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

GRAZIELE CRISTINA FERREIRA

**Alterações induzidas pelo TEMPOL sobre as
concentrações de metabólitos do óxido nítrico após
o tratamento com nitrito de sódio**

Ribeirão Preto - SP

2017

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

GRAZIELE CRISTINA FERREIRA

**Alterações induzidas pelo TEMPOL sobre as
concentrações de metabólitos do óxido nítrico após
o tratamento com nitrito de sódio**

Ribeirão Preto - SP

2017

GRAZIELE CRISTINA FERREIRA

**Alterações induzidas pelo TEMPOL sobre as
concentrações de metabólitos do óxido nítrico após
o tratamento com nitrito de sódio**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos
Santos

Ribeirão Preto - SP

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Graziele Cristina

Alterações induzidas pelo TEMPOL sobre as concentrações de metabólitos do óxido nítrico após o tratamento com nitrito de sódio. Graziele Cristina Ferreira; Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos. Ribeirão Preto, 2017. 85f.

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

1. Nitrito. 2. Espécies nitros(il)adas 3. Metabólitos do óxido nítrico 4. Nitrato 5. TEMPOL

FOLHA DE APROVAÇÃO

FERREIRA, Grazielle Cristina. **Alterações induzidas pelo TEMPOL sobre as concentrações de metabólitos do óxido nítrico após o tratamento com nitrito de sódio.** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof. Dr.: Lusiane Maria Bendhack

Instituição: FCFRP-USP

Assinatura:_____

Prof. Dr.: Eduardo Barbosa Coelho

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof. Dr.: Hugo Pequeno Monteiro

Instituição: EPM-UNIFESP

Assinatura:_____

*Àqueles que sempre me apoiaram
e me incentivaram a nunca desistir
dos meus sonhos, meus amados
pais, que são a base de tudo na
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar o dom da vida e por ser a luz a me guiar em todos os momentos.

Aos meus pais, Elias e Lúcia, que não mediram esforços para que eu tivesse uma boa formação e me ensinaram desde cedo que o estudo é primordial. Obrigada por todo amor incondicional e por serem os meus melhores ouvintes sempre. Também aos meus irmãos, Gabriela, Gabriel, Elisângela e Ivanildo por serem o meu lar, por me ajudarem a aprender a dividir e mais ainda a somar na vida das pessoas. Aos meus sobrinhos, Lucas, Miguel e Arthur por trazerem mais amor e vida ao meu dia a dia. À minha amada avó Olga por todo o amor e cuidado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, que sempre esteve presente, acreditando na minha capacidade e dando todo o suporte para que este trabalho fosse realizado. Minha admiração pelo profissional e pela sua pessoa é imensurável.

Aos amigos, Marcelo, Jefferson e Lucas por terem sido os meus “pais” na ciência. Eu sempre digo que tive sorte em trabalhar em um grupo tão competente. Tudo que aprendi, devo a vocês. Obrigada pelos ensinamentos e amizade. Agradeço especialmente o Lucas que foi o meu principal colaborador, me ajudou a desenvolver esse trabalho e nunca economizou nas dicas e correções necessárias. Sei que, do jeito maluco dele, sempre torceu por mim e pelo meu sucesso.

À Sandra por todo apoio técnico e psicológico dedicados a mim em todos esses anos. Agradeço também pela amizade, carinho e pela incrível risada que sempre deixou o ambiente mais leve. A parceria no laboratório e na vida continua.

Aos meus colaboradores diretos, Célio, Gustavo e Rafael por toda a ajuda, disponibilidade e competência em todas as fases desse trabalho. Agradeço a amizade fortalecida, a dedicação e paciência com todas as minhas exigências. Agradeço especialmente ao Gustavo que nunca mediu esforços para me auxiliar e dedicou muito tempo em correções e dicas para eu ser profissionalmente melhor, além de sempre me fornecer as melhores figuras. Você é fonte de inspiração Gu.

Aos amigos do laboratório, Jéssica, Evandro, Élen, Rose e Renato, obrigada pela ótima convivência e por tornarem o trabalho mais prazeroso. A todos os outros membros e ex membros do “JETS lab” pelo companheirismo e por ajudarem direta

ou indiretamente na concretização desse trabalho. Aos meus eternos IC's Kelvin, Lídia e Pedro por me ensinarem muito sobre aprendizado e dedicação.

Aos professores, funcionários e colegas de todo o departamento de Farmacologia, em especial ao Ramon e a Gislaine por serem tão atenciosos e prestativos, e a todos do laboratório da Prof^a. Michele pelos bons momentos compartilhados.

À amizade, companheirismo, cumplicidade e amor do Gustavo, Airton e Jéssica. Agradeço por terem sido tão presentes durante todo o meu mestrado e por tantas risadas compartilhadas.

Às minhas amigas de infância, Isabella, Marcela e Marina por fazerem parte de todas as fases da minha formação e por estarem lado a lado a cada conquista. Com a amizade e apoio constante de uma as outras vamos sempre mais longe.

Às minhas irmãs, Carla, Giovana e Priscila, por terem me recebido e me proporcionado o melhor lar que eu poderia ter. Agradeço pelo colo, pelos conselhos, amor e tudo que vivemos nos anos de convivência. O aprendizado e amadurecimento alcançados não seriam conquistados sem vocês. Agradeço também pelos presentes que vieram: Frank, Mateus e Lara, trazendo ainda mais amor a nossa "Terra do Nunca".

Aos amigos, Flávia, Ana Paula, Gabriela, Fernanda, Heloísa, Soraya, Alessandra, Tainara, Gabriel, Renan e Bruno, por terem tornado mais especiais os melhores anos da minha vida. Agradeço as noites em claro estudando, as festas, brincadeiras e principalmente a cumplicidade. Aprendi que é possível juntar várias pessoas diferentes entre si e construir uma verdadeira família, e que no final isso é o mais vai valer a pena em toda a graduação. Agradeço em especial a Flávia por ser a minha companheira inseparável desde a matrícula e por estar sempre disposta a me ouvir e aconselhar. Seu apoio é imprescindível.

Ao meu amigo e namorado, Tiago, pela paciência, amor e carinho. Agradeço por lutar junto comigo, dia após dia, pelo nosso amor e nossos sonhos. Sonhos, estes que são melhores por serem sonhados a dois. Agradeço também a sua família por não medirem esforços para me agradar.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

“Desistir? Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério. É que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas; mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros; mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça”.

Geraldo Eustáquio de Souza

RESUMO

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

No final do século XX o nitrito e nitrato de sódio passaram a ser vistos como possíveis agentes terapêuticos nas doenças cardiovasculares. Estudos iniciais sugeriam que o mecanismo anti-hipertensivo do nitrito de sódio (NaNO_2) era pela sua conversão a óxido nítrico (NO) em meio ácido. Estudos posteriores mostraram que a formação de espécies nitros(il)adas também poderiam estar envolvidas nesse mecanismo. Sabemos ainda da importância do ciclo entero-salivar do NO para a manutenção dos efeitos anti-hipertensivos do nitrito, além do fato que antioxidantes, como o TEMPOL potencializam esses efeitos. Entretanto o mecanismo anti-hipertensivo exato do NaNO_2 e a relevância de cada metabólito do NO (nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas) nesse processo, permanecem obscuros.

Este estudo foi realizado a fim de compreender a formação de espécies nitros(il)adas, nitrito e nitrato a partir da administração de NaNO_2 , e como o TEMPOL pode interferir nessas reações em condições fisiológicas e na hipertensão.

Em animais normotensos a administração de NaNO_2 aumentou as concentrações de nitrito, espécies nitros(il)adas e nitrato no plasma, coração, fígado e estômago. O TEMPOL potencializou o aumento de nitrito em quase todos os tecidos no intervalo de 15 minutos após a administração de NaNO_2 . Na hipertensão, as concentrações desses metabólitos ficaram mais baixas comparadas aos animais normotensos, e o TEMPOL não foi mais capaz de potencializar a formação dos mesmos.

Palavras-chave: Nitrito, espécies nitros(il)adas, metabólitos do óxido nítrico, nitrato, TEMPOL.

ABSTRACT

FERREIRA, G.C. **Time course effects of TEMPOL on nitric oxide metabolites levels after sodium nitrite treatment.** 2017. 85f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

At the end of the 20th century, sodium nitrite and nitrate were seen as possible therapeutic agents in cardiovascular diseases. Initial studies suggested that the antihypertensive mechanism of sodium nitrite (NaNO_2) was related to its conversion to nitric oxide (NO) in acidic environment. Further studies have shown that formation of nitros(yl)ated species may also be involved in this mechanism. We also know the importance of the enterosalivary circuit of nitrate for the maintenance of antihypertensive effects of nitrite, besides antioxidants such as TEMPOL potentiate these effects. However, the exact antihypertensive mechanism of NaNO_2 and the relevance of each NO metabolite (nitrite, nitrate and nitros(yl)ated species) in this process remain obscure.

This study was carried out in order to understand a little more about the formation of nitros(yl)ated species, nitrite and nitrate from the administration of NaNO_2 , and how TEMPOL may interfere in these reactions in physiological conditions and hypertension.

In normotensive animals the administration of NaNO_2 increased the concentrations of nitrite, nitros(yl)ated species and nitrate in the plasma, heart, liver and stomach. TEMPOL potentiated this increase in almost all tissues within 15 minutes after administration of NaNO_2 . In hypertension, the concentrations of these metabolites decreased compared to the concentrations found in normotensive animals, and TEMPOL was no longer able to potentiate them. Thus, we concluded that in situations where oxidative stress is lower, we found higher concentrations of NO metabolites after treatment with sodium nitrite.

Keywords: Nitrite, nitros(yl)ated species, nitric oxide metabolites, nitrate, TEMPOL.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Mecanismos envolvidos na síntese, e na vasodilatação gerada pelo NO.....	20
Figura 2. Ciclo êntero-salivar do nitrato.....	23
Figura 3. Abordagem experimental I.....	35
Figura 4. Abordagem experimental II.....	37
Figura 5. Concentrações plasmáticas de nitrito, espécies nitros(il)adas (RXNO) e nitrato	44
Figura 6. Concentrações na aorta de nitrito, nitrato e porcentagem de nitros(il)ação.....	46
Figura 7. Concentrações no coração de nitrito, RXNO e nitrato.....	49
Figura 8. Concentrações no estômago de nitrito, RXNO e nitrato.....	51
Figura 9. Concentrações no fígado de nitrito, RXNO e nitrato.....	53
Figura 10. Concentrações plasmáticas de nitrito, RXNO e nitrato	56
Figura 11. Concentrações na aorta de nitrito, nitrato, porcentagem de nitros(il)ação em animais SHAM e 2R1C	58
Figura 12. Concentrações no coração de nitrito, RXNO e nitrato em animais SHAM e 2R1C.....	60
Figura 13. Concentrações no estômago de nitrito, RXNO e nitrato em animais SHAM e 2R1C	63
Figura 14. Concentrações no fígado de nitrito, RXNO e nitrato em animais SHAM e 2R1C.....	65
Figura 15. Pressão arterial sistólica (mmHg) em ratos 2R1C e SHAM.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C – 2 rins 1 clipe

