.M., STEINBERG, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: a overview. *Free Rad. Biol. Med.*, v.28, n.12, p.1815-1826, 2000;

COLES, B., BLOODSWORTH, A., CLARK, S.R., LEWIS, M.J., CROSS, A.R., FREEMAN, B.A., O'DONNELL, V.B. Nitrolinoleate inhibits superoxide generation, degranulation, and integrin expression by human neutrophils: novel antiinflammatory properties of nitric oxide-derived reactive species in vascular cells. *Circ. Res., v.*91, n.5, p.375-381, 2002a.

COLES, B., BLOODSWORTH, A., EISERICH, J.P., COFFEY, M.J., MCLOUGHLIN, R.M., GIDDINGS, J.C., LEWIS, M.J., HASLAM, R.J., FREEMAN, B.A., O'DONNELL, V.B. Nitrolinoleate inhibits platelet activation by attenuating calcium mobilization and inducing phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein through elevation of cAMP. *J. Biol. Chem.,* v.277, n.8, p.5832-5840, 2002b.

CROW, J.P., BECKMAN, J.S. Reactions between nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: Footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv. Pharmacol.,* v.34, p.17-43, 1995.

DENICOLA, A., BATTHYANY, C., LISSI, E., FREEMAN, B.A., RUBBO, H., RADI, R. Diffusion of nitric oxide into low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.,* v.277, n.2, p.932-936, 2002.

D'ISCHIA, M., REGA, N., BARONE, V. Medium-dependent competitive pathways in the reactions of polyunsaturated fatty acids with nitric oxide in the presence of oxygen. Structural characterisation of nitration products and a theoretical insight. *Tetrahedron.*, v. 55, p.9297-9308, 1999.

EISERICH, J. P., PATEL, R. P., O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Molec. Aspects Med.,* v.19, p.221-357, 1998.

ESTERBAUER, H., GEBICKI, J., PUHL, H., JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.*, v.13, p.341-390, 1992.

EVANS, M., BROWN, J., MCINTOSH, M. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J. Nutr. Biochem., v.*13, n.9, p.50-58, 2002.

FORD, E., HUGHES, M.N., WARDMAN, P. Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutatione, cystein, and uric acid at physiological pH. *Free Radic. Biol. Med.*, v.32, n.12, p.1314-1323, 2002.

FREI, B., YAMAMOTO, Y., NICOLAS, D., AMES, B. N. Evaluation of an isoluminol chemiluminescence assay for the detection of hidroperoxides in human blood plasma. *Anal. Biochem.*, v.175, p.1120-1130, 1988.

GALLON, A.A., PRYOR, W.A. The identification of the allylic nitrite and nitro derivatives of methyl linoleate and methyl linoleate by negative chemical ionization mass spectrometry. *Lipids, v.*28, n.2, p.125-133, 1993.

GIAMALVA, D.H., KENION, G.B., CHURCH, D.F., PRYOR, W.A. Rates and mechanisms of reaction of nitrogen dioxide with alkenes in solution., *J. Am. Chem. Soc.*, v.109, p.7059-7063, 1987.

GOW, A.J., LUCHSINGER, B.P., PAWLOSKI, J.R., SINGEL, D.J., STAMLER, J.S.The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.96, n.16, p.9027-9032, 1999.

GOSS, S.P.A., HOGG, G., KALYANARAMAN B. *Chem. Res. Toxicol.*, v.8, p. 800-806, 1995.

GRANHAM, A., HOGG, N., KALYANARAMAN, B., O'LEARY, V., DARLEY-USMAR, V., MONCADA, S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett.,* v.330, n.2, p.181-185, 1993.

HAFIDI, M. E., F. MICHEL, J. BASCOUL, PAULET, A. C. Preparation of fatty acid cholesteryl ester hydroperoxides by photosensitized oxidation. *Chem. Phys. Lipids*, v.100, p.127-138. 1999.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward ? *Cardiovas. Res.,* v. 47, p.410-418, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3.ed. New York: Oxford University, 1999.

