



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

**ROSE INÊS MATOS BATISTA**

**Participação dos nitrosotiois nos efeitos do nitrito de sódio sobre as gelatinases vasculares *in vitro* e *in vivo*.**

**Ribeirão Preto - SP**

**2024**

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

**ROSE INÊS MATOS BATISTA**

**Participação dos nitrosotiois nos efeitos do nitrito de sódio sobre as gelatinases vasculares *in vitro* e *in vivo*.**

**Ribeirão Preto - SP**

**2024**

**ROSE INÊS MATOS BATISTA**

**Participação dos nitrosotiois nos efeitos do nitrito de sódio sobre as gelatinases vasculares *in vitro* e *in vivo*.**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

**Ribeirão Preto - SP**

**2024**

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

Batista, Rose Inês Matos

Participação dos nitrosotiois nos efeitos do nitrito de sódio sobre as gelatinases vasculares *in vitro* e *in vivo*. Rose Inês Matos Batista: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos. Ribeirão Preto, 2024. 101f.

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

1.Metaloproteinases de Matriz 2.Nitrito de Sódio 3.Hipertensão  
4.Nitrosilação 5.Remodelamento vascular

*Dedico este trabalho à Deus, a toda  
minha família e amigos.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus, por nunca ter me faltado nas horas de dificuldade.

À toda a minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional nesses longos anos longe de casa. Às minhas irmãs Regiane e Rosa e ao meu sobrinho Henrique por serem meu alicerce e apoio nas horas difíceis. Os amo incondicionalmente e essa conquista também é de vocês.

Ao meu orientador, José Eduardo Tanus dos Santos, pelos conhecimentos científicos compartilhados ao longo desses anos, além da confiança depositada a mim para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor da Faculdade de Medicina Albert Einstein, Nicholas Sibinga, pela oportunidade de passar 6 meses em NY e permitir o enriquecimento científico deste trabalho.

Aos meus colaboradores diretos Gustavo, Thais, Renato e Dario, que nunca mediram esforços para me auxiliar na execução e idealização deste trabalho.

À Sandra, pelo excelente apoio técnico.

Aos professores do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelos conhecimentos compartilhados e aos funcionários Gislaine e Ramon por serem tão prestativos.

Aos meus amigos de laboratório, tanto os que ainda estão quanto os que passaram, em especial ao Evandro, Danielle e Thiago. Vocês serão sempre muito especiais para mim. Obrigado pela ótima convivência e por todo o apoio científico.

Aos amigos que Ribeirão Preto me deu, Alexandre, Bárbara, Carla, Jéssica, Grazielle, Leevan, Thais e Indiara por terem sido minha família ao longo desses anos. Obrigada pela amizade incondicional e por toda a força e apoio. Sentirei imensas saudades.

Aos meus amigos de vida, Bianca, Renato e Camila, por tantos anos de amizade e por terem me aceitado e apoiado em todas as versões.

À Capes e à FAPESP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

BATISTA, R.I.M. **Participação dos nitrosotiois nos efeitos do nitrito de sódio sobre gelatinases vasculares in vitro e in vivo.** 2024. 101f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são um grupo de endopeptidases que participam da degradação da matriz extracelular (MEC), culminando em remodelamento vascular. Na hipertensão, o tratamento com nitrito de sódio reduz a atividade da MMP-2 por mecanismos ainda não elucidados. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar se os efeitos benéficos do nitrito de sódio na hipertensão arterial se devem à produção de nitrosotiois e nitrosilação das MMPs com consequente diminuição de sua atividade. Para isto, utilizamos células musculares lisas vasculares (CMLVs) tratadas com PMA, PMA+nitrito, PMA+GSNO, Ang II, Ang II+nitrito, AngII+GSNO, além de seus grupos controle, sendo medida a atividade das gelatinases por zimografia *in situ* nessas células. A fim de elucidar a participação dos nitrosotiois nos efeitos anti-MMP do nitrito, também foram feitos tratamentos concomitantes com o RNAi para GSNO redutase (GSNOR). No que diz respeito aos protocolos *in vivo*, foram utilizados animais Sham e hipertensos 2 rins 1 clipe (2R1C), tratados com veículo, nitrito (1mg/kg via oral) e nitrito+SPL 334 (0,3mg/kg IP), sendo este último um inibidor da enzima GSNOR. Esses animais tiveram a pressão medida semanalmente por pletismografia de cauda, os níveis de nitrito, espécies nitrosiladas totais e nitrosotiois no plasma, bem como níveis de nitrito e espécies nitrosiladas totais na aorta foram medidos por quimiluminescência através do ozônio, além da quantificação morfométrica do remodelamento vascular aórtico. Além disso, animais Sham e 2R1C também foram tratados com veículo, nitrito (15mg/kg via oral) e nitrito+omeprazol (10mg/kg via intraperitoneal) dos quais foram aferidos a pressão semanalmente e medidos o pH estomacal, o estresse oxidativo pelos métodos de lucigenina e DHE, a atividade das gelatinases por zimografia em gel e zimografia *in situ* e o remodelamento vascular aórtico. Como resultados, obtivemos que o tratamento das CMLVs com PMA e Ang II aumentou a atividade das MMPs e o tratamento com GSNO foi capaz de reverter esse aumento, enquanto o nitrito não apresentou efeitos. O tratamento com RNAi foi capaz de diminuir a expressão da GSNOR e aumentar a nitrosilação da MMP-2. Nas células em que o PMA foi utilizado como ativador de MMPs, foi observado que o GSNO só exerceu efeito anti-MMP no grupo que foi tratado concomitantemente com o RNAi. Porém, o mesmo não foi observado nas

células tratadas com angiotensina II, onde em ambos os grupos (controle e GSNOR-), o GSNO teve efeito nas gelatinases. No que diz respeito aos animais, o tratamento concomitante de nitrito 1mg/kg e SPL- 334 gerou um efeito mais pronunciado na pressão arterial do que quando estas drogas foram usadas separadamente, especialmente na semana 4 do protocolo. Também foi observado um aumento do nitrito na aorta diante do tratamento concomitante de nitrito e SPL 334. O remodelamento vascular, em relação ao parâmetro média/lúmen (M/L), foi melhorado pelo tratamento apenas com SPL-334 e também pelo tratamento com Nitrito+SPL-334. Quanto à área de secção transversal (CSE), foi observada uma melhora do remodelamento apenas com o tratamento concomitante das duas drogas. Em relação ao protocolo animal utilizando omeprazol e nitrito na dose de 15mg/kg, o nitrito foi capaz de diminuir a pressão arterial nas semanas 3, 5 e 6 de tratamento e o omeprazol tendeu a reverter os efeitos do nitrito na hipertensão também nestas semanas do protocolo. Em relação ao estresse oxidativo, a hipertensão aumentou os níveis de superóxido e a atividade da NADPH oxidase, sendo o nitrito capaz de diminuir ambos os fatores e o omeprazol reverteu estes efeitos. Um efeito semelhante do omeprazol foi encontrado na atividade das gelatinases por zimografia in situ, onde o omeprazol também reverteu os efeitos benéficos do nitrito. Em relação à zimografia em gel, houve aumento da atividade da atividade da MMP-2 nas isoformas de 64 e 72 kDa, porém os tratamentos não alteraram tal resposta. Em relação ao remodelamento vascular, foi observado que o nitrito de sódio diminui a área de secção transversal da aorta dos animais hipertensos e o tratamento concomitante com omeprazol impediu este efeito. Os resultados obtidos nos permitem sugerir que os efeitos benéficos do nitrito de sódio no sentido de diminuir a atividade das MMPs na hipertensão estariam, pelo menos em parte, relacionados com a formação de nitrosotiois no estômago, que levaria a nitrosilação da MMP-2 e diminuição da sua atividade. Apoio Financeiro: CAPES, FAPESP, CNPQ