Ang II – angiotensina II

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

CSNO – S-nitrosocisteína

DOCA – desoxicorticosterona

DTPA – ácido dietilenotriaminopentaacético

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EPM – erro padrão da média

EROS – espécies reativas de oxigênio

GMPc – guanosina monofosfato cíclica

GSNO – S-nitrosoglutathione

GTP – guanosina trifosfato

iNOS – óxido nítrico sintase induzida

IRAG – receptor de inositol-1,4,5-trifosfato

L-NAME – N^w-nitro-arginina-metil-éster

MMTS – metilmetanotiosulfonato

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

NEM – N-etilmaleimida

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

PAM – pressão arterial média

PAS – pressão arterial sistólica

PKG – proteína quinase G

RPM – rotações por minutos

RSNO – resíduos S-nitrosilados

RXNO – espécies nitros(il)adas

SDS – dodecil sulfato de sódio

SERCA – retículo sarcoplasmático ATPase

SOD – superóxido dismutase

TEMPOL – 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1.	A descoberta e biossíntese do óxido nítrico _____	18
1.2.	A participação do óxido nítrico na homeostase vascular _____	19
1.3.	Formação de óxido nítrico independente das NOS _____	21
1.4.	Ciclo êntero-salivar do nitrato _____	22
1.5.	Efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio _____	23
1.6.	Associação entre nitrito de sódio e antioxidantes _____	26
1.7.	Hipertensão arterial e aumento das EROs _____	27
1.8.	Estado redox do organismo e metabólitos do óxido nítrico _____	27
2.	HIPÓTESE	30
3.	OBJETIVOS	32
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Considerações gerais _____	34
4.2	Abordagem experimental I _____	34
4.3	Coletas de tecidos _____	35
4.4	Abordagem experimental II _____	36
4.5	Medidas de pressão arterial _____	36
4.6	Abordagem experimental III _____	37
4.6.1	Inserção da cânula _____	37
4.6.2	Experimento _____	38
4.7	Determinações das concentrações plasmáticas e teciduais de nitritos e espécies nitros(il)adas _____	38
4.8	Determinação da concentração de espécies nitros(il)adas na aorta _____	39
4.9	Determinação da concentração plasmática e tecidual de nitratos _____	40
4.10	Análise dos resultados _____	40
5.	RESULTADOS	42
5.1	Abordagem experimental I _____	42
5.1.1	Plasma _____	42
5.1.2	Aorta _____	45
5.1.3	Coração _____	47
5.1.4	Estômago _____	50
5.1.5	Fígado _____	52

5.2	Abordagem experimental II	54
5.2.1	Plasma	54
5.2.2	Aorta	57
5.2.3	Coração	58
5.2.4	Estômago	61
5.2.5	Fígado	64
5.3	Abordagem experimental III	66
5.3.1	Pressão Arterial Sistólica	66
6.	DISCUSSÃO	69
7.	CONCLUSÕES	77
8.	REFERÊNCIAS	79

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. A descoberta e biossíntese do óxido nítrico

Por muito tempo o papel fisiológico do óxido nítrico (NO) permaneceu desconhecido. Foi somente nos anos de 1980 que trabalhos surgiram demonstrando consistentemente o papel do NO como fator de relaxamento do endotélio (Furchgott e Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987). O NO é uma molécula gasosa e lipofílica, com meia-vida de aproximadamente um segundo, que desempenha um importante papel na homeostase cardiovascular. O NO participa da regulação do tônus vascular e da pressão arterial, além de conferir propriedades tromborresistentes e ateroprotetoras ao endotélio (Cooke e Dzau, 1997; Cockcroft, 2005).

A biossíntese do NO ocorre intracelularmente e é catalisada por uma família enzimática denominada de NO sintases (NOS) (Alderton *et al.*, 2001). As NOS catalisam a oxidação da L-arginina em L-citrulina e NO de forma dependente de NADPH e O₂ molecular (Alderton *et al.*, 2001). Existem três isoformas dessa enzima: neuronal (nNOS ou NOS1), induzida (iNOS ou NOS2) e endotelial (eNOS ou NOS3) (Moncada e Higgs, 1993). Tanto a nNOS quanto a eNOS são isoformas constitutivas e são cálcio-dependentes, necessitando do aumento dos níveis de cálcio intracelular e consequente ligação desse com a calmodulina para a ativação dessas enzimas, ao passo que a iNOS não é constitutiva e é expressa em processos inflamatórios (Moncada e Higgs, 1993).

1.2. A participação do óxido nítrico na homeostase vascular

A eNOS é a principal isoforma para a manutenção da homeostase no sistema cardiovascular (Hill *et al.*, 2010). Apesar de ter sido descoberta no endotélio vascular, ela também é encontrada em neurônios, células epiteliais e cardiomiócitos (Dudzinski e Michel, 2007). Sua atividade é regulada pela interação Ca^{2+} /Calmodulina (Oess *et al.*, 2006) através de um aumento nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} provocados por alguns agonistas como as catecolaminas, adenosina trifosfato (ATP), angiotensina II (Ang II) ou por estímulos físicos como a força de cisalhamento (shear stress) (Palmer *et al.*, 1988). A ativação também pode ocorrer por mecanismos dependentes da tirosina kinase (Boo e Jo, 2003).

O NO produzido pela eNOS causa relaxamento da musculatura lisa vascular através da interação com o grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel, ativando-a. Esta por sua vez, aumenta a produção de GMP cíclico a partir de GTP (Fleming e Busse, 1999), e este estimula a proteína quinase G-1 (PKG-1) que por uma cascata de eventos promove o relaxamento da musculatura lisa vascular (Rapoport e Murad, 1983).

A PKG-1 fosforila os canais de potássio ativados por cálcio de condutância alta, o que resulta na abertura destes canais e permite a saída do potássio intracelular, levando à hiperpolarização da membrana plasmática e à redução do influxo de cálcio através dos canais de cálcio do tipo L (Francis *et al.*, 2010). Além disso, os canais de cálcio do tipo L também podem ser fosforilados pela PKG-1, o que resulta na inibição da função destes canais (Yang *et al.*, 2007). Já no retículo sarcoplasmático, a PKG-1 fosforila o substrato associado ao receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IRAG) e a fosfolamban (Walford e Loscalzo, 2003). A fosforilação do IRAG resulta na inibição da atividade do receptor de IP3, suprimindo a liberação de

cálcio para o citoplasma, enquanto a fosforilação da fosfolamban desencadeia o seu efeito inibitório sobre a retículo sarcoplasmático ATPase (SERCA), promovendo o sequestro de cálcio no retículo sarcoplasmático (Francis *et al.*, 2010). A redução das concentrações de cálcio como resultado destas múltiplas fosforilações provoca uma diminuição da formação do complexo cálcio-calmodulina, favorecendo o relaxamento do músculo liso vascular (Horowitz *et al.*, 1996). Ainda, a PKG-1 pode ativar a fosfatase da cadeia leve de miosina, reduzindo a fosforilação da cadeia leve de miosina e contribuindo assim para a vasodilatação (Surks *et al.*, 1999).

O NO produzido pela eNOS é importante na regulação da pressão arterial, na distribuição do fluxo sanguíneo, inibição da ativação das plaquetas e dos leucócitos, e na inibição da proliferação das células musculares lisas (Moncada e Higgs, 1993).

A síntese e as ações vasculares do NO estão resumidas na figura 1.

Figura 1. Mecanismos envolvidos na síntese, e na vasodilatação gerada pelo NO devido a diminuição das concentrações de cálcio na célula muscular lisa. Na célula endotelial o NO é formado a partir da L-arginina. A partir da ativação da guanilato ciclase solúvel, o NO ativa a PKG e por uma sequência de fosforilações, as concentrações de cálcio diminuem, gerando uma vasodilatação. Adaptado de (Oliveira-Paula *et al.*, 2016).

1.3. Formação de óxido nítrico independente das NOS

O NO formado a partir das NOS é metabolizado a nitrito e este é rapidamente oxidado a nitrato. O nitrito e o nitrato foram considerados apenas metabólitos do óxido nítrico (Lauer *et al.*, 2001) e poluentes ambientais (Tang *et al.*, 2011) até o século XX. Inclusive, a ambos foram atribuídos efeitos tóxicos associados à formação de N-nitrosaminas e metahemoglobina (Tang *et al.*, 2011). Porém, estes conceitos clássicos têm sido revisados, uma vez que vários estudos têm sugerido que o nitrito pode ser convertido a NO (Toledo e Augusto, 2012), abrindo a possibilidade para a formação de NO por uma via independente das NOS e que envolve a chamada via nitrato-nitrito-NO (Gladwin *et al.*, 2005; Lundberg *et al.*, 2008). Estudos no começo do século XXI demonstraram que tanto o nitrito quanto o nitrato exercem importantes papéis fisiológicos e farmacológicos (Bjorne *et al.*, 2004; Lundberg e Weitzberg, 2010; Montenegro *et al.*, 2011) particularmente em doenças cardiovasculares (Dias-Junior *et al.*, 2006; Dejam *et al.*, 2007). Dentre estas doenças, destacamos a hipertensão, onde foram demonstrados os efeitos anti-hipertensivos do nitrito e do nitrato de sódio, tanto em animais quanto em estudos clínicos (Kapil *et al.*, 2010; Carlstrom *et al.*, 2011; Montenegro *et al.*, 2011; Ghosh *et al.*, 2013).

Estudos iniciais sugeriram que o nitrato é reduzido a nitrito e este, então, a óxido nítrico (Weitzberg e Lundberg, 1998; Zweier *et al.*, 1999; Cosby *et al.*, 2003; Lundberg e Govoni, 2004; Lundberg e Weitzberg, 2005). A conversão de nitrito a óxido nítrico em meio ácido estimulou a sugestão da formação de NO por uma via independente das NOS, que envolve o chamado ciclo êntero-salivar do nitrato, também conhecido por via nitrato-nitrito-NO (Lundberg *et al.*, 2008).

1.4. Ciclo êntero-salivar do nitrato

O nitrato presente no organismo, resultado da oxidação do NO ou ingerido através da dieta, é secretado com a saliva na cavidade oral, podendo ser reduzido a nitrito por bactérias orais (Lundberg e Govoni, 2004). O nitrito é então deglutido e ao entrar em contato com o pH ácido do estômago é convertido a HNO_2 , que é instável e pode subsequentemente gerar NO livre (equações 1, 2 e 3) (Kevil *et al.*, 2011).

O nitrito remanescente é rapidamente absorvido, podendo ser convertido a NO no sangue e nos tecidos por nitrito-redutases (Kim-Shapiro e Gladwin, 2014). O NO e o nitrito são finalmente oxidados a nitrato, o qual pode ser excretado ou entrar novamente na circulação, reiniciando o ciclo êntero-salivar (Lundberg e Govoni, 2004). Vale ressaltar ainda que o N_2O_3 e o NO^+ formados a partir dessas reações, são potentes agentes nitrosantes (Broniowska e Hogg, 2012; Maron *et al.*, 2013), podendo reagir com grupos tiólicos livres e formar nitrosotióis, conforme será descrito posteriormente. Assim, a via nitrato-nitrito-NO se apresenta como uma via alternativa e complementar à produção enzimática clássica de NO a partir das NOS (Lundberg *et al.*, 2008). O ciclo êntero-salivar do nitrato esta esquematizado na figura 2.

Figura 2. Ciclo entero-salivar do nitrato. O nitrato é reduzido a nitrito na cavidade oral, e este é reduzido a óxido nítrico e outras espécies nitrosantes no ambiente ácido do estômago. Essas espécies formadas nitrosilam proteínas e geram vasodilatação. O restante é oxidado a nitrato, voltando ao ciclo. Adaptado de (Pinheiro *et al.*, 2017).

1.5. Efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio

Com base no ciclo entero-salivar do nitrato, estudos surgiram a fim de explorar as possibilidades terapêuticas do uso do nitrito e do nitrato em doenças cardiovasculares (Machha e Schechter, 2011). Foi demonstrado que o tratamento crônico com nitrito de sódio reduziu a pressão arterial em ratos hipertensos N^w -nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) (Tsuchiya *et al.*, 2010; Montenegro *et al.*, 2014), 2R1C (Montenegro *et al.*, 2011; Montenegro *et al.*, 2012) e desoxicorticosterona (DOCA) sal (Amaral *et al.*, 2015). Contudo, até o momento a literatura não apresenta um mecanismo claro que explique os efeitos anti-hipertensivos do nitrito.