HAYASHI, T., FUKUTO, J.M., IGNARRO, L.J., CHAUDHURI, G. Gender differences in atherosclerosis: possible role of nitric oxide. J. Cardiovasc. Pharmacol., v.26, n.5, p.792-802, 1995.

HAVRILLA, C. M., D. L. HACHEY, PORTER, N. A. Coordination (Ag+) ion spray-mass spectrometry of peroxidation products of cholesterol linoleate and cholesterol arachidonate: High-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis of peroxide products from polyunsaturated lipid autoxidation. *J. Am. Chem. Soc.,* v.122, p.8042-8055, 2000.

HEROLD, S., REHMANN, F.J. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. *Free Radic. Biol. Med.,* v.34, n.5, p.531-545, 2003.

HEROLD, S., ROCK, G. Reactions of deoxy-, oxy-, and methemoglobin with nitrogen monoxide. Mechanistic studies of the S-nitrosothiol formation under different mixing conditions. *J. Biol. Chem.,* v.278, n.9, p.6623-6634, 2003.

HOGG, N., DARLEY-USMAR, V. M., WILSON, M. T., MONCADA, S. The oxidation of α-tocoferol in human low-density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *FEBS. Lett.,* v.326 ,n.1, p.199-203, 1993.

HOGG, N., KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.,* v.1411, n.2-3, p.378-384, 1999.

HOMER, K., WANSTALL, J. In vitro comparison of two NONOates (novel nitric oxide donors) on rat pulmonary arteries. *Eur. J. Pharmacol.,* v.356, n.1, p.49-57, 1998.

HUIE, R.E. The reaction kinetics of NO_2. *Toxicology*, v.89, p.193-216, 1994.

HUIE, R.E., PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res. Comms.,* v.18, n.4, 195-199, 1993.

IGNARRO, L.J. After 130 years, the molecular mechanism of action of nitroglycerin is revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A,* v.99,n.12, p.7816-7817, 2002.

JACKSON, T.S., XU, A., VITA, J.A., KEANEY Jr, J. F. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ. Res.,* v.83, n.9, p.916-922, 1998.

JIRA, W., SPITELLER, G., CARSON, W., SCHRAM, A. Strong increase of hydroxy fatty acids derived of linoleic acid in human low density lipoprotein of aterosclerotic patients. *Chem. Phys. Lip.,* v.91, p1-11, 1998.

JOHN, S., SCHMIEDER, R.E. Potential mechanisms of impaired endothelial function in arterial hypertension and hypercholesterolemia. *Curr. Hypertens. Rep.* v.5, n.3, p.199-207, 2003.

JOUR'HEUIL, D., JOUR'HEUIL, F.L. FEELISCH, M. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism. J. Biol. Chem., v. 278, n.18, p.15720-15726, 2003.

KISSNER, R., NAUSER, T., BUGNON, P., LYE, P.G., KOPPENOL, W.H. Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem. Res. Toxicol.* v.10, n.11, p.1285-1292, 1997.

KNOWLES, R. G., MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*, v.298, p.249-258, 1994.

LEPORE, D.A. Detection and quantification of nitric oxide (NO) synthase-independent generation of NO. *Methods Enzymol.*, v.359, p.180-186, 2002.

LIM, D.G., SWEENEY, S., BLOODSWORTH, A., WHITE, C.R., CHUMLEY, P.H., KRISHNA, N.R., SCHOPFER, F., O'DONNELL, V.B., EISERICH, J.P., FREEMAN, B.A. Nitrolinoleate, a nitric oxide-derived mediator of cell function: synthesis, characterization, and vasomotor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v.99, v.25, p.15941-15947, 2002.

MALO-RANTA, U., YLÄ-HERTTUALA, S., METSÄ-KETELÄ, T., JAAKKOLA, O., MOILANEN, E., VUORINEN, P., NIKKARI, T. Nitric oxide donor GEA 3162 inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett.*, *v.*337, p.179-183, 1994.

MARIEQ, M.M., SZENTE, J.J. Kinetics of the reaction between ethylperoxy radicals and nitric oxide., *J. Phys. Chem.*, v.100, p.12374-12379, 1996.