**Palavras-chave:** Metaloproteinases de Matriz, nitrito de sódio, hipertensão, nitrosilação, remodelamento vascular

## ABSTRACT

BATISTA, R.I.M. **Participation of nitrosothiols in sodium nitrite effects on vascular gelatinases in vitro and in vivo.** 2024. 101f. Thesis (PhD) - Medical School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2024.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of endopeptidases that participate on the extracellular matrix (ECM) degradation, resulting in vascular remodeling. In hypertension, sodium nitrite treatment reduces MMP-2 activity through mechanisms that have not been elucidated yet. Thus, the objective of this study was to evaluate whether the beneficial effects of sodium nitrite on arterial hypertension are due to the production of nitrosothiols and MMPs nitrosylation, resulting in a decrease in their activity. For this, we used vascular smooth muscle cells (VSMCs) treated with PMA, PMA+nitrite, PMA+GSNO, Ang II, Ang II+nitrite, AngII+GSNO, and their control groups. Gelatinases activity was measured by *in situ* zymography. We also performed treatments with RNAi for GSNO reductase (GSNOR) to elucidate the participation of nitrosothiols in the anti-MMP effects of nitrite. In the *in vivo* part of the work, we treated Sham and hypertensive rats (2 kidney-one-clip-model) with vehicle, nitrite (1mg/kg orally) and SPL-334 (0,3mg/kg IP, a GSNOR inhibitor). We measured the blood pressure of these animals weekly by tail plethysmography, plasmatic nitrite, total nitrosylated species and nitrosothiols levels, as well as aortic nitrite and total nitrosylated species levels were measured by an ozone-based chemiluminescence assay. We also measured morphometric parameters to assess aortic vascular remodeling from these animals. In addition, Sham and 2K1C animals were also treated with vehicle, nitrite (15mg/kg orally) and nitrite+omeprazole (10mg/kg intraperitoneally). We measured systolic pressure, stomach pH, oxidative stress using lucigenin and DHE methods, gelatinases activity by gelatin zymography and *in situ* zymography and aortic vascular remodeling. As results, we observed that cell treatment with PMA and Ang II increased MMPs activity whereas GSNO was able to reverse this increasement, meanwhile nitrite had no effects. RNAi treatment was able to decrease GSNOR expression and increase MMP-2 nitrosylation. In the cells where PMA was used as an activator of MMPs, it was observed that GSNO had anti-MMP effect only in the group treated with RNAi. However, in cells treated with angiotensin II, in both groups (control and GSNOR-), GSNO inhibited gelatinases activity. In animals, treatment with nitrite and SPL-334 generated a more pronounced effect on blood

pressure than when these drugs were used separately, especially in the fourth week of the protocol. We also observed an increase in aortic nitrite concentration after treatment with nitrite and SPL 334. Treatments with SPL-344 alone and the association with nitrite were able to decrease media/lumen (M/L) vascular remodeling parameter. However, concerning the cross-section area (CSA) parameter, only the association with the two drugs was able to cause beneficial effects. Regarding animal protocol using omeprazole and nitrite 15 mg/kg, nitrite was able to reduce blood pressure in weeks 3, 5 and 6 of the protocol and omeprazole tended to reverse the effects on hypertension. Nitrite treatment was able to decrease superoxide levels and NADPH oxidase activity and omeprazole reversed these effects. A similar effect was observed on gelatinases activity, where omeprazole also reversed the beneficial effects of nitrite. Regarding gelatin zymography, there was an increase in 64 and 72 kDa MMP-2 activity, and treatments did not cause any changes. Omeprazole was also able to reverse nitrite effects on CSA parameter of vascular remodeling. These results suggest that the beneficial effects of sodium nitrite over MMPs activity in hypertension would be, at least in part, related to the formation of nitrosothiols in the stomach, which would lead to MMP-2 nitrosylation, decreasing its activity by consequence.

**Keywords:** matrix metalloproteinases, sodium nitrite, hypertension, nitrosylation, vascular remodeling.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1-</b> Ativação intracelular e extracelular da MMP-2 .....	16
<b>Figura 2:</b> Via nitrato-nitrito-NO .....	19
<b>Figura 3:</b> Regulação enzimática e não enzimática da homeostase dos S-nitrosotiois (S-NO).. .....	25
<b>Figura 4:</b> Tratamento das células com RNAi para GSNOR (20nM), PMA (100nM) e GSNO (100nM). .....	35
<b>Figura 5:</b> Tratamento das células com RNAi para GSNOR (20nM), Ang II(10µM) e GSNO (100nM). .....	36
<b>Figura 6:</b> Protocolo animal. ....	37
<b>Figura 7:</b> Efeito do PMA na atividade das gelatinases em células musculares lisas vasculares .....	44
<b>Figura 8:</b> Efeitos do Nitrito e GSNO no aumento da atividade das gelatinases ocasionado pelo PMA em células musculares lisas vasculares .....	45
<b>Figura 9:</b> Efeito da Angiotensina II na atividade das gelatinases em células musculares lisas vasculares .....	46
<b>Figura 10:</b> Efeitos do Nitrito e GSNO no aumento da atividade das gelatinases ocasionado pela Ang II em células musculares lisas vasculares .....	47
<b>Figura 11:</b> Expressão da GSNOR por imunofluorescência nos grupos controle e GSNOR- .....	48
<b>Figura 12:</b> Expressão da GSNOR por western-blot normalizada pela expressão da $\beta$ -actina nos grupos controle e GSNOR-.....	49
<b>Figura 13:</b> Efeitos do GSNO no aumento da atividade das gelatinases ocasionado pelo PMA em células musculares lisas vasculares .....	50
<b>Figura 14 :</b> Efeitos do GSNO no aumento da atividade das gelatinases ocasionado pelo PMA em células musculares lisas vasculares controle ou com deleção parcial de GSNOR (grupo GSNOR-). .....	51
<b>Figura 15:</b> Efeitos do GSNO no aumento da atividade das gelatinases ocasionado pela Ang II em células musculares lisas vasculares controle ou com deleção parcial de GSNOR (grupo GSNOR-) .....	52
<b>Figura 16:</b> Nitrosilação total nos grupos controle e com deleção parcial de GSNOR (GSNOR-).....	53
<b>Figura 17:</b> MMP-2 nitrosilada normalizada pelos níveis totais de MMP-2 nos grupos controle e com deleção parcial de GSNOR (GSNOR-).....	54
<b>Figura 18:</b> Pressão arterial sistólica de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, SPL-334, Nitrito ou Nitrito+SPL 334.....	55
<b>Figura 19:</b> Remodelamento vascular (aorta) obtido pelos parâmetros média/lúmen e área de secção transversal em animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, SPL-334, Nitrito ou Nitrito+SPL 334. ....	57
<b>Figura 20:</b> Determinação dos níveis de espécies relacionadas ao NO no plasma de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, SPL-334, Nitrito ou Nitrito+SPL 344 .....	58
<b>Figura 21:</b> Determinação dos níveis de espécies relacionadas ao NO na aorta de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, SPL-334, Nitrito ou Nitrito+SPL 334. ....	60
<b>Figura 22:</b> pH estomacal de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Nitrito+Omeprazol. ....	61
<b>Figura 23:</b> Pressão arterial sistólica de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Nitrito+Omeprazol. ....	62

<b>Figura 24:</b> Atividade gelatinolítica in situ de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito.....	64
<b>Figura 25:</b> Atividade gelatinolítica em gel de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito.....	66
<b>Figura 26:</b> Atividade da NADPH oxidase em animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito.....	68
<b>Figura 27:</b> Níveis de superóxido obtidos pelo método de DHE em animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito .....	69
<b>Figura 28:</b> Remodelamento vascular (aorta) obtido parâmetros média/lúmen e área de secção transversal em animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito. ....	72

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- 2R1C-2** rins 1 clipe
- ADH5**-Álcool desidrogenase classe 5
- ADMA**-Dimetilarginina assimétrica
- Ang II**-Angiotensina II
- AST**-Área de Secção Transversal
- AT<sub>1</sub>**-Receptor tipo 1 de angiotensina II
- ATP**-Adenosina trifosfato
- BH<sub>4</sub>**- Tetraidrobiopterina
- CMLVs**-Células musculares lisas vasculares
- DAG**-Diacilglicerol
- DHE**-Dihidroetídio
- DMEM**-Meio eagle modificado por dulbecco
- eNOS**- Óxido nítrico sintase endotelial
- EROs**-Espécies reativas de oxigênio
- FAD**- Dinucleótido de flavina e adenina
- FMN**- Mononucleótido de flavina
- GC**-Guanilato ciclase
- GMPc**- Monofosfato cíclico de guanosina
- GSH**-Glutationa
- GSNO**-S-nitrosoglutationa
- GSNOR**-S-nitrosoglutationa redutase
- GTP**-Guanosina trifosfato
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**-Peróxido de hidrogênio
- HNO<sub>2</sub>**-Ácido nitroso
- IBPs**-Inibidores da bomba de prótons
- iNOS**- Óxido nítrico sintase induzida
- L-NAME**- N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster
- M/L**-Média/Lúmen
- MMP-2**-Metaloproteinase de matriz-2
- MMP-9**-Metaloproteinase de matriz-9
- MMPs**- Metaloproteinases de matriz