Um possível mecanismo seria sua conversão a NO no ambiente ácido estomacal (Lundberg *et al.*, 1994). De fato, apesar do curto tempo de meia-vida plasmática do nitrito (5 a 40 minutos) (Van Faassen *et al.*, 2009), o ciclo nitrato-

nitrito-NO permite a manutenção das concentrações de nitrito em contato com o suco gástrico para a formação de NO e espécies nitros(il)adas por um período de 3 a 5 horas (Kapil *et al.*, 2010), relativo à duração do ciclo. Após este período, as concentrações de nitrito e nitrato vão diminuindo, até que em 24 horas estas voltam aos valores basais (Montenegro *et al.*, 2011). Apesar disso, os efeitos anti-hipertensivos do nitrito ainda são mantidos após este período, sugerindo que estes não dependem diretamente das concentrações circulantes de nitrito. Tomadas em conjunto, estas evidências sugerem que outros mecanismos estão envolvidos com os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que o aumento do pH gástrico produzido pelo omeprazol (um inibidor da bomba gástrica de prótons) atenua os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio administrado por via oral (Pinheiro *et al.*, 2015). Esta atenuação não foi acompanhada por uma redução nos níveis circulantes de nitrito. Por outro lado, o tratamento com nitrito promoveu o aumento dos níveis de nitrosotióis, os quais foram atenuados com o tratamento concomitante com omeprazol. Portanto é possível que o efeito anti-hipertensivo do nitrito, pelo menos em parte, seja pela formação de nitrosotióis no estômago.

Embora estudos sugiram que o NO não seja capaz de reagir diretamente com grupos tiólicos e formar nitrosotióis in vivo (Broniowska e Hogg, 2012; Toledo e Augusto, 2012), a reação do nitrito no meio ácido estomacal resulta na formação de espécies nitrosantes, como por exemplo, o N_2O_3 (equação 2) e NO^+ , as quais estão envolvidas na formação de nitrosotióis (Bjorne *et al.*, 2005; Tsuchiya *et al.*, 2005; Bjorne *et al.*, 2006). De fato, N_2O_3 , assim como o NO^+ , são potentes agentes nitrosantes (Broniowska e Hogg, 2012; Maron *et al.*, 2013), que podem reagir com os grupos tiólicos de cisteínas, por meio do ataque ao ânion tiolato reduzido (RS^-),

formando o produto S-nitrosilado e nitrito (Wink *et al.*, 1994; Broniowska e Hogg, 2012) (Equação 4).

Os nitrosotíóis gerados podem ser proteicos (entre eles, a S-nitrosoalbumina) e não-proteicos (dentre os quais se destacam S-nitrosoglutationa (GSNO) e S-nitrosocisteína (CSNO)), esta última capaz de atravessar a membrana celular (Hogg, 2000; Broniowska e Hogg, 2012). Ambos GSNO e CSNO são capazes de nitrosilar proteínas por reações de transnitrosilação, em que o grupo S-nitroso funcional pode ser transferido ao ânion tiolato em uma reação reversível, conforme apresentado na equação 5 (Broniowska e Hogg, 2012).

A S-nitrosilação é uma modificação pós-traducional que está criticamente envolvida na sinalização de eventos biológicos, afetando tanto a fisiologia quanto a fisiopatologia (Maron *et al.*, 2013; Kalous *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Moon *et al.*, 2017). De fato, evidências apontam que o aumento ou a redução da S-nitrosilação de proteínas-alvo desempenha um importante papel na fisiopatologia de doenças associadas a alterações na sinalização redox, tais como hipertensão, infarto e aterosclerose (Kumar *et al.*, 2012). Neste contexto, agentes terapêuticos capazes de modular a S-nitrosilação poderiam ter ampla utilidade clínica (Hess *et al.*, 2005).

Embora pouco explorada até o momento, a S-nitrosilação exerce papel chave no mecanismo de transdução de sinal, com efeitos importantes sobre a função de

proteínas que regulam a biologia celular, a função de órgãos, e respostas às drogas (Stamler, 1994; Hess *et al.*, 2005).

1.6. Associação entre nitrito de sódio e antioxidantes

Um antioxidante é uma molécula capaz de impedir ou atrasar a oxidação de outras moléculas, assim eles previnem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e melhoram sua metabolização (Wilcox, 2010). Estudos vêm sugerindo que na presença de antioxidantes com propriedades redutoras há maior formação de NO a partir do nitrito (Rocha *et al.*, 2009; Amaral *et al.*, 2013).

O TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl) é um antioxidante com capacidade redutora, permeável às membranas celulares, o trato gastrointestinal e a barreira hematoencefálica. Com a capacidade de metabolizar ânions superóxido (O_2^-), formando peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o TEMPOL é um mimético da superóxido dismutase (SOD) (Wilcox, 2010). Sua eficácia na catalisação do metabolismo do O_2^- celular foi semelhante à SOD nativa (Wilcox, 2010).

Amaral *et al* 2013 mostraram que a administração prévia de TEMPOL resultou em potencialização do efeito anti-hipertensivo do nitrito agudamente no modelo de hipertensão induzido por L-NAME, além de aumentos nas concentrações do nitrito plasmático. Também foi mostrado a potencialização da formação de NO *in vitro* a partir do nitrito de sódio (Amaral *et al.*, 2013), assim como já havia sido demonstrado na presença de outros antioxidantes.

1.7. Hipertensão arterial e aumento das EROs

O estresse oxidativo é representado pelo aumento na produção de EROs, juntamente com a diminuição da capacidade antioxidante vascular, e pode ser causa ou consequência da hipertensão (Touyz e Briones, 2011). A principal espécie é o ânion superóxido (O_2^-), derivado da enzima β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) oxidase (Lundberg *et al.*, 1994), a qual é ativada pela Angiotensina II (Ang II) durante a hipertensão arterial (Mcknight *et al.*, 1997). Quando em excesso, o O_2^- reage rapidamente com o NO vascular levando a formação de espécies pró-oxidantes, como o peroxinitrito ($ONOO^-$). Assim, há redução da biodisponibilidade do NO na parede do vaso, com prejuízo no vasorelaxamento dependente do endotélio.

1.8. Estado redox do organismo e metabólitos do óxido nítrico

Sabemos que o estado redox do organismo influencia a formação dos metabólitos do NO (nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas) e em como elas serão disponibilizadas no caso de algumas doenças como a hipertensão (Kumar *et al.*, 2012). Além disso, agentes redutores podem facilitar a formação de NO a partir do nitrito (Samouilov *et al.*, 1998). Sendo assim, é provável que antioxidantes possam potencializar os efeitos anti-hipertensivos do nitrito, e doenças como a hipertensão, possam comprometer a biodisponibilidade dos metabólitos do NO. Entretanto, poucos estudos têm examinado as implicações cardiovasculares e até mesmo sistêmicas da interação entre antioxidantes com propriedades redutoras e nitrito.

Além disso, não há estudos na literatura que mostrem as concentrações dos metabólitos do óxido nítrico nos tecidos, em intervalos de tempo, por um período de até 24 horas após a administração de nitrito. Sendo assim, acreditamos que há a

necessidade de se estudar a interação entre nitrito de sódio e TEMPOL a nível sistêmico, avaliando como este último age sobre as concentrações de metabólitos do óxido nítrico em diferentes tecidos, em diferentes tempos e em situações fisiológicas e na hipertensão.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Diante do exposto, a hipótese do presente estudo é a de que a administração de nitrito de sódio promove aumentos nas concentrações de nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas, as quais são potencializadas pelo TEMPOL, além de sofrerem a influência de alterações fisiopatológicas como as que ocorrem na hipertensão.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- Verificar as concentrações de nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas em animais normotensos tratados com nitrito de sódio em curtos intervalos de tempo de até 24 horas;
- Verificar como o pré-tratamento com TEMPOL altera essas concentrações nos mesmos intervalos de tempo;
- Comparar as concentrações de nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas em animais normotensos e hipertensos após 15 minutos de tratamento com nitrito de sódio;
- Comparar as alterações geradas pelo pré-tratamento com TEMPOL nessas concentrações nos animais normotensos e hipertensos

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações gerais

O estudo foi feito de acordo com o comitê de ética animal da FMRP-USP (Processo 065/2016). Ratos wistar machos com peso entre 200g e 250g foram obtidos da colônia da USP e mantidos em períodos de 12h de luz a 25°C, com acesso livre a comida e água.

4.2 Abordagem experimental I

Com o objetivo de determinar as concentrações dos metabólitos do óxido nítrico e a influência do antioxidante TEMPOL sobre essas concentrações, foi então administrado TEMPOL 18mg/Kg (Amaral *et al.*, 2013) por gavagem a ratos normotensos, e após 15 minutos, nitrito de sódio 15 mg/kg (Pinheiro *et al.*, 2012) também por gavagem (**Grupo TEMPOL+Nitrito**). Posteriormente os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina (100mg/kg, e 10mg/Kg i.p.) (Montenegro *et al.*, 2011) e eutanasiados após 15 minutos, 30 minutos, 2 horas e 24 horas da administração de nitrito de sódio. Um grupo recebeu apenas TEMPOL e os animais foram eutanasiados 15 minutos depois (**Grupo Basal-TEMPOL**). Outro grupo de ratos recebeu água e 15 minutos após, nitrito de sódio, e foram eutanasiados após os mesmos intervalos de tempo (15 minutos, 30 minutos, 2 horas e 24 horas) (**Grupo Nitrito**). Outro grupo não recebeu nenhum tratamento e foi eutanasiado para a coleta de tecidos (**Grupo Basal-Nitrito**). Os grupos estão representados na figura 3. Foram 4 grupos experimentais, com um n amostral de 8 animais por grupo, totalizando 32 animais.

Figura 3. Abordagem experimental I.

4.3 Coletas de tecidos

Após a anestesia foi coletado sangue por punção do ventrículo esquerdo. O sangue foi centrifugado por 4 minutos, a 3000 RPM, 4°C. O plasma foi separado, aliquotado em tubo âmbar contendo NEM (10mM) e DTPA (2mM) para conservação das espécies nitros(il)adas. Na mesma punção cardíaca foi realizada a perfusão completa com PBS pH 7,4 adicionado de NEM (10mM) e DTPA (2mM) (Bryan *et al.*, 2004). Após completa perfusão os seguintes tecidos foram extraídos: coração, aorta, fígado e estômago. Todas as amostras foram congeladas imediatamente após a extração e guardadas a -80°C para posteriores análises bioquímicas.

4.4 Abordagem experimental II

Com o objetivo de comparar as alterações do estado redox gerada pela hipertensão com a situação fisiológica, e como o TEMPOL interfere em ambos os casos, ratos foram submetidos à cirurgia 2 rins 1 clipe (2R1C, que consiste na indução de estenose da artéria renal direita por meio de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm. Os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina (100mg/kg, e 10mg/Kg i.p.) e a cirurgia foi realizada conforme descrito anteriormente (Pinheiro *et al.*, 2015) e ao final do procedimento os animais passaram por analgesia com Fluxinameglumina (2,5 mg/kg, s.c.) e receberam o antibiótico Terramicina (50 mg/kg, i.m.). Os animais que passaram pela cirurgia fictícia, compuseram o grupo Sham.

4.5 Medidas de pressão arterial

O monitoramento da pressão arterial foi feito por duas semanas, até o estabelecimento da hipertensão. Os animais que apresentaram pressão sistólica inferior a 160 mm/Hg ao final da segunda semana, foram excluídos do estudo.

As medidas de pressão arterial foram feitas em um aparelho de pletismografia de cauda usando um Pletismógrafo (CODA, KENT scientific). Após as duas semanas de hipertensão, os animais foram tratados conforme descrito na abordagem experimental I, descrito na sessão 4.2.; no entanto mantemos apenas o tempo de 15 minutos entre o tratamento com nitrito de sódio e a eutanásia. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e perfundidos da mesma forma que na abordagem experimental I, descrito na sessão 4.2, e tiveram os mesmos tecidos coletados. Os grupos experimentais e os tratamentos estão representados na figura 4.

Figura 4. Abordagem experimental II.

4.6 Abordagem experimental III

A fim de monitorarmos a pressão invasiva durante os mesmos intervalos de tempo utilizados na abordagem experimental I, ratos hipertensos 2R1C, com 2 semanas de hipertensão e animais Sham, foram anestesiados e tiveram a artéria femoral canulada para o monitoramento da pressão arterial sistólica (Pinheiro *et al.*) em tempo real (Amaral *et al.*, 2015).

4.6.1 Inserção da cânula

Os animais foram canulados conforme padronizado em nosso laboratório (Amaral *et al.*, 2015). Resumidamente, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.) (Pinheiro *et al.*, 2014), foi feita uma pequena incisão na região inguinal, e inserido um cateter na artéria femoral e exteriorizado no dorso

do animal para avaliação da pressão arterial em tempo real. Após a cirurgia, o animal recebeu analgesia (Fluxinameglumina 2,5 mg/kg, s.c.).