MARLLETA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol Chem.*, v.268, n.17, p.12231-12234, 1993.

MASHIMA, R. , ONODERA, K., YAMAMOTO, Y. Regioisomeric distribution of cholesteryl linoleate hydroperoxides and hydroxides in plasma from health humans provides evidence for free radical-mediated lipid peroxidation *in vivo*. *J. Lip. Res.*, v. 41, p.109-115, 2000.

MAY, J.M. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? *Free Radic. Biol. Med.*, v.28, n.9, p.1421-1429, 2000.

MEHTA, A., OESER, A.M., CARLSON, M.G. Rapid quantification of free fatty acids in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, *v.*719, p.9-23, 1998.

MODIN, A., BJÖRNE, H., HERULF, M., ALVING, K., WEITZBERG, E., LUNDBERG, J.O. N. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation., *Acta Physiol. Scand.*, v.171, p.9-16, 2001.

MONCADA, S., RADOMSKI, M. W., PALMER, R. M. J. Endothelium-derived relaxing factor - identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem. Pharmacol.*, v.37, n.13, p.2495-2501, 1998.

MORIEL, P., ABDALLA, D. S. P. Nitrotyrosine bound to β-VLDL-apoproteins: a biomarker of peroxynitrite formation in experimental atherosclerosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.232, p.332-335, 1997.

MORIEL, P., OKAWABATA, F.S., ABDALLA, D.S.P. Oxidized lipoproteins in blood plasma: possible marker of atherosclesoris progression. *Life*, v.48, p.413-417, 1999.

NAKASHIMA, Y., TOYOKAMA, Y. TANAKA, S., YAMASHITA, K., YASHIRO, A., TASAKI, H., KUROIWA, A. Simvastatin increase plasma NO_2 and NO3 levels in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis,* v.127, p.43-47, 1996.

NAPOLITANO, A., CAMERA, E., PICARDO, M. D'ISCHIA, M. Acid-promoted reactions of ethyl linoleate with nitrite ions: Formation and structural chraracterization of isomeric nitroalkene, nitrohydroxy and novel 3-nitro-1,5-hexadiene and 1,5-dinitro-1,3-pentadiene products. *J. Org. Chem.*, v.65. p.4853-4860, 2000.

NAPOLITANO, A., CAMERA, E., PICARDO, M., D'ISCHIA, M. Reactions of hydro(pero)xy derivatives of polyunsaturated fatty acids/esters with nitrite ions under acidic conditions. Unusual nitrosative breakdow of methyl 13-hydro(prero)xyoctadeca-9,11-dienoate to a novel 4-nitro-2oximinoalk-3-enal product., *J. Org. Chem.*, v.67, p.1125-1132, 2002.

NAPOLITANO, A., CRESCEZI, O., CAMERA, E., GIUDICIANNI, I., PICARDO, M., D'ISCHIA, M. The acid-promoted reaction of ethhyl linoleate with nitrite. New insights from ^{15}N-labelling and peculiar reactivity of a model skipped diene. *Tetrahedron.*, v.58, p.5061-5067, 2003.

NAVA, E., NOLL, G., LUSCHER, T. F. Nitric oxide in cardiovascular diseases. *Ann. Medicine,* v.27, p.343-351, 1995.

NGUYEN, M.T., SUMTHI, R., SENGUPTA, D., PEETERS, J. Theorétical analysis of reactions related to the HNO_2 energy surface: OH + NO and H+ NO_2., *Chemical Physics.*, v.230, p.1-11, 1998.

NOUROOZ-ZADEH, J., SMITH, C.C., BETTERIDGE, D.J. Measures of oxidative stress in heterozygous familial hyperlipidemia. Atherosclerosis, v.156, p.435-441, 2001.

O'DONNELL, V. B., CHUMLEY, P. H., HOGG, N., BLOODSWORTH, A., DARLEY-USMAR, V.M., FREEMAN, B. A. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with α-tocopherol. *Biochemistry,* v.36, p.15216-15223, 1997.