**NADPH**- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**NFκB**-Fator Nuclear kappa B  
**nNOS**-Óxido nítrico sintase neuronal  
**NO**-Óxido nítrico  
**NOS**-Óxido nítrico sintase  
**Nrf-2**-Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>**- Superóxido  
**O<sub>3</sub>**-Ozônio  
**OH<sup>•</sup>**-Radical hidroxila  
**ONOO<sup>-</sup>**-Peroxinitrito  
**PKC**-Proteína quinase C  
**PMA**- 12-miristato-13-acetato de forbol  
**proHB-EGF**-Pro-fator de crescimento de ligação de heparina  
**RNAi**-Ácido ribonucleico de interferência  
**RNNO**-Espécies N-nitrosiladas  
**RSNO**-Espécies S-nitrosiladas  
**RXNO**-Espécies nitrosiladas totais  
**S**-ânion tiolato  
**SFB**-Soro fetal bovino  
**SOD**-Superóxido dismutase  
**TBARS**-Ácido tiobarbitúrico  
**TGF-β**-Fator de transformação do crescimento beta  
**VEGF**-Fator de crescimento do endotélio vascular  
**XOR**-Xantina oxidoreductase

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1. O papel das metaloproteinases de matriz na hipertensão arterial .....	13
1.2. Ciclo nitrato-nitrito-NO .....	17
1.3. Efeitos benéficos do nitrito de sódio na hipertensão arterial.....	19
1.4. Nitrosilação de metaloproteinases de matriz .....	21
1.5. Efeitos da inibição da enzima S-nitrosoglutathione redutase no sistema cardiovascular .....	23
1.6. Omeprazol e seus efeitos deletérios no sistema cardiovascular .....	25
<b>2. HIPÓTESE</b> .....	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1. Geral.....	30
3.2. Específicos .....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
4.1. Protocolo I: Avaliação, <i>in vitro</i> , da influência da S-nitrosilação da MMP-2 ocasionada pelo nitrito nesta enzima. ....	32
4.1.1. Cultivo celular .....	32
4.1.2. Tratamento das células musculares lisas .....	32
4.2. Protocolo II: Avaliação, <i>in vitro</i> , da inibição da GSNOR nos efeitos anti-MMP exercidos pelo tratamento com GSNO .....	33
4.2.1. Western-Blot para GSNOR .....	33
4.2.2. Imunofluorescência para GSNOR.....	34
4.2.3. Nitrosilação da MMP-2 através do ensaio de troca de biotina .....	34
4.3. Protocolo III: Avaliação, <i>in vivo</i> , da influência da S-nitrosilação nos efeitos de diminuição de MMP-2 exercida pelo nitrito de sódio.....	36
4.3.1. Animais .....	36
4.3.2. Hipertensão Arterial Induzida pela Técnica de Goldblatt.....	36
4.3.3. Determinação do pH estomacal .....	38
4.3.4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelo método DHE.....	38
4.3.5. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelo método da lucigenina..	39
4.3.6. Determinação da atividade gelatinolítica <i>in situ</i> de MMPs .....	39
4.3.7. Avaliação de níveis e atividade de MMP-2 e -9 por zimografia em gel .....	40
4.3.8. Determinação das concentrações plasmáticas de nitrito, RXNO e RSNO e aórticas de nitrito e RXNO. ....	40
4.3.9. Análise morfométrica e composição da parede vascular .....	41
4.3.10. Análise dos resultados .....	42
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>

5.1. O 12-Miristato 13-Acetato de Forbol (PMA) aumentou a atividade das gelatinases em células musculares lisas vasculares. ....	44
5.2. O GSNO, mas não o nitrito, foi capaz de reduzir o aumento na atividade das gelatinases ocasionado pelo tratamento com PMA 100nM. ....	45
5.3. A Angiotensina II (Ang II) aumentou a atividade das gelatinases em células musculares lisas vasculares. ....	46
5.4. O GSNO, mas não o nitrito, foi capaz de reduzir o aumento na atividade das gelatinases ocasionado pelo tratamento com Ang II 10µM. ....	47
5.5. O tratamento de células musculares lisas com RNAi para GSNOR foi capaz de reduzir a expressão desta enzima. ....	48
5.6. Em menores concentrações (10 e 100nM), o GSNO não reverteu o aumento na atividade das gelatinases ocasionado pelo PMA. ....	50
5.7. A deleção parcial da enzima GSNOR potencializou o efeito do GSNO na reversão do aumento das gelatinases ocasionado pelo PMA. ....	50
5.8. A deleção parcial da enzima GSNOR não potencializou o efeito do GSNO na reversão do aumento das gelatinases ocasionado pela Ang II. ....	51
5.9. A deleção parcial da enzima GSNOR aumentou a nitrosilação da MMP-2. ....	52
5.10. O tratamento com SPL 334 potencializou os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio (1mg/kg) na hipertensão renovascular. ....	55
5.11. O tratamento com SPL 334 isoladamente e a combinação Nitrito+SPL 334 foram capazes de melhorar parâmetros de remodelamento vascular na hipertensão renovascular	56
5.12. O tratamento concomitante de Nitrito e SPL 334 não gerou aumento nos metabólitos do NO no plasma de animais normotensos ou hipertensos. ....	57
5.13. O tratamento concomitante de Nitrito e SPL 334 gerou aumento de nitrito na aorta de animais hipertensos. ....	59
5.14. O tratamento com omeprazol aumentou o pH estomacal dos animais tratados. ....	61
5.15. O tratamento com Omeprazol (10mg/kg) reverteu os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio (15mg/kg) na hipertensão renovascular. ....	62
5.16. O tratamento com Omeprazol (10mg/kg) reverteu os efeitos in situ na redução das gelatinases exercidos pelo nitrito de sódio (15mg/kg) na hipertensão renovascular. ....	63
5.17. O tratamento com nitrito de sódio (15mg/kg) tendeu a reduzir os níveis de MMP-2 em animais hipertensos 2R1C e o tratamento concomitante com omeprazol não interferiu neste efeito. ....	64
5.18. O tratamento com nitrito de sódio (15mg/kg) diminuiu o estresse oxidativo em animais hipertensos 2R1C e o tratamento concomitante com omeprazol reverteu este efeito. ....	67
5.19. O tratamento com nitrito de sódio (15mg/kg) foi capaz de melhorar um dos parâmetros de remodelamento vascular avaliados na hipertensão. ....	70
6. <i>DISCUSSÃO</i> . ....	74
7. <i>CONCLUSÕES</i> . ....	83
8. <i>REFERÊNCIAS</i> . ....	85

# ***INTRODUÇÃO***

---

## **1.INTRODUÇÃO**

### **1.1. O papel das metaloproteinases de matriz na hipertensão arterial**

A hipertensão arterial é uma doença de alta prevalência global. Em 2010, aproximadamente 1,4 bilhões de pessoas foram diagnosticadas com esta enfermidade, que é marcada por uma fisiopatologia complexa afetando diversos sistemas e é, atualmente, o fator de risco mais comum para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares, como a doença arterial coronariana, o infarto do miocárdio, a doença renal crônica, a síndrome metabólica e dislipidemias (COHUET; STRUIJKER-BOUDIER, 2006; EGAN *et al.*, 2019).