4.6.2 Experimento

Após 6 horas do término na cirurgia, o cateter inserido na artéria femoral foi acoplado a um transdutor de pressão, conectado a um sistema de aquisição de dados modelo MP150CE (Biopac Systems Inc. CA,USA) (Pinheiro *et al.*, 2012). Após 15 minutos de estabilização, a pressão arterial sistólica foi anotada. Em seguida, administramos TEMPOL (18 mg/kg) ou veículo por gavagem, e após 15 minutos, nitrito de sódio (15 mg/kg) ou veículo também por gavagem. A PAS foi monitorada por 24 horas e os valores nos tempo de 15 minutos, 30 minutos, 2 horas e 24 horas após o tratamento com nitrito de sódio foram anotados. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico.

4.7 Determinações das concentrações plasmáticas e teciduais de nitritos e espécies nitros(il)adas

O plasma foi utilizado in natura para análise e o tecido coletado foi macerado em macerador de vidro com PBS pH 7,4 adicionado de NEM(10mM) e DTPA(2mM) (Feelisch *et al.*, 2002). A suspensão resultante foi analisada, assim como as amostras de plasma pelo método de quimiluminescência através de ozônio. Resumidamente, as amostras, 50 µL de plasma e 250 µL de tecido macerado, foram injetadas em duplicatas no aparelho contendo solução de iodo acidificada. O NO formado então é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO. (Sievers Modelo 280 NO analyzer, Boulder, CO). Os dados obtidos foram analisados pelo

programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) (Feelisch *et al.*, 2002; Bryan *et al.*, 2004).

A quantificação de espécies nitros(il)adas, foi realizada conforme descrito acima, porém 500 µL das amostras foram utilizadas. As amostras foram pré-encubadas com sulfanilamida ácida (5% em ácido clorídrico) na proporção de 10% do volume da amostra. Após 5 minutos de reação, a amostra foi injetada no analisador como descrito acima. Os dados obtidos foram analisados pelo programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) (Feelisch *et al.*, 2002; Bryan *et al.*, 2004), e os resultados obtidos para os tecidos, foram corrigidos pelo peso do tecido macerado.

4.8 Determinação da concentração de espécies nitros(il)adas na aorta

Devido à baixa quantidade de tecido, a determinação de espécies nitros(il)adas na aorta foi feita por SNO-RAC. A técnica baseia-se na captura de resíduos S-nitrosilados (RSNO) através da resina tiopropilsefaroze (Forrester *et al.*, 2009) e foi realizada conforme descrito previamente (Pinheiro *et al.*, 2016). Os homogenatos de tecido, que possuem ou não proteínas S-nitros(il)adas, sofreram processo de desnaturação com SDS 2,5% e bloqueio dos tióis livres por metilmetanotiosulfonato (MMTS) 20mM. Em seguida, a amostra foi encubada com ascorbato 20 mM, que degrada os nitrosotióis, e resina tiopropilsefaroze para marcar os tióis livres. Os tióis foram desligados da resina com o agente redutor 2-mercaptoetanol 2%, e as proteínas nitros(il)adas ficaram no sobrenadante. Este foi utilizado para identificação das proteínas nitros(il)adas totais por SDS-PAGE utilizando Coomassie Blue 0,05%, com posterior quantificação pelo programa ImageJ.

4.9 Determinação da concentração plasmática e tecidual de nitratos

As determinações das concentrações plasmáticas de nitrato foram obtidas pela subtração dos valores de nitrito dos respectivos de valores NO_x (Nitrito+Nitrato). As amostras previamente preparadas para a análise de nitrito foram posteriormente utilizadas para a quantificação de nitrato. Para a determinação de NO_x foi utilizada a reação de Griess descrita previamente (Amaral *et al.*, 2015). O plasma foi utilizado *in natura* e os tecidos foram macerado em PBS pH 7,4. Utilizamos 40 µl de amostra encubados com 40 µl de tampão com nitrato redutase. As amostras foram encubadas 12 horas a 37°C e protegidas da luz. Depois foi adicionado 80 µl de reagente de Griess. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm. Os resultados dos tecidos foram normalizados pelo peso dos mesmos.

4.10 Análise dos resultados

Os dados foram apresentados como média $\pm$ EPM. Os resultados foram analisados por análise de variância de um ou dois fatores seguida por pós-teste de Tukey. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Abordagem experimental I

Com a abordagem experimental I podemos observar as concentrações de nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas após a administração de nitrito de sódio em animais normotensos pré-tratados ou não com TEMPOL.

5.1.1 Plasma

Na figura 5A, observamos que os níveis de nitrito plasmático aumentaram significativamente 15 minutos após a administração de nitrito de sódio (de $1\pm0,2$ $\mu\text{mol/L}$ para $36\pm4,3$ $\mu\text{mol/L}$). Esse aumento é intensificado após 30 minutos ($61\pm12,6$ $\mu\text{mol/L}$). Passadas 2 horas, as concentrações de nitrito ($6\pm1,2$ $\mu\text{mol/L}$) não apresentam diferença significativa dos valores basais e permanecem sem alterações significativas por até 24 horas após a administração de nitrito de sódio ($1\pm0,2$ $\mu\text{mol/L}$). Com a administração prévia de TEMPOL, verificamos um aumento significativo após 15 minutos da administração de nitrito de sódio (de $2\pm0,4$ $\mu\text{mol/L}$ para 73 ± 11 $\mu\text{mol/L}$), e este aumento é significativamente maior comparado ao grupo que não recebeu TEMPOL (73 ± 11 $\mu\text{mol/L}$ *versus* $36\pm4,3$ $\mu\text{mol/L}$). Com 30 minutos não observamos mais diferença significativa entre os animais pré-tratados ou não com TEMPOL (55 ± 11 $\mu\text{mol/L}$ *versus* $61\pm12,6$ $\mu\text{mol/L}$ respectivamente), e assim se mantiveram por 2 horas ($5\pm0,6$ $\mu\text{mol/L}$ *versus* $6\pm1,2$ $\mu\text{mol/L}$) e 24 horas ($2\pm0,4$ $\mu\text{mol/L}$ *versus* $1\pm0,1$ $\mu\text{mol/L}$).

Com relação às espécies nitros(il)adas (figura 5B), observamos que as concentrações basais no grupo nitrito, chegam a $20\pm2,7$ nmol/L *versus* $62\pm7,6$ nmol/L no grupo TEMPOL+nitrito, e aumenta para $47\pm8,8$ nmol/L *versus* 100 ± 18

nmol/L, respectivamente, após 15 minutos da administração de nitrito de sódio. Aos 30 minutos após a administração de nitrito de sódio as concentrações estão em $56 \pm 8,6$ nmol/L no grupo TEMPOL+nitrito *versus* $51 \pm 10,6$ nmol/L no grupo Nitrito. Com 2 horas os valores decaem em ambos os grupos ($21 \pm 2,6$ nmol/L no grupo Nitrito *versus* $57 \pm 5,5$ nmol/L no grupo TEMPOL+nitrito), e estão em $11 \pm 0,8$ nmol/L no grupo Nitrito *versus* 54 ± 6 nmol/L no grupo TEMPOL+nitrito, 24 horas após a administração de nitrito de sódio. O pré-tratamento com TEMPOL potencializou significativamente os aumentos de RXNO gerados pela administração de nitrito em todos os tempos, com exceção dos 30 minutos.

Com relação às concentrações de nitrato (figura 5C), o perfil das concentrações plasmáticas foi muito similar em ambos os grupos. Os valores de nitrato dobraram após 15 minutos da administração de nitrito de sódio no grupo Nitrito (de 64 ± 17 μ mol/L para 115 ± 21 μ mol/L), e se mostraram similares aos valores do grupo TEMPOL+nitrito (de $46 \pm 7,8$ μ mol/L para 100 ± 12 μ mol/L). Após 30 minutos da administração, os valores se mantiveram (120 ± 11 μ mol/L no grupo Nitrito *versus* 105 ± 15 μ mol/L no grupo TEMPOL+nitrito), apresentando uma queda com 2 horas (100 ± 6 μ mol/L no grupo Nitrito *versus* 70 ± 7 μ mol/L no grupo TEMPOL+nitrito) e retornaram aos valores basais após 24 horas da administração em ambos os grupos (42 ± 9 μ mol/L no grupo Nitrito *versus* 52 ± 14 μ mol/L no grupo TEMPOL+nitrito).

Figura 5. Concentrações plasmáticas de nitrito (A), espécies nitros(il)adas (RXNO) (B) e nitrato (C) em ratos que receberam nitrito (15 mg/kg) e foram pré-tratados ou não com TEMPOL (18mg/kg) 15 min antes. As amostras de plasma foram coletadas 15 min, 30 min, 2 h e 24 h após a dose de nitrito. Dados expressos por média $\pm$ EPM (n=6-9 por grupo). * $p < 0,05$ para TEMPOL+Nitrito ou Nitrito versus Basal. # $p < 0,05$ para TEMPOL+Nitrito versus Nitrito. \$\$ $p < 0,05$ para o tempo.

5.1.2 Aorta

Na figura 6A, observamos que as concentrações de nitrito na aorta tendem a se manter constantes e aumentar após 2 horas da administração de nitrito de sódio em ambos os grupos. Com 15 minutos após a administração de nitrito de sódio os valores foram de $10 \pm 0,8$ pmol/mg para $14 \pm 0,4$ pmol/mg no grupo Nitrito e 20 ± 5 pmol/mg para 18 ± 5 pmol/mg no grupo TEMPOL+nitrito. Com 30 minutos foram para 10 ± 2 pmol/mg no grupo Nitrito e 19 ± 4 pmol/mg no TEMPOL+nitrito. Com 2 horas os valores foram de 22 ± 5 pmol/mg no grupo Nitrito e 18 ± 3 pmol/mg no grupo TEMPOL+nitrito. Com 24 horas houve um aumento, e as concentrações nos grupos Nitrito e TEMPOL+nitrito foram 26 ± 6 pmol/mg e 27 ± 9 pmol/mg respectivamente.

Na figura 6B vemos a porcentagem de proteínas nitros(il)adas na aorta, e curiosamente não há diferença significativa nas porcentagens em nenhum dos tempos após administração de nitrito de sódio, e também não há diferenças entre os grupos pré-tratado ou não com TEMPOL. Em todos os grupos e nos diferentes intervalos de tempo entre a administração e a eutanásia, a porcentagem de nitros(il)ação na aorta foi de aproximadamente $20 \pm 2\%$.

Com relação às concentrações de nitrato (figura 6C), o grupo pré-tratado com TEMPOL apresenta valores menores que o grupo que recebeu apenas nitrito. Esse é um resultado esperado, uma vez que as concentrações de nitrito e nitrato no organismo tendem a ser inversamente proporcionais. Nos animais pré-tratados com TEMPOL, as concentrações de nitrato se mantiveram em 60 ± 11 μ mol/mg, com exceção de 24 horas após a administração de nitrito de sódio, em que as concentrações de nitrato caíram para $26 \pm 4,6$ μ mol/mg. Os animais que não foram pré-tratados com TEMPOL possuem concentrações de aproximadamente 34 ± 7 μ mol/mg em todos os tempos.

Figura 6. Concentrações na aorta de nitrito (A), nitrato (B) e porcentagem de nitros(il)ação (C) e em ratos que receberam nitrito (15 mg/kg) e foram pré-tratados ou não com TEMPOL (18mg/kg) 15 min antes. As amostras de aorta foram coletadas 15 min, 30 min, 2 h e 24 h após a dose de nitrito. Imagem representativa da técnica de SNO-RAC dos animais Sham (normotensos), em que "i"=input (homogenato de tecido total) e "o"= output (proteínas nitros(il)adas extraídas) (D). Dados expressos por média $\pm$ EPM ($n=6-9$ por grupo). \$ $p<0,05$ para TEMPOL+Nitrito. # $p<0,05$ para TEMPOL+Nitrito versus Nitrito.