O'DONNELL, V. B.; EISERICH, J.P.; CHUMLEY, P. H.; JABLONSKY, M.J.;KIRK, M.; BARNES, S.; DARLEY-USMAR, V.M. AND FREEMAN, B. A. Nitration of Unsatured fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide and nitronium ion. *Chem. Res. Toxicol.,* v.12, p.83-92, 1999a.

O'DONNELL, V. B., EISERICH, J.P., BLOODSWORTH, A., CHUMLEY, P.H., KIRK, M., BARNES, S., DARLEY-USMAR, V.M. AND FREEMAN, B. A. Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive species. *Methods Enzymol.,* v.301, p.455-471, 1999b.

O'DONNELL, V.B., FREEMAN, B.A. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ. Res.,* v.88, n.1, p.12-21, 2001.

PADMAJA, S., HUIE, R.E. The reaction of nitric oxide with peroxyl radicals. *Bioch. Bioph. Res. Commun.,* v.195, n.2, p.539-544, 1993.

PATEL, R.P., LEVONEN, A.L., CRAWFORD, J. H., DARLEY-USMAR, V.M. Mechanisms of the pro and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. *Cardiovas. Res.*, v.47, p.465-474, 2000.

PATEL, R.P., MCANDREW, J., SELLAK, H., WHITE, C.R., JO, H., FREEMAN, B.A, DARLEY-USMAR, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Bioq. Bioph. Acta,* v.1411, p.385-400, 1999.

PFEIFFER, S., LEOPOLD, E., HEMMENS, B., SCHMIDT,K., WERNER,E.R., MAYER, B. Interference of carboxy-ptio with nitric oxide and peroxynitrite-mediated reactions., *Free Radic. Biol. Med.*, v.22, n.5, p.787-794, 1997.

PORASUPHATANA, S., WEAVER, J., BUDZICHOWSKI, T.A., TSAI, P., ROSEN, G.M. Differential effect of buffer on the spin trapping of nitric oxide by iron chelates. *Anal. Biochem.,* v.298, n.1, p.50-56, 2001.

PRYOR, W.A., CASTLE, L., CHURCH, D.F. Nitrosation of organic hidroperoxides by nitrogen dioxide/dinitrogen tretraoxide., *J. Am. Chem. Soc.*, v.107, n.1, p.211-217, 1985.

PRYOR, W.A., LIGHTSEY, J.W., CHURCH, D.F. Reaction of nitrogen dioxide with alkenes and polyunsaturated fatty acids: addition and hydrogen abstraction mechanisms., *J. Am. Chem. Soc.*, v.104, p.6685-6692, 1982.

PRYOR, W.A., PRIER, D.G., CHURCH, D,F. Radical production from the interaction of ozone and PUFA as demonstrated by electron spin resonance spin-trapping techniques. Environ. Res., v.24, n.1, p.42-52, 1981

PUTTMANN, M., KRUG, H., OCHSENSTEIN, E. V., KANTTERMANN, R. Fast HPLC detemination of serum free fatty acids in tha picomole range. Clin. Chem., v.39, n.5, p.825-832, 1993.

RADI, R., PELUFFO, G., ALVAREZ, M.N., NAVILIAT, M., CAYOTA, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med., v.*30, n.5, p.463-488, 2001.

RAHMAN, M. M., VARGHESE, Z., MOORHEAD, J.F., Paradoxical increase in nitric oxide synthase activity in hypercholesterolaemic rats with impaired renal function and decreased activity of nitric oxide. *Nephrol. Dial. Transplant.,* v.16, p.262-268, 2001.

ROMERO, F.J., BOSCH-MORELL, F., ROMERO, M.J. ROMERO, B. MARIN, N., ROMA, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Helalth. Pespect.*, v.106, p.1229-1234, 1998.

RUBBO, H., DARLEY-USMAR, V., FREEMAN, B. A. Forum on nitric oxide: chemical events in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.,* v.9, p.809-820, 1996.