A manutenção da pressão arterial normal é resultado de um equilíbrio entre o débito cardíaco e a resistência vascular periférica. Um desequilíbrio nesses parâmetros e consequente aumento da pressão arterial gera alterações estruturais e funcionais nos vasos sanguíneos, como a redução da elasticidade arterial e aumento da espessura da parede, que contribuem para a diminuição do fluxo e elevação da resistência vascular. Esse processo é conhecido como remodelamento vascular mal adaptativo, que é marcado por um aumento na proliferação de células musculares lisas vasculares (CMLVs), além de uma mudança de fenótipo destas células, que passam de seu fenótipo contrátil para o fenótipo sintético, o qual é caracterizado pela secreção e deposição anormal de componentes da matriz extracelular, como colágeno, proteoglicano, fibronectina, além de fragmentação de elastina, expressão de fatores de adesão e diminuição na expressão de proteínas contráteis (HAYASHI; NAIKI, 2009).

Na hipertensão, normalmente, o remodelamento observado nas artérias de condutância é o hipertrófico, com o aumento da espessura da parede do vaso devido a migração e proliferação das CMLVs, enquanto que nos vasos de resistência este remodelamento pode ser eutrófico, que é caracterizado pelo rearranjo das CMLVs na camada média, reduzindo o tamanho do lúmen e do diâmetro externo, mantendo uma espessura normal da parede vascular

(HAYASHI; NAIKI, 2009). O remodelamento vascular observado na hipertensão arterial, bem como a proliferação e mudança fenotípica observada nas CMLVs são favorecidos pela ação de enzimas conhecidas como metaloproteinases de matriz (MMPs).

Atualmente, já foram identificados 28 tipos de MMPs e já se sabe que, além de atuar em processos fisiológicos como a embriogênese e angiogênese, estas estão relacionadas com situações patológicas como a progressão de metástases, inflamação e artrite (CHOW; CENA; SCHULZ, 2007; RA; PARKS, 2007). De maneira mais específica, as MMP-2 e MMP-9, conhecidas como gelatinases, tem sido relacionadas com diversas doenças cardiovasculares como aterosclerose, insuficiência cardíaca e hipertensão arterial (CREEMERS *et al.*, 2001; DANIELLE; MICHELE; CASTRO, 2016; JOHNSON, 2017).

No que se refere à estrutura, as metaloproteinases de matriz possuem em comum um sítio ativo de  $Zn^{2+}$ , além do domínio auto inibitório, que contém um resíduo de cisteína e do domínio C-terminal hemopexina (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006). Desde sua descoberta, em 1968, estas têm sido relacionadas com a atividade colagenolítica durante o processo de degradação da matriz extracelular (MEC) (GROSS; LAPIERE, 1962). Estas endopeptidases são secretadas para o meio extracelular na sua forma inativa (pro-MMPs) e são mantidas nessa forma pela sustentação da interação do grupo tiol (SH) do resíduo de cisteína do domínio autoinibitório com o  $Zn^{2+}$  do sítio catalítico (SPRNGMAN *et al.*, 1990). Para que uma MMP se torne cataliticamente ativa é preciso que haja a quebra da interação tiol- $Zn^{2+}$ . Isto pode ocorrer tanto pela proteólise do pró domínio, quanto pela redução do grupo tiol por agentes oxidantes (RA; PARKS, 2007).

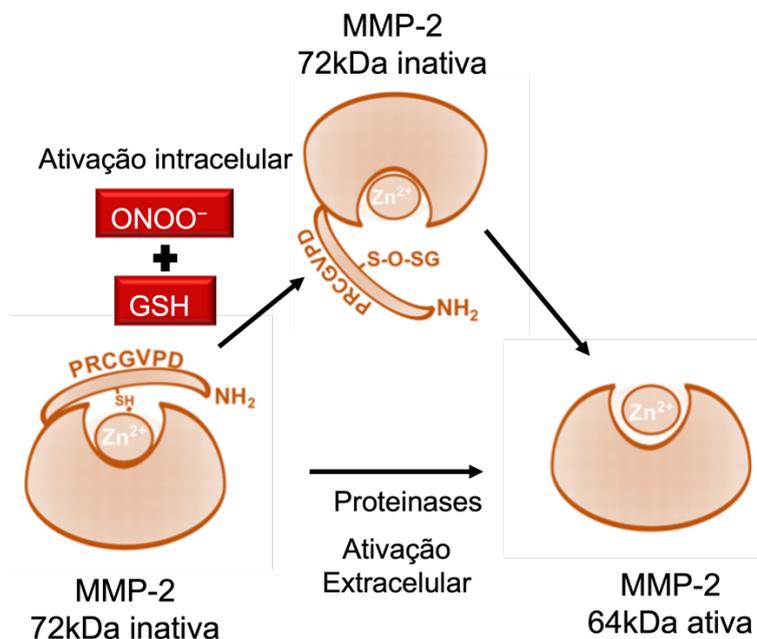
O aumento do estresse oxidativo observado em várias doenças cardiovasculares pode resultar em uma exacerbação da ativação de MMPs (JOHNSON, 2017). Este aumento pode se dever, por exemplo, a uma maior atividade do sistema renina-angiotensina. Nesse sentido, o aumento da estimulação de receptores AT1 ocasionado pela maior atividade deste sistema vai

gerar formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e disfunção endotelial (CASTRO *et al.*, 2008). EROs são moléculas quimicamente reativas que contêm oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (MÜNZEL *et al.*, 2017). A formação de EROs como o peroxinitrito, por exemplo, pode resultar no desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase (NOS), saindo de sua forma dimérica que produz óxido nítrico (NO), para sua forma monomérica que leva à produção do ânion superóxido, gerando ainda mais estresse oxidativo (CASTRO *et al.*, 2008).

A grande quantidade de peroxinitrito gerado pelo aumento do estresse oxidativo em doenças cardiovasculares pode resultar na glutatilação das MMPs. Esta reação consiste na adição da glutathione (GSH) às proteínas, sendo que a princípio, qualquer sulfidril da proteína exposta na forma de ânion tiolato ( $S^-$ ) pode sofrer glutatilação por ataque nucleofílico de GSH (HILL; BHATNAGAR, 2012). No entanto, a maioria dos estudos aponta que esta reação ocorre, principalmente, em condições de estresse oxidativo ou nitrosativo (BABA; BHATNAGAR, 2018). Nestas situações, pode haver um rompimento do equilíbrio com o peroxinitrito, levando à formação de GSNO e favorecendo a glutatilação oxidativa do domínio autoinibitório das pró MMPs, expondo o sítio catalítico da enzima e levando à ativação das mesmas (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009; PAPERS *et al.*, 2001). Esta ativação ocorre mediante a ruptura da interação do zinco do domínio catalítico com o resíduo de cisteína do domínio autoinibitório e tem como produto a MMP-2 de 72 kDa em sua forma ativa. Além disso, a ativação também pode se dar por ação de proteinases, onde há a total proteólise do pró-domínio e formação da isoforma ativa de 64kDa (Figura 1). (DANIELLE; MICHELE; CASTRO, 2016; JOHNSON, 2017).

O remodelamento vascular consiste num processo que pode ser, inicialmente, benéfico, já que auxilia na adaptação do vaso frente às alterações hemodinâmicas oriundas de um aumento na pressão arterial (LEMARIE; THARAUX; LEHOUX, 2010). Porém, na

hipertensão, onde esse aumento é sustentado, pode haver o desenvolvimento de um remodelamento crônico e levar a uma disfunção endotelial que podem culminar em alterações na MEC e no fenótipo das células musculares lisas vasculares, como dito anteriormente (HAYASHI; NAIKI, 2009). As MMPs fazem parte da etiogênese do remodelamento não apenas por controlar a proliferação e crescimento destas das CMLVs, mas também por gerarem a clivagem proteolítica de fatores de crescimento, como o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) (CHANG; WERB, 2001). Estudos clínicos e realizados em animais já comprovaram a contribuição das MMPs, especialmente da MMP-2, para o remodelamento vascular na hipertensão (CASTRO *et al.*, 2008; GUIMARAES *et al.*, 2011). Já foi demonstrado, inclusive, que em animais *knockout* para MMP-2 existe a prevenção da disfunção endotelial, do remodelamento vascular e do estresse oxidativo induzidos pela angiotensina II (BARHOUMI *et al.*, 2017).