5.1.3 Coração

No coração vemos um comportamento parecido com o plasma com relação às concentrações de nitrito (figura 7A), entretanto há um maior aumento no tempo de 30 minutos no grupo Nitrito, enquanto no grupo TEMPOL+nitrito, o maior aumento foi observado no tempo de 15 minutos. A partir de 2 horas as concentrações retornam aos valores basais. No grupo Nitrito as concentrações foram de $2 \pm 0,3$ pmol/mg (valores basais) para 10 ± 2 pmol/mg em 15 minutos após a administração de nitrito de sódio. Com 30 minutos os valores foram para 14 ± 3 pmol/mg, e para $4 \pm 0,6$ pmol/mg em 2 horas e $2,3 \pm 0,4$ pmol/mg em 24 horas. A partir das 2 horas os valores não apresentam diferença significativa em relação aos valores basais. No grupo TEMPOL+nitrito os valores foram de $4 \pm 0,7$ pmol/mg (valores basais) para 25 ± 5 pmol/mg após 15 minutos do tratamento com nitrito de sódio, sendo significativamente maior que o grupo Nitrito. Após 30 minutos da administração de nitrito de sódio, os valores foram para 17 ± 2 pmol/mg; para $4 \pm 0,7$ pmol/mg após 2 horas e para $3 \pm 1,2$ pmol/mg após 24 horas. A partir dos 30 minutos não há diferença significativa entre os grupos Nitrito e TEMPOL+nitrito.

Com relação às espécies nitros(il)adas (RXNO) no coração (figura 7B), o que observamos é que o grupo pré-tratado com TEMPOL apresenta a sua curva de concentração deslocada para a direita em comparação ao grupo Nitrito. Os valores no grupo Nitrito foram de $0,2 \pm 0,07$ pmol/mg, $4 \pm 1,1$ pmol/mg, $3 \pm 0,9$ pmol/mg, $1 \pm 0,3$ pmol/mg e $0,3 \pm 0,09$ pmol/mg, no basal e nos intervalos de 15 minutos, 30 minutos, 2 horas e 24 horas respectivamente. Enquanto isso no grupo TEMPOL+nitrito os valores foram $0,2 \pm 0,03$ pmol/mg, $2 \pm 0,6$ pmol/mg, $4 \pm 0,9$ pmol/mg, $0,2 \pm 0,02$ pmol/mg e $0,3 \pm 0,04$ pmol/mg, no basal e nos intervalos de 15 minutos, 30 minutos, 2 horas e 24 horas respectivamente. Houve diferença significativa entre o grupo Nitrito e

TEMPOL+nitrito apenas no intervalo de 15 minutos, em que as concentrações de RXNO do grupo Nitrito foram maiores que as concentrações dos animais pré-tratados com TEMPOL.

As concentrações de nitrato no coração (figura 7C) foram de aproximadamente $22,5 \pm 2,3$ $\mu\text{mol/mg}$, e esse valor não foi alterado pela administração de nitrito e nem pelo pré-tratamento com TEMPOL.

Figura 7. Concentrações no coração de nitrito (A), RXNO (B) e nitrato (C) em ratos que receberam nitrito (15 mg/kg) e foram pré-tratados ou não com TEMPOL (18mg/kg) 15 min antes. As amostras de coração foram coletadas 15 min, 30 min, 2 h e 24 h após a dose de nitrito. Dados expressos por média $\pm$ EPM (n=6-9 por grupo). * $p < 0,05$ para TEMPOL+Nitrito ou Nitrito *versus* Basal. # $p < 0,05$ para TEMPOL+Nitrito *versus* Nitrito.

5.1.4 Estômago

No estômago as concentrações basais de nitrito foram $4 \pm 0,87$ pmol/mg (figura 8A). Após 15 minutos da administração de nitrito de sódio os valores foram para $105 \pm 20,7$ pmol/mg no grupo nitrito, chegando a 182 ± 53 pmol/mg após 30 minutos da administração. Com 2 horas há uma queda (16 ± 3 pmol/mg), chegando próximo ao valor basal. Após 24 horas as concentrações retornam aos valores basais (6 ± 1 pmol/mg). As concentrações de nitrito nos animais pré-tratados com TEMPOL não diferiu significativamente em nenhum dos intervalos, com exceção do tempo 15 minutos, em que os animais pré-tratados com TEMPOL tiveram 225 ± 65 pmol/mg *versus* $105 \pm 20,7$ pmol/mg nos animais que não foram pré-tratados.

As concentrações de RXNO (figura 8B) no estômago não variaram diante do pré-tratamento ou não com TEMPOL. Os valores basais foram de $0,8 \pm 0,1$ pmol/mg, aumentado para $16 \pm 3,4$ pmol/mg com 15 minutos após a administração, ficando em $15 \pm 3,3$ pmol/mg com 30 minutos, $4 \pm 1,5$ pmol/mg após 2 horas e $0,5 \pm 0,1$ pmol/mg em 24 horas após a administração de nitrito de sódio em ambos os grupos.

As concentrações de nitrato (figura 8C) não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos intervalos e nem com o pré-tratamento com TEMPOL. Entretanto vemos uma tendência a um aumento mais rápido no grupo TEMPOL+Nitrito, e esse aumento se mantém até o intervalo de 24 horas. No grupo Nitrito observamos um pequeno aumento mais tardio. As concentrações variaram de 20 a 30 pmol/mg em ambos os grupos.

Figura 8. Concentrações no estômago de nitrito (A), RXNO (B) e nitrato (C) em ratos que receberam nitrito (15 mg/kg) e foram pré-tratados ou não com TEMPOL (18mg/kg) 15 min antes. As amostras de estômago foram coletadas 15 min, 30 min, 2 h e 24 h após a dose de nitrito. Dados expressos por média $\pm$ EPM (n=6-9 por grupo). * $p < 0,05$ para TEMPOL+Nitrito ou Nitrito *versus* Basal. # $p < 0,05$ para TEMPOL+Nitrito *versus* Nitrito.

5.1.5 Fígado

No fígado as concentrações de nitrito são maiores no grupo Nitrito que no grupo TEMPOL (figura 9A), apresentando um comportamento diferente dos outros tecidos. O maior aumento no grupo Nitrito ocorreu em 15 minutos após a administração de nitrito de sódio, indo de $0,7 \pm 0,17$ pmol/mg no valor basal para $18 \pm 3,5$ pmol/mg. No mesmo intervalo de tempo, as concentrações no grupo TEMPOL+nitrito foram $8,7 \pm 1,7$ pmol/mg. Com 2 horas após a administração, as concentrações estão próximas a $8 \pm 1,6$ pmol/mg em ambos os grupos. Passadas 24 horas da administração de nitrito de sódio, os valores ficaram próximos aos valores basais em ambos os grupos ($1 \pm 0,4$ pmol/mg). Houve diferença significativa entre os grupos apenas no intervalo de 15 minutos ($18 \pm 3,5$ pmol/mg no grupo Nitrito *versus* $8 \pm 1,7$ pmol/mg no grupo TEMPOL+nitrito).

As concentrações de RXNO no fígado são similares entre os dois grupos - $0,7 \pm 0,1$ pmol/mg no basal, $13 \pm 2,6$ pmol/mg em 15 minutos, 10 ± 2 pmol/mg em 30 minutos, $3 \pm 0,7$ pmol/mg em 2 horas e $0,8 \pm 0,2$ pmol/mg em 24 horas - não havendo diferença significativa entre eles (figura 9B). Vale ressaltar que as concentrações de RXNO no grupo TEMPOL+nitrito são maiores que as concentrações de nitrito desse mesmo grupo, diferindo dos outros tecidos em que as concentrações de RXNO são menores que as de nitrito.

As concentrações de nitrato (figura 9C) foram de $40 \mu\text{mol/mg}$ a $50 \mu\text{mol/mg}$ e praticamente não se alteram ao longo do tempo após o tratamento com nitrito de sódio em ambos os grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados ou não com TEMPOL.

Figura 9. Concentrações no fígado de nitrito (A), RXNO (B) e nitrato (C) em ratos que receberam nitrito (15 mg/kg) e foram pré-tratados ou não com TEMPOL (18mg/kg) 15 min antes. As amostras de fígado foram coletadas 15 min, 30 min, 2 h e 24 h após a dose de nitrito. Dados expressos por média $\pm$ EPM (n=6-9 por grupo). * $p < 0,05$ para TEMPOL+Nitrito ou Nitrito versus Basal. # $p < 0,05$ para TEMPOL+Nitrito versus Nitrito.

5.2 Abordagem experimental II

Com a abordagem experimental II podemos observar as concentrações de nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas antes e após 15 minutos da administração de nitrito de sódio, em animais normotensos e hipertensos pré-tratados ou não com TEMPOL.

5.2.1 Plasma

A figura 10A apresenta as concentrações de nitrito plasmáticas, e podemos observar um aumento tanto nos animais Sham ($0,9 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$ para $40 \pm 5 \mu\text{mol/L}$ no grupo Água e $2 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$ para $68 \pm 10 \mu\text{mol/L}$ no grupo TEMPOL) quanto nos 2R1C ($1 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$ para $35 \pm 3 \mu\text{mol/L}$ no grupo Água e $0,8 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$ para $28 \pm 2 \mu\text{mol/L}$ no grupo TEMPOL) após a administração de nitrito de sódio. O TEMPOL aumentou significativamente os valores apenas no grupo Sham 15 minutos após o nitrito (de $40 \pm 5 \mu\text{mol/L}$ no grupo Água para $68 \pm 10 \mu\text{mol/L}$ no grupo TEMPOL). Nos níveis basais vemos uma tendência do TEMPOL aumentar as concentrações de nitrito no grupo Sham ($0,9 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$ no grupo Água para $2 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$ no grupo TEMPOL), porém não houve diferença significativa. A hipertensão não diminuiu as concentrações de nitrito no plasma, mas impediu o TEMPOL de potencializar os aumentos como foi observado no grupo Sham.

Em relação às concentrações de RXNO (figura 10B), 15 minutos após a administração de nitrito de sódio há um maior aumento nos animais Sham ($20 \pm 2,7 \text{ nmol/L}$ para $48 \pm 9,7 \text{ nmol/L}$ no grupo Água e $62 \pm 7,6 \text{ nmol/L}$ para $99 \pm 18 \text{ nmol/L}$ no grupo TEMPOL) que nos 2R1C ($15 \pm 4 \text{ nmol/L}$ para $27 \pm 3 \text{ nmol/L}$ no grupo Água e $7 \pm 0,8 \text{ nmol/L}$ para $16 \pm 1,5 \text{ nmol/L}$ no grupo TEMPOL). O TEMPOL potencializou significativamente o aumento após o nitrito de sódio e as concentrações basais nos

animais Sham ($48 \pm 9,7$ nmol/L para 99 ± 18 nmol/L e $20 \pm 2,7$ nmol/L para $62 \pm 7,6$ nmol/L respectivamente), e apresentou uma tendência a diminuir o aumento após o nitrito de sódio e as concentrações basais nos animais 2R1C (27 ± 3 nmol/L para $16 \pm 1,5$ nmol/L e 15 ± 4 nmol/L para $7 \pm 0,8$ nmol/L respectivamente).

Na figura 10C vemos que os valores de nitrato aumentaram com a administração de nitrito de sódio nos animais Sham (64 ± 17 μ mol/L para 115 ± 21 μ mol/L no grupo Água e 46 ± 8 μ mol/L para 100 ± 12 μ mol/L no grupo TEMPOL) quanto nos 2R1C (26 ± 6 μ mol/L para 95 ± 12 μ mol/L no grupo Água e 38 ± 10 μ mol/L para 74 ± 10 μ mol/L no grupo TEMPOL). O TEMPOL não potencializou os aumentos em nenhum dos grupos. Enquanto isso a hipertensão diminuiu todas essas concentrações (64 ± 17 μ mol/L para 26 ± 6 μ mol/L no basal dos animais que receberam água e 46 ± 8 μ mol/L para 38 ± 10 μ mol/L no basal dos animais que receberam TEMPOL, 115 ± 21 μ mol/L para 95 ± 12 μ mol/L após a administração de nitrito de sódio nos animais que receberam veículo e 100 ± 12 μ mol/L para 74 ± 10 μ mol/L após a administração de nitrito de sódio nos animais que receberam TEMPOL).