RUBBO, H., FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of lipid peroxidation reactions: formation and analysis of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Methods Enzymol., v.*269, p.385-394, 1996.

RUBBO, H., PARTHASARATHY, S., BARNES, S., KALYANARAMAN, M.K.B., FREEMAN, B. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent lipossome and low density lipoprotein oxidation: Termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch. Bioch. Bioph.,* v.324, n.1, p.15-25, 1995.

RUBBO, H., RADI, R., TRUJILLO, M., TELLERI, R., KALYANARAMAN, B., BARNES, S., KIRK, M., FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.,* v.269, n.42, 26066-26075, 1994.

SCORZA, G., PIETRAFORTE, D., MINETTI, M. Role of ascorbate and protein thiols the release of nitric oxide from s-nitroso-albumin and s-nitroso-glutathione in human plasma., *Free Radic. Biol. Med.*, v.22, n.4, p.633-642, 1997.

SCHRAMMEL, A., GORREN, A.C., SCHMIDT, K., PFEIFFER, S., MAYER, B. S-nitrosation of glutatione by nitric oxide, peroxynitrite, and $^{\bullet}NO/O_2^{\bullet-}$. *Free radic. Biol. Med.*, v.34, n.8, p.1078-1088, 2003.

SHARMA, V.S., RANNEY, H.M. The dissociation of NO from nitrosylhemoglobin. *J. Biol. Chem.,* v.253, n.18, p.6467-6472,1978.

SHIMIZU, H., TANIGUCHI, T., ISHIKAWA, Y., YOKOYAMA, M. Effects of nitric oxide on cholesterol metabolism in macrophages. *Atherosclerosis,* v.129, p.193-198, 1997.

SILVA, E. L., CHANG, Y. H., MORIEL, P., ABDALLA, D. S. P.. Plasma antioxidant enzymes and oxidized lipoproteins in hypercholesterolemia rabbits. *Biochem. Mol. Biol. Intern.,* v.36, p.679-687, 1995.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C. *Spectrometric identification of organic compounds,* 5. ed. John Wiley and Sons, New York, NY, 1991.

SIMON, E., PAUL, J.L., SONI, T., SIMON, A., MOATTI, N. Plasma and erythrocyte vitamin E content in asymptomatic hypercholesterolemic subjects. *Clin. Chem.* v.43, p.285-289, 1997.

SINGH, R.J., HOGG, N., JOSEPH, J., KALYANARAMAN, B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.,* v.271, n.31, p.18596-18603, 1996.

SMITH, P., ROBERTSON, J.S. Electron paramagnetic resonance study of the reactions of the spin trap 3,5-dibromo-4-nitrosobenzenesulfonate. Can. J. Chem. v.66, p.1153-1158, 1988.

SPITELLER, G. linoleic acid peroxidation-the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein –and its relationship to chronic diseases. *Chem. Phys. Lip.,* v.95, p.105-162, 1998.

SPITELLER, P., SPITELLER, G. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe^{2+}/O_2 or Fe^{3+}/O_2 is used as oxidant. *Biochim. Biophys. Acta,* v.1392, p.23-40, 1998.

STAMLER, J. S., SINGEL, D. J., LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science,* v.18, v.258, n.5090, p.1898-1902, 1992.

STORCH, J., THUMSER, A.E.A. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Bioquim. Bioph. Acta,* v.1486, p.28-44, 2000.

TIKKANEN, I., FYHRQUIST, F..Nitric oxide in hypertension and renal diseases. *Ann. Med.,* v.27, p.353-357, 1995.

TOMASIAN, D., KEANEY Jr., J. F., VITA, J.A. Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovas. Res.,* v.47, p. 426–435, 2000.

TONSTAD, S. AKSNES, L. Fat-soluble vitamin levels in familial hypercholesterolemia. *J. Pediatr.*, v.130, p.274-280, 1997.

TROSTCHANSKY, A., BATTHYANY, C., BOTTI, H., RADI, R., DENICOLA, A., RUBBO, H. Formation of lipid-protein adducts in low density lipoprotein by fluxes of peroxinitrite and its inhibition by nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.,* v.395, n.2, p.225-232, 2001.