**Figura 1- Ativação intracelular e extracelular da MMP-2:** A MMP-2 é secretada em sua forma inativa (isoforma de 72 kDa). Diante do aumento da produção de peroxinitrito e interação deste com o GSH, pode haver a glutatiolagem do domínio autoinibitório da enzima, quebrando a interação Zn-tiol e expondo o seu sítio catalítico (isoforma ativa de 72kDa). Também pode

haver a proteólise direta da enzima gerando a isoforma ativa de 64kDa. Adaptado de: (LIM *et al.*, 2010)

## 1.2. Ciclo nitrato-nitrito-NO

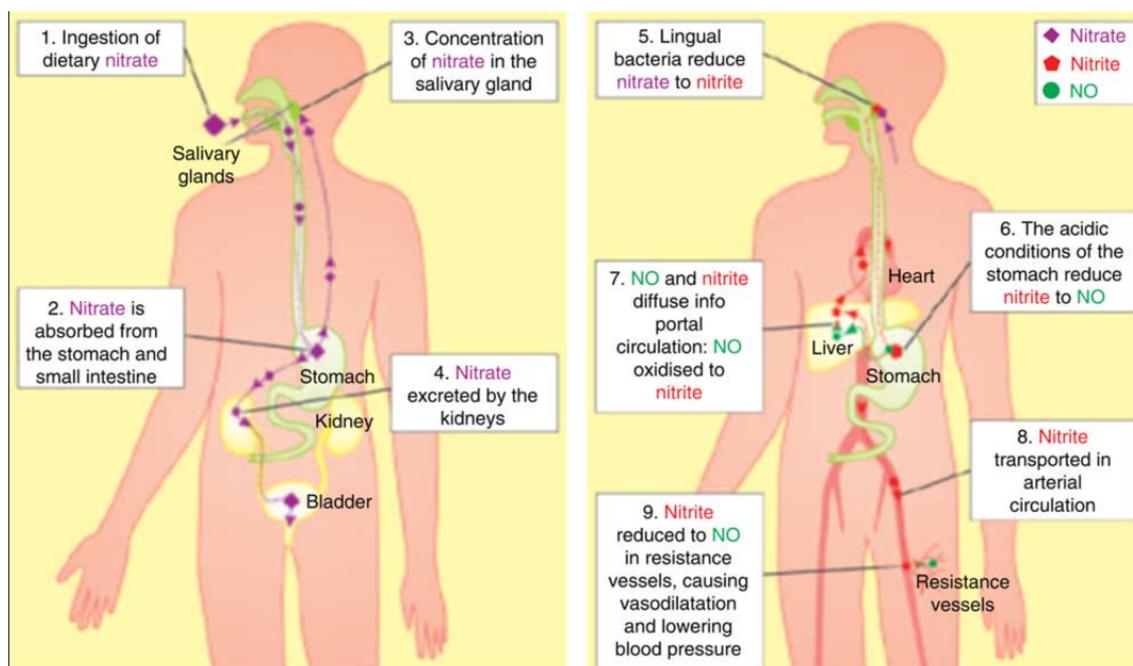
O óxido nítrico é uma molécula que desempenha um papel crucial em diversos processos fisiológicos. Desde sua descoberta em 1998 até os dias atuais, já foi demonstrado que ele participa de processos fisiológicos no coração e nos vasos sanguíneos, na neurotransmissão, entre outros. Inicialmente, foi descrita a via canônica ou clássica para a produção de óxido nítrico. Nesta, o NO é produzido tendo a L-arginina como substrato da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual pode ser encontrada em diferentes isoformas, como a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzida (iNOS). Destacaremos a isoforma endotelial, já que esta desempenha o papel mais importante no sistema cardiovascular (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; MONCADA, 1994). A eNOS é uma enzima dependente do complexo cálcio-calmodulina e, em sua forma dimérica, é constituída de dois monômeros idênticos, sendo estes associados a duas calmodulinas, possuindo dois domínios, o domínio redutase C-terminal e o domínio oxigenase N-terminal (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; PALMER, R M; ASHTON; MONCADA, 1988).

Em suma, estímulos físicos como estresse de cisalhamento e a ação de agonistas como a acetilcolina, a bradicinina e a histamina, geram um aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  na célula endotelial, que ativa a eNOS e gera a produção de NO e L-citrulina a partir da L-arginina. Esta produção se dá com a participação de co-substratos como o oxigênio e a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH), além de cofatores como o dinucleótido de flavina e adenina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN), tetraidrobiopterina ( $BH_4$ ), heme e calmodulina (IGNARRO, 1996). Por ser um gás, o NO pode facilmente se difundir para as CMLVs, onde é responsável por ativar a guanilil ciclase (GC), possibilitando a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato de guanosina 3'5'cíclico (GMPc), um segundo

mensageiro que gera uma cascata de eventos, os quais culminam na diminuição da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  na CMLV e consequente vasodilatação (PARK; SANDNER; KRIEG, 2018; TENOPOULOU; DOULIAS, 2020).

Nas últimas décadas, foi descoberta uma via alternativa para a produção de NO, a via nitrato-nitrito-NO. Nesta, além da formação de NO, há a formação de outros óxidos de nitrogênio com papel fisiológico conhecido (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). A via nitrato-nitrito-NO pode ser suplementada pela dieta, com o consumo de vegetais verdes como o alface, a rúcula e o espinafre, além da beterraba, uma importante e rica fonte de nitrato (KAPIL *et al.*, 2013). O nitrito também pode ser ingerido durante o consumo de carnes, já que este é utilizado como aditivo alimentar para prevenir o botulismo e melhorar a aparência dos alimentos (HABERMEYER *et al.*, 2015).

O nitrato da dieta é deglutido e absorvido no intestino, porém, uma vez na corrente sanguínea, cerca de 25% do nitrato é transportado pela sialina, um transportador de nitrato/ $\text{H}^+$  para as glândulas salivares e posteriormente secretado na cavidade oral. Nesta, existem bactérias comensais capazes de realizar a conversão de nitrato a nitrito, já que estas utilizam o nitrato como aceptor de elétrons para produzir adenosina-5'-trifosfato (ATP) durante a respiração (KAPIL *et al.*, 2013; OLIVEIRA-PAULA; TANUS-SANTOS, 2018). O nitrito, quando em contato com o estômago favorecido pelo pH ácido do mesmo ( $\text{pH} \leq 3$ ), é convertido a NO e espécies relacionadas a este, como o ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e o anidrido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) que, por serem importantes fontes de nitrosação, induzem a formação de S-nitrosotiois como a S-nitrosoglutamina (GSNO) (BENJAMIN *et al.*, 1994; BRONIEWSKA; HOGG, 2012). O NO formado a partir da L-arginina e o formado a partir do nitrito no estômago também podem ser degradados através de reações de oxidação realizadas pelas oxi-hemoglobinas podendo dar origem ao nitrito que, posteriormente, pode ser oxidado a nitrato, reiniciando o ciclo (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008) (Figura 2).



**Figura 2: Via nitrato-nitrito-NO.** O nitrato da dieta é absorvido no intestino, uma parte é excretada e a outra é ativamente secretada pelas glândulas salivares. Na boca, bactérias comensais são capazes de reduzir nitrato a nitrito, que ao ser deglutido e atingir o ambiente ácido do estômago é convertido a NO e espécies relacionadas (nitrosotóis). Na circulação porta, o NO pode ser oxidado a nitrito (por oxi-hemoglobinas), que é transportado para a circulação arterial, onde pode ser reduzido a NO, causando diminuição da resistência vascular e na pressão arterial. Adaptado de: (JACKSON *et al.*, 2017).