Figura 10. Concentrações plasmáticas de nitrito (A), RXNO (B) e nitrato (C) em animais SHAM e 2R1C, antes e após o tratamento com nitrito, pré-tratados ou não com TEMPOL. Dados expressos em média $\pm$ EPM ($n=6-8$). * $p<0,05$ Água versus TEMPOL. # $p<0,05$ para hipertensão.

5.2.2 Aorta

Na aorta, a administração de nitrito não aumentou significativamente as concentrações de nitrito 15 minutos após a administração nos animais Sham ($10 \pm 0,8$ pmol/mg para 14 ± 4 pmol/mg no grupo Água e 20 ± 5 pmol/mg para $14 \pm 2,6$ pmol/mg no grupo TEMPOL), assim como nos 2R1C ($20 \pm 2,4$ pmol/mg para $16 \pm 3,5$ pmol/mg no grupo Água e 14 ± 4 pmol/mg para 20 ± 4 pmol/mg no grupo TEMPOL) (figura 11A). O TEMPOL aumentou as concentrações basais de nitrito nos animais Sham ($10 \pm 0,8$ pmol/mg para 20 ± 5 pmol/mg) e diminuiu nos animais 2R1C ($20 \pm 2,4$ pmol/mg para 14 ± 4 pmol/mg).

A porcentagem de proteínas nitros(il)adas na aorta gira em torno de 20% nos animais Sham e 8% nos animais 2R1C, e o tratamento com nitrito e o pré-tratamento ou não com TEMPOL não geraram diferenças significativas (figura 11B).

Os valores de nitrato diminuíram 15 minutos após a administração de nitrito de sódio nos animais Sham (de $62 \pm 9,4$ μ mol/mg para $47 \pm 6,3$ μ mol/mg no grupo Água e de 35 ± 6 μ mol/mg para 25 ± 6 μ mol/mg no grupo TEMPOL), e não houve diferenças significativas nos animais 2R1C (de $26 \pm 2,4$ μ mol/mg para $33 \pm 8,6$ μ mol/mg no grupo Água e $25 \pm 2,6$ μ mol/mg no grupo TEMPOL antes e após a administração de nitrito). O TEMPOL diminuiu as concentrações de nitrato nos animais Sham (de $62 \pm 9,4$ μ mol/mg para 35 ± 6 μ mol/mg no basal e de $47 \pm 6,3$ μ mol/mg para 25 ± 6 μ mol/mg após 15 minutos da administração de nitrito), e não alterou as concentrações nos animais 2R1C. A hipertensão diminuiu as concentrações de nitrato tanto nos valores basais quanto após a administração de nitrito de sódio (figura 11C).

Figura 11. Concentrações de nitrito na aorta (A), nitrato (B), porcentagem de nitros(il)ação (C) em animais SHAM e 2R1C, antes e após o tratamento com nitrito, pré-tratados ou não com TEMPOL. Imagem representativa da técnica de SNO-RAC dos animais 2R1C, em que "i" = *input* (homogenato de tecido total) e "o" = *output* (proteínas nitros(il)adas extraídas) (D). A representativa dos animais Sham estão na figura 6D. Dados expressos em média $\pm$ EPM (n=6-8). * $p < 0,05$ Água versus TEMPOL.

5.2.3 Coração

No coração a administração de nitrito de sódio aumenta as concentrações de nitrito após 15 minutos em animais Sham (de $2 \pm 0,3$ pmol/mg para 10 ± 2 pmol/mg no grupo Água e de $4 \pm 0,7$ pmol/mg para 26 ± 5 pmol/mg no grupo TEMPOL) e nos 2R1C (de $2 \pm 0,2$ pmol/mg para 12 ± 2 pmol/mg no grupo Água e de $3 \pm 1,3$ pmol/mg para 13 ± 1 μmol/mg no grupo TEMPOL). O TEMPOL foi capaz de potencializar esses aumentos apenas nos animais Sham 15 minutos após administração de nitrito de sódio (10 ± 2 μmol/mg para 26 ± 5 μmol/mg). Nos outros tempos não houve diferença

significativa. Nos animais 2R1C, nos mesmos 15 minutos da administração de nitrito de sódio, o TEMPOL não foi mais capaz de potencializar o aumento nas concentrações de nitrito gerado pelo nitrito de sódio (figura 12A).

As concentrações de RXNO aumentaram significativamente após a administração de nitrito de sódio nos animais Sham (de $0,2 \pm 0,07$ pmol/mg para $4,5 \pm 1,1$ pmol/mg no grupo Água e de $0,1 \pm 0,03$ pmol/mg para $2 \pm 0,6$ pmol/mg no grupo TEMPOL) e nos 2R1C (de $0,4 \pm 0,04$ pmol/mg para $6 \pm 1,1$ pmol/mg no grupo Água e de $0,3 \pm 0,08$ pmol/mg para $6 \pm 0,5$ pmol/mg no grupo TEMPOL). No grupo SHAM, o TEMPOL diminuiu significativamente a concentração após 15 minutos da administração de nitrito de sódio (de $4,5 \pm 1,1$ pmol/mg para $2 \pm 0,06$ pmol/mg). Nos animais 2R1C o TEMPOL não diminuiu as concentrações de RXNO como aconteceu nos Sham 15 minutos após a administração de nitrito de sódio; ele não gerou alterações nas concentrações encontradas nos valores basais de ambos os grupos ($6 \pm 1,1$ pmol/mg) (figura 12B).

O nitrato no coração não se altera com a administração de nitrito de sódio, e nem com o pré-tratamento com TEMPOL. Entretanto os animais 2R1C apresentam menores concentrações (23 ± 3 pmol/mg nos animais Sham *versus* $11 \pm 0,9$ pmol/mg nos animais 2R1C) (figura 12C).

Figura 12. Concentrações de nitrito no coração (A), RXNO (B) e nitrato (C) em animais SHAM e 2R1C, antes e após o tratamento com nitrito, pré-tratados ou não com TEMPOL. Dados expressos em média $\pm$ EPM ($n=6-8$). * $p<0,05$ Água versus TEMPOL. # $p<0,05$ para hipertensão.

5.2.4 Estômago

No estômago as concentrações de nitrito aumentaram após 15 minutos da administração de nitrito de sódio nos animais Sham (de $4\pm0,9$ pmol/mg para 106 ± 20 pmol/mg no grupo Água e de $2\pm0,9$ pmol/mg para 176 ± 61 pmol/mg no grupo TEMPOL) e nos 2R1C (de $2\pm0,3$ pmol/mg para 370 ± 107 pmol/mg no grupo Água e de $1\pm0,1$ pmol/mg para 381 ± 45 μ mol/mg no grupo TEMPOL) (figura 13A). Nos níveis basais não houve diferença entre os grupos Sham ($4\pm0,9$ pmol/mg) e 2R1C ($2\pm0,3$ pmol/mg) e nem entre os que receberam TEMPOL ($2\pm0,9$ pmol/mg no Sham e $1\pm0,1$ pmol/mg no 2R1C) ou não ($4\pm0,9$ pmol/mg no Sham e $2\pm0,3$ pmol/mg no 2R1C). No grupo Sham, o TEMPOL potencializou o aumento em 15 minutos após a administração de nitrito de sódio (de 106 ± 20 pmol/mg para 176 ± 61 pmol/mg) enquanto no grupo 2R1C não houve diferença significativa (de 370 ± 107 pmol/mg para 381 ± 45 pmol/mg). No estômago, diferentemente do encontrado até o presente momento, a hipertensão dobrou as concentrações de nitrito após 15 minutos da administração de nitrito de sódio.

Em relação às concentrações de RXNO a administração de nitrito de sódio aumentou as concentrações nos animais Sham (de $0,7\pm0,2$ pmol/mg para 15 ± 4 pmol/mg no grupo Água e de $0,6\pm0,07$ pmol/mg para 19 ± 5 pmol/mg no grupo TEMPOL) e nos 2R1C (de $0,6\pm0,1$ pmol/mg para 15 ± 2 pmol/mg no grupo Água e de $0,4\pm0,06$ pmol/mg para $13\pm2,6$ μ mol/mg no grupo TEMPOL). O pré-tratamento com TEMPOL, assim como a hipertensão, não gerou alterações em nenhum dos dois momentos e nem nos dois grupos (Sham e 2R1C) (figura 13B).

As concentrações de nitrato sofreram um pequeno aumento 15 minutos após a administração de nitrito de sódio apenas nos animais 2R1C (de $5\pm0,5$ μ mol/mg para $13\pm1,6$ μ mol/mg no grupo Água e de $5\pm0,6$ μ mol/mg para 15 ± 2 μ mol/mg no

grupo TEMPOL). O TEMPOL aumentou as concentrações de nitrato apenas nos animais Sham após 15 minutos do tratamento com nitrito de sódio (16 ± 2 $\mu\text{mol/mg}$ para 31 ± 6 $\mu\text{mol/mg}$). A hipertensão diminuiu as concentrações basais de nitrato e impediu que o TEMPOL potencializasse o aumento após os 15 minutos da administração de nitrito de sódio (figura 13C).

Figura 13. Concentrações de nitrito no estômago (A), RXNO (B) e nitrato (C) em animais SHAM e 2R1C, antes e após o tratamento com nitrito, pré-tratados ou não com TEMPOL. Dados expressos em média $\pm$ EPM ($n=6-8$). * $p<0,05$ Água versus TEMPOL.

5.2.5 Fígado

No fígado as concentrações de nitrito aumentaram após 15 minutos da administração de nitrito de sódio nos animais Sham (de $0,7 \pm 0,17$ pmol/mg para $18 \pm 3,5$ pmol/mg no grupo Água e de $0,7 \pm 0,2$ pmol/mg para $9 \pm 1,6$ pmol/mg no grupo TEMPOL) e nos 2R1C (de $1 \pm 0,2$ pmol/mg para $4 \pm 0,7$ pmol/mg no grupo Água e de $0,8 \pm 1,17$ pmol/mg para 5 ± 1 μ mol/mg no grupo TEMPOL) (figura 14A). O TEMPOL diminuiu as concentrações nos animais Sham, 15 minutos após a administração de nitrito de sódio (de $18 \pm 3,5$ pmol/mg para $9 \pm 1,6$ pmol/mg). A hipertensão prejudicou o aumento nas concentrações de nitrito após a administração de nitrito de sódio.

As concentrações de RXNO aumentaram após 15 minutos da administração de nitrito de sódio nos animais Sham (de $0,7 \pm 0,1$ pmol/mg para 11 ± 2 pmol/mg no grupo Água e de $0,7 \pm 0,09$ pmol/mg para $12 \pm 1,5$ pmol/mg no grupo TEMPOL) e nos 2R1C (de $1,4 \pm 0,2$ pmol/mg para 20 ± 2 pmol/mg no grupo Água e de $1,6 \pm 0,2$ pmol/mg para $16 \pm 2,7$ μ mol/mg no grupo TEMPOL) (figura 14B). O TEMPOL não alterou significativamente as concentrações de RXNO, e a hipertensão aumentou esses valores.

As concentrações de nitrato não foram alteradas pela administração de nitrito de sódio nos animais Sham (de $42 \pm 7,6$ μ mol/mg para $45 \pm 2,8$ μ mol/mg no grupo Água e de 53 ± 8 μ mol/mg para $51 \pm 1,2$ μ mol/mg no grupo TEMPOL) e nos 2R1C (de $13 \pm 0,8$ μ mol/mg para $11 \pm 0,8$ μ mol/mg no grupo Água e de $13 \pm 1,2$ pmol/mg para $14 \pm 0,8$ μ mol/mg no grupo TEMPOL) (figura 14C). O pré-tratamento com TEMPOL não modificou as concentrações de nitrato, e a hipertensão, por sua vez, diminuiu as concentrações tanto no basal quanto após 15 minutos da administração de nitrito de sódio.

Figura 14. Concentrações de nitrito no fígado (A), RXNO (B) e nitrato (C) em animais SHAM e 2R1C, antes e após o tratamento com nitrito, pré-tratados ou não com TEMPOL. Dados expressos em média $\pm$ EPM (n=6-8). * $p<0,05$ Água versus TEMPOL. # $p<0,05$ para hipertensão.