TSAO, P.S., COOKE, J.P. Endothelial alterations in hypercholesterolemia: more than simply vasodilator dysfunction. *J. Cardiovasc. Pharmacol.,* v.32, Supl. 3: S48-53, 1998.

TSENG, C.L., TABRIZI-FARD, M.A., FUNG, H. Diferential sensitivity among nitric oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation. *The J. pharmaco. Experim. Therapeutics.*, v.292, n.2, p.737-742, 2000.

TSUCHIYA, K., JIANG, J.J., YOSHIZUMI, M., TAMAKI, T., HOUCHI, H., MINAKUCHI, K., FUKUZAWA, K., MASON, R.P. Nitric oxide-forming reactions of the water-soluble nitric oxide spin-trapping agent, MGD. *Free Radic. Biol. Med.,* v.27, n.3-4, p.347-355, 1999.

VAN DER VLIET, A., SMITH, D., O'NEILL, C.A., KAUR, H., DARLEY-USMAR, V., CROSS, C.E., HALLIWELL, B. Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituints: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem. J.*, v.303, p.295-301, 1994.

VAN DER VLIET, A., EISERICH, J.P., HALLIWELLL, B., CROSS, C.E. Formation of reactive nitrogen species durin peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite., *The Journal of Biological Chemistry.*, v.272, n.12, p.7617-7625, 1997.

VUSSE, G.V., BILSEN, M.V., GLATZ, J.F.C. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovas. Res.,* v.45, p.279-293, 2000.

WAJNBERG, E., LINHARES, M.P., EL-JAICK, L.J., BEMSKI, G. Nitrosyl hemoglobin: EPR components at low temperatures. *Eur. Biophys. J.*, v.21, n.1, p.57-61, 1992.

WEITZBERG, E., LUNDBERG, J.O.N., Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide-Biol.Chem., v.*2, p.1-7, 1998.

WEVER, R., STROES, E., RABELINK, T.J. Nitric oxide and hypercholesterolemia: a matter of oxidation and reduction?. *Atherosclerosis.*, v.137, p.51-60, 1998.

WINK, D.A., COOK, J.A., PACELLI, R., LIEBMAN, J., KRISHNA, M.C., MITCHEL, J.B. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.,* v.82/83, p.221-226, 1995.

WINK, D.A., MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biol. Med.*, v.25, n.4/5, p.434-456, 1998.

WOLIN, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Ateriosclerr Thromb. Vasc. Biol.,* v.20. p.1430-1442, 2000.

XIA, Y., CARDOUNEL, A.J., VANIN, A.F., ZWEIFER, J. Electron paramagnetic resonance spectroscopy with n-methyil-d-glucamine dithiocarbamate iron complexes distinguishes nitric oxide and nitroxyl anion in a redox-dependente manner: applications in identifying nitrogen monoxide synthase. *Free Radic. Biol. Med.*, v.29, n.8, p.793-797, 2000.

YATES, M.T., LAMBERT, L.E., WHITTEN, J.P., MCDONALD, I., MANO, M., KU, G., MAO, S.J. A protective role for nitric oxide in the oxidative modification of low density lipoproteins by mouse macrophages. *FEBS Lett.,* v.309, n.2, p.135-138, 1992.

YAMAMOTO, Y. Chemiluminescense-based high-performance liquid chromatography assay of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol.,* v.233: p.319-324, 1994.

ZAVORIN, S.I., ARTZ, J.D., DUMITRASCU, A., NICOLESCU, A., SCUTARU D., SMITH, S.V., THATCHER, G.R.J. Nitrate esters as nitric oxide donors: SS-nitrates., *Org. Lett.*, v.3, n.8, p.1114-1116, 2001.

ZHAO, Y, BRANDISH, P.E., DIVALENTIN, M., SCHELVIS, J.P., BABCOCK, G.T., MARLETTA, M.A. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry,* v.39, n.35, p.10848-10854, 2000.

Anexos