### 1.3. Efeitos benéficos do nitrito de sódio na hipertensão arterial

O endotélio vascular forma o revestimento interno dos vasos sanguíneos e linfáticos e desempenha um importante papel na modulação do tônus vascular, sendo responsável pela liberação de diversos fatores relaxantes tais como prostaglandinas, fatores hiperpolarizantes, além do NO. Em contrapartida, este também é responsável pela liberação de moléculas vasoconstritoras, tais como endotelina e alguns prostanóides (GALLEY; WEBSTER, 2004; GODO; SHIMOKAWA, 2017). A disfunção endotelial (maior produção de moléculas vasoconstritoras em detrimento de moléculas vasodilatadoras) observada em doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial tem como causa o aumento do estresse oxidativo, especialmente do ânion superóxido, por ação de enzimas como a nicotinamida adenina

dinucleotídeo (NADPH) oxidase, xantina oxidoreductase (XOR), além de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e da eNOS desacoplada (INCALZA *et al.*, 2018). O aumento na expressão e atividade da MMP-2 vascular tem sido demonstrado em diversos modelos animais de hipertensão arterial, favorecendo também a disfunção endotelial, já que em animais *knockout* para MMP-2 esta disfunção não foi observada (BARHOUMI *et al.*, 2017). Assim como a formação de ROS resulta em aumento na ativação de MMPs, estas clivam moléculas como o pró-fator de crescimento de ligação de heparina (pro-HB-EGF), resultando em trans ativação do receptor de HB-EGF, gerando uma sinalização intracelular que aumenta a formação de ROS (PRADO *et al.*, 2018). Portanto, existem evidências de que o aumento da atividade de MMP-2, por exemplo, pode aumentar a formação vascular de EROs (PRADO *et al.*, 2018).

Os metabólitos do NO, nitrato e nitrito, que antes eram tratados como inertes, atualmente têm seus efeitos em diversas doenças cardiovasculares comprovados (LEE *et al.*, 2018; PINHEIRO *et al.*, 2012). Vários estudos demonstram os efeitos anti-hipertensivos do nitrito em diferentes modelos de hipertensão (AMARAL *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2015). Tais efeitos podem ser, pelo menos em parte, dependentes dos seus efeitos antioxidantes, demonstrados através da redução da fluorescência do Dihidroetídio (DHE), diminuição dos níveis plasmáticos de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), inibição vascular da atividade da NADPH oxidase, além de aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD), uma enzima antioxidante (MONTENEGRO *et al.*, 2012, 2011). Um estudo que utilizou duas diferentes doses de nitrito (1mg/kg e 15mg/kg) demonstrou que as duas doses foram capazes de aumentar o acúmulo de fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2) no núcleo da célula, além de aumentar a expressão de genes de moléculas antioxidantes regulados por Nrf-2 como a catalase, a glutathiona peroxidase e a tioredoxina-1 e 2 (AMARAL *et al.*, 2019).

O efeitos benéficos da suplementação da via nitrato-nitrito-NO também se dão pela sua capacidade de restaurar a disponibilidade de NO e moléculas relacionadas, especialmente os S-

nitrosotióis (RSNO), já que com o tratamento concomitante com omeprazol, por alterar o pH estomacal e a consequente formação de RSNO, atenua os efeitos benéficos do nitrito na hipertensão (PINHEIRO *et al.*, 2015). Também têm sido demonstrado que tratamento com nitrito de sódio diminui a ativação de MMPs e o remodelamento vascular por consequência, além de atenuar a produção de MMP-9 pelas células endoteliais, independentemente da formação de NO (MESCHIARI *et al.*, 2016). Porém, o mecanismo pelo qual o nitrito de sódio inibe as MMPs ainda permanece desconhecido.

#### **1.4. Nitrosilação de metaloproteínas de matriz**

Já foi demonstrado que o NO não é capaz de reagir diretamente com grupos tiólicos e formar nitrosotiois *in vivo*. Porém, como dito anteriormente, o ambiente ácido do estômago favorece a formação de espécies nitrosantes como o  $N_2O_3$  e o  $NO^+$  que podem gerar modificações pós traducionais ao reagir com grupos tiólicos de cisteínas, formando o produto S-nitrosilado e nitrito (WINK *et al.*, 1994). Modificações pós traducionais são eventos de processamento covalente que ocorrem por clivagem proteolítica ou adição de um grupo químico a uma proteína, sendo importantes reguladores da função celular (FENG; CHEN; ZUO, 2019). A S-nitrosilação é uma modificação pós traducional reversível, onde ocorre a incorporação do NO ao grupo tiol da cisteína de uma proteína, gerando um S-nitrosotiol (SNO) (MARTÍNEZ-RUIZ; LAMAS, 2007). É importante ressaltar que a S-nitrosilação ocorre tanto em proteínas, produzindo espécies S-nitroso quanto em tióis de baixo peso molecular, incluindo a glutathiona, gerando a S-nitrosoglutationa (ANAND *et al.*, 2014). É importante ressaltar que o GSNO é capaz de nitrosilar proteínas por reações de transnitrosilação, onde um grupo S-nitroso funcional pode ser transferido ao ânion tiolato da proteína alvo em uma reação reversível (BRONIOWSKA; HOGG, 2012).

Já foi demonstrado que a formação de S-nitrosotióis é crucial para a resposta anti-hipertensiva exercida pelo nitrito, indicando que a S-nitrosilação e transnitrosilação de diferentes

proteínas podem estar criticamente envolvidos nesta resposta (PINHEIRO *et al.*, 2015). Já foi observado, inclusive, que o aumento do pH gástrico alcançado pelo tratamento com omeprazol reduz os efeitos anti-hipertensivos ocasionados pelo nitrito oral em ratos (PINHEIRO *et al.*, 2012). Como dito anteriormente, de maneira semelhante à fosforilação, a S-nitrosilação pode alterar a função e a sinalização celular (OLIVEIRA-PAULA; TANUS-SANTOS, 2018). Já foi demonstrado, por exemplo, que a S-nitrosilação da cisteína 289 do receptor tipo 1 da angiotensina II reduz a sua afinidade de ligação à angiotensina II e que S-nitrosilação da NADPH oxidase inibe a produção de superóxido podendo preservar a biodisponibilidade do NO (LECLERC *et al.*, 2006; SELEMIDIS *et al.*, 2007) 34,35.

Em relação à interferência da S-nitrosilação na atividade das MMPs, já foi demonstrado em cultura de células cérebro corticais que a S-nitrosilação de um resíduo tiol no pró domínio da MMP-9, pode levar à ativação da enzima e morte celular por apoptose (GU *et al.*, 2002). Em contrapartida, o tratamento de células epiteliais brônquicas humanas com GSNO previamente estimuladas com TNF- $\alpha$  foi capaz de diminuir a atividade da MMP-9 causada pelo tratamento com a citocina (OKAMOTO *et al.*, 2002). Estes estudos nos sugerem que a ação dos nitrosotiois nas MMPs poderia ser dependente do tecido e condições às quais o mesmo estaria exposto.

Ainda não foi demonstrado se a MMP-2 pode sofrer S-nitrosilação, e se esta modificação pós traducional pode alterar sua atividade enzimática, porém suas semelhanças estruturais com a MMP-9 sugerem que a mesma poderia sofrer ação semelhante de moléculas nitrosantes. Adicionalmente, um estudo realizado em indivíduos negros correlacionou negativamente os níveis circulantes de MMP-2 e MMP-9 com a formação endógena de óxido nítrico, sugerindo uma relação entre uma diminuição na formação de NO e um aumento na atividade de gelatinases (METZGER; SANDRIM; TANUS-SANTOS, 2012). Também já foi demonstrado que o aumento das EROs observado em doenças cardiovasculares pode levar a uma maior ativação de MMPs, favorecendo o remodelamento vascular e que o nitrito de sódio

é capaz de reduzir o estresse oxidativo, além de promover a formação de S-nitrosotiois, que podem alterar funções celulares, inclusive as relacionadas à ativação de MMPs (MESCHIARI *et al.*, 2016; SANCHES-LOPES *et al.*, 2020). Juntos, estes dados nos sugerem que, em um contexto de doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial, a suplementação da via nitrato-nitrito-NO poderia ter efeitos benéficos e que estes efeitos poderiam estar relacionados com a sua capacidade de diminuir a atividade de gelatinases.