5.3 Abordagem experimental III

Com a abordagem experimental III podemos observar as medidas de pressão arterial nos animais Sham e 2R1C, tratados com nitrito de sódio, pré-tratados ou não com TEMPOL, nos mesmos intervalos de tempo que obtivemos as concentrações de nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas.

5.3.1 Pressão Arterial Sistólica

Com a administração de nitrito de sódio houve uma queda mais pronunciada na pressão arterial sistólica (Pinheiro *et al.*) dos animais 2R1C e Sham nos tempos de 15 e 30 minutos após a administração. Houve diferença estatisticamente significativa entre a queda na PAS dos animais 2R1C e dos Sham com 15 minutos da administração de nitrito de sódio. Além disso, nesse mesmo intervalo, o pré-tratamento com TEMPOL aumentou a queda na PAS nos animais hipertensos. Com 30 minutos após o nitrito de sódio ainda há queda na PAS tanto nos animais Sham quanto nos 2R1C, porém a partir de 2 horas essa queda não é mais significativa.

Figura 15. Pressão arterial sistólica (mmHg) em ratos 2R1C e SHAM, medidas feitas em tempo real por canulação. Valores correspondentes a resposta a administração de nitrito (15 mg/kg, gavagem) em animais pré-tratados ou não com TEMPOL (18 mg/kg, gavagem). Dados expressos em média $\pm$ EPM (n=4-6). # $p < 0,05$ para Hipertensão.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As principais observações desse trabalho foram: i) Após a administração de nitrito de sódio ocorre um aumento das concentrações de nitrito e espécies nitros(il)adas. ii) O TEMPOL potencializa esses aumentos em curtos intervalos de tempo (15 minutos) e iii) a hipertensão diminui as concentrações desses metabólitos.

Já é bem descrita a importância da formação de NO endógeno pelas NOS para a homeostase vascular, neurotransmissão e mecanismos de defesa do organismo (Moncada *et al.*, 1991). Muitas dessas ações são mediadas pela ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO (Denninger e Marletta, 1999), sendo este, posteriormente, oxidado a nitrito e a nitrato. Entretanto, atualmente sabemos que a via de ativação da PKG-1 representa apenas uma parte do mecanismo de ação do NO, e que este pode também reagir com metais e tióis (Stamler, 1994). As espécies nitros(il)adas, com destaque para os S-nitrosotióis, formadas nessas reações estão sendo bastante estudadas por possuírem papéis essenciais em várias doenças (Feelisch *et al.*, 2002; Bryan *et al.*, 2004; Pinheiro *et al.*, 2015).

As proteínas S-nitrosiladas vêm sendo vistas como grandes contribuintes na sinalização dependente de NO, e sua formação é dependente do estado redox (Broniowska e Hogg, 2012). Apesar de numerosos trabalhos mostrando proteínas como novos alvos regulados por nitros(il)ação, há uma surpreendente escassez de estudos com foco nos níveis das espécies S-nitros(il)adas encontradas em células ou tecidos sob condições fisiológicas ou patológicas. Bryan *et al* exploraram as concentrações de S-nitrosotióis e outros metabólitos do NO em condições fisiológicas. Esse mesmo trabalho também mostrou que condições como a hipóxia alteram as concentrações desses metabólitos (Bryan *et al.*, 2004).

Sabemos ainda que o nitrito e o nitrato, que antes eram considerados apenas metabólitos inertes do NO (Lauer *et al.*, 2001), são importantes agentes fisiológicos e farmacológicos, principalmente em doenças cardiovasculares (Montenegro *et al.*, 2011; Montenegro *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2014). Sendo assim, é de suma importância sabermos as concentrações basais dos metabólitos do NO em diferentes tecidos, e também como drogas como o nitrito de sódio e TEMPOL, e condições patológicas como a hipertensão alteram essas concentrações. Com isso, novos agentes e alvos terapêuticos podem surgir, além de elucidar possíveis tecidos que possam estar envolvidos mais diretamente na complexa química que envolve o NO e seus metabólitos.

Até o presente momento, este é o primeiro estudo que mostra as variações nas concentrações de nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas após uma única dose de nitrito, em diferentes intervalos de tempo. Além disso, associamos o nitrito de sódio com o TEMPOL para verificarmos uma possível potencialização nos aumentos das concentrações dos metabólitos do NO após a administração de nitrito de sódio.

Conforme Montenegro *et al* já havia mostrado (Montenegro *et al.*, 2011), as concentrações de nitrito aumentaram após a administração de nitrito de sódio, e voltaram ao basal após 24 horas de tratamento. Entretanto este não foi o comportamento observado na aorta, sugerindo que as ações do nitrito de sódio nesse vaso não são reflexos das concentrações plasmáticas, uma vez que com 2 horas, quando as concentrações plasmáticas já retornaram aos valores basais, é que começamos a observar uma tendência a aumento das concentrações aórticas de nitrito. Com 24 horas após a administração, vemos mais claramente o aumento na aorta. O pré-tratamento com TEMPOL não gerou alterações nesses parâmetros.

Ao olharmos para as concentrações de RXNO no plasma, vemos que após 24 horas estas também retornam ao basal no grupo tratado apenas com nitrito, entretanto o pré-tratamento com TEMPOL fez com que as concentrações se mantivessem mais elevadas comparadas ao grupo que não foi pré-tratado. Isso sugere que o TEMPOL isoladamente favorece a formação ou estabilidade de RXNO.

Além disso, o TEMPOL potencializou os aumentos de nitrito após a administração de nitrito de sódio no plasma, coração e estômago. Neste sentido Amaral *et al* já havia mostrado que o TEMPOL aumenta a formação de NO em ambiente ácido (Amaral *et al.*, 2013). Sendo assim é possível que essa maior quantidade de NO formado no estômago, após a administração de TEMPOL e nitrito de sódio, esteja gerando mais agentes nitros(il)antes, como o NO^+ e o N_2O_3 , fazendo com que haja uma maior nitros(il)ação de proteínas e subsequentes transnitrosilações. Além disso, o NO restante é oxidado a nitrito e este a nitrato, e através do ciclo êntero-salivar há uma manutenção das concentrações de nitrito em contato com o suco gástrico para a formação de NO e espécies nitros(il)adas por um período de 3 a 5 horas (Kapil *et al.*, 2010), relativo à duração do ciclo. Após este período, as concentrações de nitrito e nitrato vão diminuindo, até que em 24 horas estas voltam aos valores basais (Montenegro *et al.*, 2011). O TEMPOL, por ser um mimético da SOD, e assim catalisar a degradação dos ânions superóxido em peróxido de hidrogênio, também atua aumentando a biodisponibilidade de NO por deslocar a reação dos ânions superóxido para a formação de peróxido de hidrogênio, evitando que este reaja com o NO e forme peroxinitrito (Koppenol, 1998). Assim ele diminui o estresse oxidativo e favorece a prevalência de espécies antioxidantes, alterando o estado redox, favorecendo a formação de RXNO.

Curiosamente, verificamos diferenças de comportamento entre os tecidos em relação às RXNO. Acreditamos que os padrões de transnitrosilação diferem de tecido para tecido. A transnitrosilação ocorre quando uma proteína nitros(il)ada transfere o grupamento nitroso funcional para outro tiol. Além disso, enzimas como a tioredoxina redutase e glutational S-transferase podem catalisar a transnitrosilação (Hogg, 2000). Neste sentido, podemos observar com os dados obtidos que as concentrações de RXNO no coração e no estômago equivalem a cerca de 10% dos níveis de nitrito nestes tecidos, enquanto que no fígado as concentrações de RXNO e nitrito são equivalentes. Podemos sugerir que as altas concentrações de glutational no fígado facilitem a formação de nitrosotióis. Além disso, observamos menores concentrações de nitrito no fígado dos animais pré-tratados com TEMPOL, sugerindo que este facilite a retenção do nitrito no fígado.

As concentrações de nitrato pouco se alteraram nos animais normotensos que foram tratados ou não com nitrito de sódio, pré-tratados ou não com TEMPOL. Isso pode ter ocorrido porque as concentrações de nitrato são mais altas que as dos outros metabólitos. Sendo assim, pequenas alterações podem passar despercebidas. É possível que se o estudo tivesse sido feito com tratamentos crônicos, alterações seriam observadas.

Após verificarmos que o nitrito e as RXNO aumentaram rapidamente após a administração de nitrito de sódio, e que o TEMPOL potencializou esses aumentos em alguns tecidos, principalmente no intervalo de 15 minutos, decidimos comparar os dados obtidos em condições fisiológicas com a hipertensão.

Os efeitos anti-hipertensivos de nitritos e nitratos foram demonstrados tanto em modelos animais de hipertensão (Carlstrom *et al.*, 2011; Montenegro *et al.*, 2011), quanto em voluntários sadios (Kapil *et al.*, 2010). Porém o mecanismo exato

pelo qual eles exercem seus efeitos ainda não está completamente elucidado. Sabemos que esses efeitos envolvem a participação do NO formado a partir do nitrito (Lundberg e Weitzberg, 2010), e das espécies nitros(il)adas, mais precisamente os S-nitrosotióis (Pinheiro *et al.*, 2015). Porém ainda faltam estudos que expliquem esses mecanismos a nível sistêmico. Nosso objetivo foi observar como estariam as concentrações de nitrito, nitrato e espécies nitros(il)adas, em diferentes tecidos, em ratos hipertensos após o tratamento com uma dose de nitrito de sódio, e assim compreender melhor quais os tecidos mais envolvidos e possíveis alvos de nitros(il)ação, para nos auxiliar em posteriores estudos sobre os mecanismos anti-hipertensivos do nitrito de sódio.

A hipertensão diminuiu as concentrações de RXNO no plasma e a porcentagem de proteínas nitros(il)adas na aorta, nos grupos pré-tratados ou não com TEMPOL, após a administração de nitrito de sódio. No coração houve uma diminuição das concentrações de nitrito e aumento das concentrações de RXNO, assim como no fígado. Já as concentrações de nitrato diminuíram em todos os tecidos coletados. Neste contexto, é conhecido que a hipertensão aumenta o estresse oxidativo (Montenegro *et al.*, 2011) e que gera um desequilíbrio entre as espécies antioxidantes e oxidantes, aumentando as concentrações destas últimas (Sies e Cadenas, 1985). Além disso, sabemos que a eNOS é uma enzima crítica na manutenção da produção de NO, e que está desacoplada durante a hipertensão devido a diminuição da biodisponibilidade do cofator tetraidrobiopterina (BH4) por estar oxidado (Kietadisorn *et al.*, 2012). O desacoplamento da eNOS inviabiliza a enzima, aumentando o estresse oxidativo e diminuindo a produção de NO. Assim, com a menor produção de NO e maior produção de ânions superóxido, o tratamento

com nitrito de sódio é menos efetivo em aumentar as concentrações dos metabólitos do NO na hipertensão.

O desequilíbrio na homeostase redox pode ser compensado pelo tratamento com TEMPOL, bem como o nitrito pode exercer um efeito similar (antioxidante) por diminuir a expressão da NADPH oxidase conforme descrito anteriormente por nosso grupo (Montenegro *et al.*, 2011). Sendo assim, é possível que as concentrações de nitrito e RXNO estejam menores durante a hipertensão uma vez que essas moléculas, que refletem produção endógena de NO, estejam em menores concentrações devido ao fato de que o NO endógeno possa ser consumido por outras espécies oxidantes, principalmente o superóxido, levando a menores concentrações das mesmas em animais hipertensos.

Amaral *et al* haviam demonstrado que o TEMPOL potencializa os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio, fazendo com que a queda na pressão arterial média de 25 mmHg pelo nitrito de sódio (15 mg/Kg) passasse para 35 mmHg na presença do TEMPOL (Amaral *et al.*, 2013). No presente estudo obtivemos mais ou menos 14 mmHg de queda na PAS nos animais tratados apenas com nitrito de sódio e aproximadamente 22 mmHg para os animais pré-tratados com TEMPOL. Essa diferença encontrada entre os estudos pode ser justificada pela diferença entre os modelos e tempo de hipertensão. Enquanto o primeiro estudo utilizou L-NAME para induzir hipertensão aguda, no segundo fizemos hipertensão crônica pelo modelo 2R1C. O L-NAME é inibidor da NOS (Amaral *et al.*, 2013) ao passo que o modelo 2R1C é dependente de angiotensina (Pinheiro *et al.*, 2016), então pela diferença de modelos já esperaríamos respostas diferentes ao nitrito de sódio entre eles. Além disso, a hipertensão crônica faz com que o estresse oxidativo esteja mais elevado, possivelmente impedindo o TEMPOL de potencializar mecanismos que levam ao

aumento das concentrações de nitrito, RXNO e nitrato nos tecidos pelo fato desse antioxidante estar sendo utilizado para tentar restabelecer o estado redox do organismo através da diminuição das espécies oxidantes.

Muitos estudos precisam ainda ser realizados para entendermos a verdadeira participação de cada metabólito do NO nos efeitos pressóricos do nitrito de sódio. Outros tecidos precisam ser investigados, em outros intervalos, além de buscarmos alvos específicos de ação de cada metabólito para assim haver uma melhor discriminação entre as funções de cada um desses metabólitos em cada tecido do organismo.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com os resultados do presente trabalho concluímos que as concentrações plasmáticas de nitrito e de RXNO aumentam logo após a administração de nitrito de sódio e retornam ao basal após 24 horas. Concluímos também que o pré-tratamento com TEMPOL aumentou as concentrações plasmáticas desses metabólitos, aumento este que não foi observado na hipertensão, sugerindo a importância do estado redox para os efeitos do nitrito de sódio. Em relação às concentrações teciduais dos metabólitos do NO após o tratamento com nitrito de sódio, concluímos que estas variam de acordo com o tecido e com o tempo, e que o TEMPOL e a hipertensão são capazes de modular essas concentrações, especialmente em tecidos que compõe o sistema cardiovascular como a aorta e coração.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 357, n. Pt 3, p. 593-615, Aug 1 2001.

AMARAL, J. H. et al. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. **Redox Biol**, v. 5, p. 340-6, Aug 2015.

AMARAL, J. H. et al. TEMPOL enhances the antihypertensive effects of sodium nitrite by mechanisms facilitating nitrite-derived gastric nitric oxide formation. **Free Radic Biol Med**, v. 65, p. 446-55, Dec 2013.

BJORNE, H. et al. Intragastric nitric oxide is abolished in intubated patients and restored by nitrite. **Crit Care Med**, v. 33, n. 8, p. 1722-7, Aug 2005.

BJORNE, H.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. Intragastric generation of antimicrobial nitrogen oxides from saliva--physiological and therapeutic considerations. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 9, p. 1404-12, Nov 1 2006.

BJORNE, H. H. et al. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. **J Clin Invest**, v. 113, n. 1, p. 106-14, Jan 2004.

BOO, Y. C.; JO, H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 285, n. 3, p. C499-508, Sep 2003.

BRONIOWSKA, K. A.; HOGG, N. The chemical biology of S-nitrosothiols. **Antioxid Redox Signal**, v. 17, n. 7, p. 969-80, Oct 01 2012.

BRYAN, N. S. et al. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 12, p. 4308-13, Mar 23 2004.

CARLSTROM, M. et al. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. **Cardiovasc Res**, v. 89, n. 3, p. 574-85, Feb 15 2011.

COCKCROFT, J. R. Exploring vascular benefits of endothelium-derived nitric oxide. **Am J Hypertens**, v. 18, n. 12 Pt 2, p. 177S-183S, Dec 2005.

COOKE, J. P.; DZAU, V. J. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. **Annu Rev Med**, v. 48, p. 489-509, 1997.

COSBY, K. et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1498-1505, Dec 2003.

DEJAM, A. et al. Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation. **Circulation**, v. 116, n. 16, p. 1821-31, Oct 16 2007.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 334-50, May 5 1999.

DIAS-JUNIOR, C. A.; GLADWIN, M. T.; TANUS-SANTOS, J. E. Low-dose intravenous nitrite improves hemodynamics in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 12, p. 1764-70, Dec 15 2006.

DUDZINSKI, D. M.; MICHEL, T. Life history of eNOS: partners and pathways. **Cardiovasc Res**, v. 75, n. 2, p. 247-60, Jul 15 2007.

FEELISCH, M. et al. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. **FASEB J**, v. 16, n. 13, p. 1775-85, Nov 2002.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res**, v. 43, n. 3, p. 532-41, Aug 15 1999.

FORRESTER, M. T. et al. Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. **Nat Biotechnol**, v. 27, n. 6, p. 557-9, Jun 2009.

FRANCIS, S. H. et al. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacol Rev**, v. 62, n. 3, p. 525-63, Sep 2010.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373-6, Nov 27 1980.

GHOSH, S. M. et al. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. **Hypertension**, v. 61, n. 5, p. 1091-102, May 2013.

GLADWIN, M. T. et al. The emerging biology of the nitrite anion. **Nat Chem Biol**, v. 1, n. 6, p. 308-14, Nov 2005.

HESS, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 2, p. 150-66, Feb 2005.

HILL, B. G. et al. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. **J Biol Chem**, v. 285, n. 26, p. 19699-704, Jun 25 2010.

HOGG, N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. **Free Radic Biol Med**, v. 28, n. 10, p. 1478-86, May 15 2000.

HOROWITZ, A. et al. Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiol Rev**, v. 76, n. 4, p. 967-1003, Oct 1996.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9265-9, Dec 1987.

KALOUS, K. S. et al. Mechanism of Sirt1 NAD⁺-dependent Protein Deacetylase Inhibition by Cysteine S-Nitrosation. **J Biol Chem**, v. 291, n. 49, p. 25398-25410, Dec 2 2016.

KAPIL, V. et al. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. **Hypertension**, v. 56, n. 2, p. 274-81, Aug 2010.

KEVIL, C. G. et al. Inorganic nitrite therapy: historical perspective and future directions. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 3, p. 576-93, Aug 01 2011.

KIETADISORN, R.; JUNI, R. P.; MOENS, A. L. Tackling endothelial dysfunction by modulating NOS uncoupling: new insights into its pathogenesis and therapeutic possibilities. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 5, p. E481-95, Mar 1 2012.

KIM-SHAPIO, D. B.; GLADWIN, M. T. Mechanisms of nitrite bioactivation. **Nitric Oxide**, v. 38, p. 58-68, Apr 30 2014.

KOPPENOL, W. H. The chemistry of peroxynitrite, a biological toxin. **Quimica Nova**, v. 21, n. 3, p. 326-331, May-Jun 1998.

KUMAR, V. et al. Cardiovascular redox and ox stress proteomics. **Antioxid Redox Signal**, v. 17, n. 11, p. 1528-59, Dec 1 2012.

LAUER, T. et al. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 22, p. 12814-9, Oct 23 2001.

LUNDBERG, J. O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free Radic Biol Med**, v. 37, n. 3, p. 395-400, Aug 01 2004.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 5, p. 915-22, May 2005.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. NO-synthase independent NO generation in mammals. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 396, n. 1, p. 39-45, May 21 2010.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 2, p. 156-67, Feb 2008.

LUNDBERG, J. O. et al. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. **Gut**, v. 35, n. 11, p. 1543-6, Nov 1994.

MACHHA, A.; SCHECHTER, A. N. Dietary nitrite and nitrate: a review of potential mechanisms of cardiovascular benefits. **Eur J Nutr**, v. 50, n. 5, p. 293-303, Aug 2011.

MARON, B. A.; TANG, S. S.; LOSCALZO, J. S-nitrosothiols and the S-nitrosoproteome of the cardiovascular system. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 3, p. 270-87, Jan 20 2013.

MCKNIGHT, G. M. et al. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. **Gut**, v. 40, n. 2, p. 211-4, Feb 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med**, v. 329, n. 27, p. 2002-12, Dec 30 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991.

MONTENEGRO, M. F. et al. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 1, p. 144-52, Jul 01 2011.

MONTENEGRO, M. F. et al. Vascular xanthine oxidoreductase contributes to the antihypertensive effects of sodium nitrite in L-NAME hypertension. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 387, n. 6, p. 591-8, Jun 2014.

MONTENEGRO, M. F. et al. Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 385, n. 5, p. 509-17, May 2012.

MOON, Y. et al. GSNOR Deficiency Enhances In Situ Skeletal Muscle Strength, Fatigue Resistance, and RyR1 S-Nitrosylation Without Impacting Mitochondrial Content and Activity. **Antioxid Redox Signal**, v. 26, n. 4, p. 165-181, Feb 1 2017.

OESS, S. et al. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. **Biochem J**, v. 396, n. 3, p. 401-9, Jun 15 2006.

OLIVEIRA-PAULA, G. H.; LACCHINI, R.; TANUS-SANTOS, J. E. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. **Gene**, v. 575, n. 2 Pt 3, p. 584-99, Jan 10 2016.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-6, Jun 16 1988.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-6, Jun 11-17 1987.

PINHEIRO, L. C. et al. The antihypertensive effects of sodium nitrite are not associated with circulating angiotensin converting enzyme inhibition. **Nitric Oxide**, v. 40, p. 52-9, Aug 31 2014.

PINHEIRO, L. C. et al. Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. **Free Radic Biol Med**, v. 87, p. 252-62, Oct 2015.

PINHEIRO, L. C. et al. Oral nitrite circumvents antiseptic mouthwash-induced disruption of enterosalivary circuit of nitrate and promotes nitrosation and blood pressure lowering effect. **Free Radic Biol Med**, v. 101, p. 226-235, Dec 2016.

PINHEIRO, L. C. et al. Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. **Free Radic Biol Med**, v. 53, n. 4, p. 701-9, Aug 15 2012.

PINHEIRO, L. C.; TANUS-SANTOS, J. E.; CASTRO, M. M. The potential of stimulating nitric oxide formation in the treatment of hypertension. **Expert Opin Ther Targets**, v. 21, n. 5, p. 543-556, May 2017.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circ Res**, v. 52, n. 3, p. 352-7, Mar 1983.

ROCHA, B. S. et al. Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation. **Toxicology**, v. 265, n. 1-2, p. 41-8, Nov 9 2009.

SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J. L. Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems. **Arch Biochem Biophys**, v. 357, n. 1, p. 1-7, Sep 01 1998.

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 311, n. 1152, p. 617-31, Dec 17 1985.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 931-6, Sep 23 1994.

SURKS, H. K. et al. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase I α . **Science**, v. 286, n. 5444, p. 1583-7, Nov 19 1999.

TANG, Y.; JIANG, H.; BRYAN, N. S. Nitrite and nitrate: cardiovascular risk-benefit and metabolic effect. **Curr Opin Lipidol**, v. 22, n. 1, p. 11-5, Feb 2011.

TOLEDO, J. C., JR.; AUGUSTO, O. Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. **Chem Res Toxicol**, v. 25, n. 5, p. 975-89, May 21 2012.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertens Res**, v. 34, n. 1, p. 5-14, Jan 2011.

TSUCHIYA, K. et al. Nitrite is an alternative source of NO in vivo. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 5, p. H2163-70, May 2005.

TSUCHIYA, K. et al. Dietary nitrite ameliorates renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. **Nitric Oxide**, v. 22, n. 2, p. 98-103, Feb 15 2010.

VAN FAASSEN, E. E. et al. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. **Med Res Rev**, v. 29, n. 5, p. 683-741, Sep 2009.

WALFORD, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **J Thromb Haemost**, v. 1, n. 10, p. 2112-8, Oct 2003.

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

WILCOX, C. S. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. **Pharmacol Ther**, v. 126, n. 2, p. 119-45, May 2010.

WINK, D. A. et al. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. **Chem Res Toxicol**, v. 7, n. 4, p. 519-25, Jul-Aug 1994.

YANG, L. et al. Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits. **Circ Res**, v. 101, n. 5, p. 465-74, Aug 31 2007.

ZHANG, R. et al. Hemoglobin S-nitrosylation plays an essential role in cardioprotection. **J Clin Invest**, v. 126, n. 12, p. 4654-4658, Dec 1 2016.

ZWEIER, J. L.; SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 250-62, May 05 1999.