### **1.5. Efeitos da inibição da enzima S-nitrosoglutationa redutase no sistema cardiovascular**

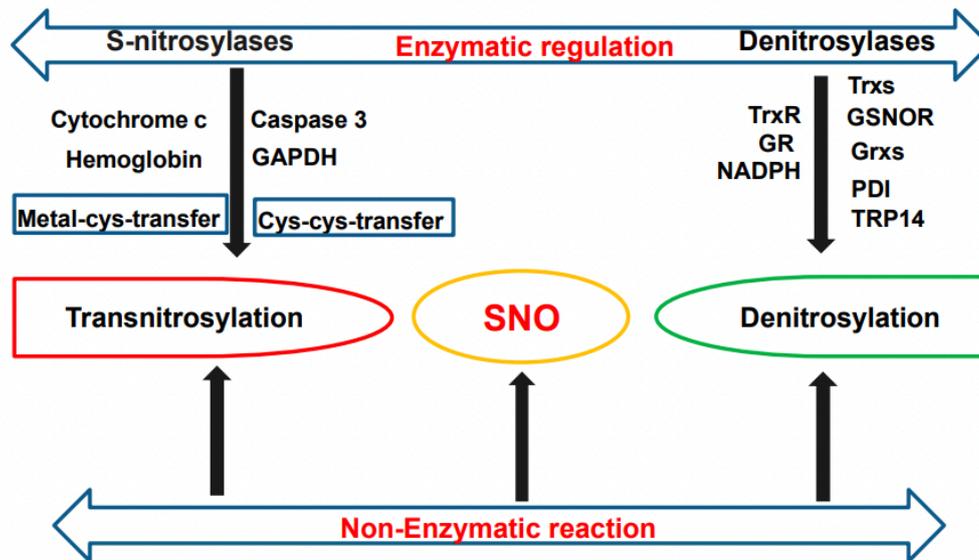
Atualmente, as classes mais importantes de enzimas denitrosilantes conhecidas são as do sistema tioredoxina e as denitrosilantes de moléculas de baixo peso molecular, que incluem a GSNO redutase e a SNO-CoA redutase (SNO-CoAR) (BENHAR; FORRESTER; STAMLER, 2009). A S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) ou álcool desidrogenase classe 5 (ADH 5) é uma enzima da família das álcool desidrogenases, que é encontrada na maioria dos tecidos, possuindo uma maior atividade no fígado e tem o GSNO como o único substrato. A redução do GSNO é feita através da transferência do hidreto do cofator NADPH para o nitrogênio da ligação S-NO com subsequente protonação do átomo de oxigênio, gerando um produto intermediário S-(N-hidroxi) que se converte em sulfinamida GSH. Em suma, a quantidade de nitrosotiois *in vivo* é controlada pela GSNOR (LÓPEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2008). Um estudo já demonstrou que a deficiência genética de GSNOR aumentou os níveis de GSNO *in situ* (LIU, L *et al.*, 2001) (Figura 3).

A regulação da atividade e expressão da GSNOR se dá por diferentes mediadores e varia de acordo com o contexto. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) induz a expressão de GSNOR nos pulmões (BHANDARI *et al.*, 2006). A interleucina-13 (IL-13) aumentou a expressão de GSNOR em células do lavado bronco alveolar de pacientes asmáticos

(MAROZKINA *et al.*, 2015). Embora ainda não tenha sido identificado um sítio de nitrosilação, já foi observado que GSNOR também pode ser nitrosilada e que esta modificação pós traducional gera um aumento na sua atividade (PALMER, Lisa A *et al.*, 2015).

A importância do equilíbrio na relação S-nitrosilação/denitrosilação no sistema cardiovascular é bem definida. Animais *knock-out* para GSNOR tem uma redução na resistência vascular e consequente vasodilatação sistêmica, sendo susceptíveis à hipotensão (BEIGI *et al.*, 2012). Além disso, já foi demonstrado que esses animais possuem uma mortalidade aumentada em modelos de sepse (LIU, Limin *et al.*, 2004), porém apresentam uma melhor regeneração cardíaca após o infarto do miocárdio, que envolve um aumento na proliferação e diferenciação de cardiomiócitos e neovascularização por células endoteliais (CASIN *et al.*, 2018). Em suma, uma supressão genética ou farmacológica da GSNOR fornece uma importante ferramenta para o estudo das vias do GSNO e de proteínas S-NO em diferentes tecidos e doenças (STOMBERSKI; HESS; STAMLER, 2019).

Já foram demonstrados benefícios da utilização de inibidores farmacológicos de GSNOR em diversos contextos. Em um estudo que induziu a doença pulmonar aguda em camundongos através da administração intranasal de SARS-CoV-2 recombinante, a administração de N6022 (inibidor de GSNOR) protegeu contra o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias do sangue e nos pulmões, bem como contra o aumento da inflamação vascular, além de diminuir a infiltração de células imunes no pulmão em ambos os sexos (KIM *et al.*, 2023). No modelo de hipertensão DOCA-sal, a inibição da GSNOR (N6338) levou a uma diminuição pressão arterial e reverteu as alterações renais induzidas pela hipertensão (CHEN, Qiumei *et al.*, 2013). Outro estudo que examinou os efeitos da inibição da GSNOR após parada cardíaca e ressuscitação cardiopulmonar, observou uma inibição da lesão cerebral isquêmica e melhora da sobrevivência em camundongos (HAYASHIDA *et al.*, 2019).



**Figura 3: Regulação enzimática e não enzimática da homeostase dos S-nitrosotiois (S-NO).** A homeostase celular dos SNO é regulada pela transnitrosilação e pela denitrosilação, através de reações enzimáticas e não enzimáticas. A conversão enzimática pode ser realizada via transferência metal-Cis por metaloproteínas como a hemoglobina ou via Cis-to-Cis transnitrosilases como a SNO-caspase-3. A denitrosilação de proteínas é realizada por 3 sistemas: o sistema das S-nitrosoglutationa redutases (GSNOR), o sistema das tioredoxinas (Trxs), e o das Glutaredoxinas (Grxs), sendo as dois últimos da subfamília das tioredoxinas. Adaptado de: (SHI; QIU, 2020).

### 1.6. Omeprazol e seus efeitos deletérios no sistema cardiovascular

O omeprazol é um pró-fármaco da classe dos inibidores da bomba de prótons (IBPs) que age inibindo a secreção gástrica. É utilizado no tratamento de alterações dispépticas oriundas da acidez gástrica. Em relação ao seu mecanismo de ação, o omeprazol age no estômago se ligando de maneira covalente a grupos sulfidrila nos resíduos de cisteína presentes na bomba de prótons ( $H^+ - K^+ - ATPase$ ) bloqueando-a de maneira quase irreversível, necessitando de uma nova síntese proteica para o restabelecimento das quantidades basais de  $H^+ - K^+ - ATPase$ . A bomba de prótons atua captando os íons  $K^+$  do meio extracelular e liberando hidrogênio do meio intracelular para o lúmen do estômago. Sendo assim, o tratamento com omeprazol gera um aumento no pH gástrico (OCHOA *et al.*, 2020; SHIN; KIM, 2013).

Os IBPs são uma das classes de medicamentos mais utilizadas no mundo (IIDA *et al.*, 2015). Os riscos cardiovasculares do uso do omeprazol foram, inicialmente, demonstrados

diante da descoberta de sua interação com um antiplaquetário amplamente utilizado, o clopidogrel. Essa interação se dá pelo fato de a enzima que converte o clopidogrel em sua forma ativa (CYP2C19) ser a mesma que metaboliza o omeprazol, resultando na redução do efeito antiplaquetário do clopidogrel (RAMSTE *et al.*, 2023).

O risco cardiovascular mediante o uso de omeprazol não envolve apenas sua utilização concomitante com o clopidogrel, mas também seu uso isolado, como já demonstrado em diversos estudos. Em humanos, o seu uso já foi associado ao risco de desenvolvimento de insuficiência cardíaca (LAZARUS *et al.*, 2016), de incidência de infarto do miocárdio, além de hipomagnesemia severa, contribuindo para o risco de desenvolvimento de arritmias (CHRYSANT, 2019).

Em animais, já foi demonstrado que o tratamento com omeprazol gera aumento de estresse oxidativo, aumento na atividade de metaloproteinases de matriz e consequente remodelamento vascular (NOGUEIRA *et al.*, 2021). Também já foi demonstrada uma redução na resposta de relaxamento à acetilcolina, além de aumento de dimetilarginina assimétrica (ADMA) e xantina oxidorreductase (XOR), ambos marcadores de estresse oxidativo e disfunção endotelial (PINHEIRO *et al.*, 2016a).

O prejuízo vascular decorrente da utilização de omeprazol e outros IBPs tem sido relacionado com seus possíveis efeitos deletérios sobre a produção de NO pela via canônica, especialmente por sua capacidade de aumentar a concentração endotelial de ADMA, o inibidor endógeno da NOS (GHEBREMARIAM *et al.*, 2013). Adicionalmente, seu efeito farmacológico de aumento do pH estomacal também resulta em interrupção da produção de NO no estômago pela via nitrato-nitrito-NO (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008).

Um estudo realizado em ratos hipertensos pelo modelo 2 rins 1 clipe (2R1C) demonstrou que o omeprazol é capaz de reduzir os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio pela via oral, provavelmente por bloquear a formação de espécies S-nitrosiladas no estômago. Estes

resultados nos sugerem que essas espécies e sua capacidade de agirem não só como doadores de NO, mas também de promover alterações funcionais em proteínas relacionadas a saúde cardiovascular, poderiam ser as principais efetoras dos efeitos benéficos do nitrito de sódio na hipertensão arterial e também em outros acometimentos cardiovasculares (PINHEIRO *et al.*, 2016b).

***HIPÓTESE***

---

## **2. HIPÓTESE**

Como dito anteriormente, o aumento do estresse oxidativo observado na hipertensão pode levar a uma maior ativação de MMPs e vice-versa, favorecendo o remodelamento vascular. O tratamento com nitrito de sódio melhora esses parâmetros e é capaz de aumentar a produção de nitrosotiois que, conhecidamente, podem alterar a atividade de proteínas, incluindo as MMPs. Nesse sentido, a hipótese desse trabalho é de que os efeitos benéficos do nitrito na hipertensão, especialmente no remodelamento vascular se devem, pelo menos em parte, à S-nitrosilação das MMPs, o que causaria uma diminuição na sua atividade.

## ***OBJETIVOS***

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

- Avaliar se os efeitos benéficos do nitrito de sódio na hipertensão arterial se devem à produção de nitrosotiois e nitrosilação das MMPs e consequente diminuição de sua atividade.

#### 3.2. Específicos

- Verificar se o nitrito e/ou GSNO seriam capazes de diminuir a atividade de gelatinases induzida por PMA ou Angiotensina II em células musculares lisas vasculares;
- Avaliar se a deleção parcial da GSNOR *in vitro* poderia aumentar a disponibilidade de GSNO aumentando seus efeitos na atividade das MMPs;
- Avaliar se a deleção parcial da GSNOR *in vitro* poderia aumentar a nitrosilação total e/ou nitrosilação da MMP-2;
- Avaliar se a inibição da GSNOR *in vivo* poderia potencializar os efeitos do nitrito na hipertensão arterial;
- Avaliar se a diminuição na formação de nitrosotiois (pela utilização de Omeprazol), *in vivo*, seria capaz de bloquear os efeitos do nitrito na hipertensão arterial.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Protocolo I: Avaliação, *in vitro*, da influência da S-nitrosilação da MMP-2 ocasionada pelo nitrito nesta enzima.

#### 4.1.1. Cultivo celular

Inicialmente foi realizado o isolamento das células musculares lisas vasculares de aorta de ratos. Brevemente, as aortas foram cuidadosamente dissecadas, lavadas com tampão fosfato e cortadas em anéis de 1 mm. Este macerado foi suspenso em meio de cultura HAM F12 contendo proteases que fizeram a digestão do tecido. Após filtração e centrifugação, o pellet obtido foi ressuspenso em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino, e as células foram incubadas em estufa 37°C e CO<sub>2</sub> (5%). Neste estudo, foram utilizadas células entre as passagens 4 e 7 (MO *et al.*, 2012).

#### 4.1.2. Tratamento das células musculares lisas

As células foram cultivadas em meio DMEM+10% de soro fetal bovino até atingir a passagem desejada. Posteriormente, estas foram transferidas para lâminas labtek a fim de permitir a realização de testes de fluorescência (zimografia *in situ*). Após 12 horas com meio DMEM+10% de soro fetal para fixação nas lâminas, o soro foi retirado por 6 h. Inicialmente, foram feitos tratamentos com os veículos das drogas (Controle, células não tratadas), 12-Miristato 13-Acetato de Forbol (PMA) (100nM e 200nM), angiotensina II (AngII) (100nM, 1 µM e 10 µM) para determinar as concentrações que seriam utilizadas nos experimentos posteriores (LIPOPROTEIN *et al.*, 2006; MESCHIARI *et al.*, 2016). Posteriormente, foram feitos tratamentos destas drogas juntamente com o nitrito (25 µM) ou GSNO (25µM e 50 µM) para verificar se estas seriam capazes de reverter as possíveis alterações ocasionadas pelo PMA e Ang II nas concentrações escolhidas. Em todos os tratamentos foi medida a atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) por zimografia *in situ*, como descrito posteriormente para os animais.

## **4.2. Protocolo II: Avaliação, *in vitro*, da inibição da GSNOR nos efeitos anti-MMP exercidos pelo tratamento com GSNO.**

A fim de realizar uma deleção parcial da expressão gênica da enzima GSNOR, foi utilizado o RNA de interferência (RNAi) para esta proteína (#AM16798, ThermoFisher). A transfecção foi realizada através do preparo de duas soluções separadamente, uma contendo o meio opti-mem (meio recomendado para os reagentes de transfecção) juntamente com lipofectamina (reagente de transfecção) e outra contendo o RNAi numa concentração de 20nM diluído no meio opti-mem. Posteriormente, foram adicionados 160 µl da mistura destas soluções a 7,8 ml de meio DMEM sem soro fetal bovino (SBF) ou antibiótico. As células controles passaram pelos mesmos procedimentos, porém sem adição do RNAi. Estas células foram coletadas utilizando inibidores de protease para posterior realização de western blot para GSNOR, como descrito posteriormente. Também foi realizada uma imunofluorescência para a enzima, a fim de confirmar que esta tinha sido parcialmente deletada. Além disso, foi avaliada a nitrosilação da enzima MMP-2 através da utilização de um kit (ab236207, Abcam), como descrito posteriormente.

### **4.2.1. Western-Blot para GSNOR**

Extratos de células contendo quantidades iguais de proteína total (100µg) foram submetidos a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare, Madison, WI, USA) pelo método semi-seco por 22 minutos. Estas membranas foram bloqueadas com 0,5% de leite+5% de BSA por 1 h e incubadas com o anticorpo para GSNOR (#11051-1-AP, 1:300, ThermoFisher) overnight a 4°C (DING *et al.*, 2022). Após lavagens com TBS-T, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário HRP (1:2500) em temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente, a membrana foi revelada usando o

kit de quimioluminescência ECL (GE Healthcare). A enzima GSNOR teve sua expressão normalizada pela expressão da enzima  $\beta$ -actina.

#### **4.2.2. Imunofluorescência para GSNOR**

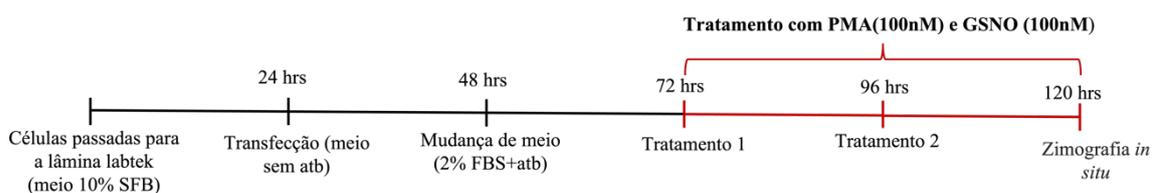
Para esta técnica, as células foram fixadas com metanol. Para isto, o meio foi aspirado e as células foram lavadas 2 vezes com PBS pré-aquecido em agitação por 5 minutos. Após isso, as células foram incubadas com metanol por 1 minuto a  $-20^{\circ}\text{C}$  e, posteriormente, incubadas com PBS gelado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. A etapa de bloqueio foi realizada utilizando BSA 1% em agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a incubação com o anticorpo primário para GSNOR diluído em PBS+ BSA 1% overnight a  $4^{\circ}\text{C}$  (#11051-1-AP, 1:300, ThermoFisher). Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS+Triton X-110 para posterior incubação com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-rabbit por 1 hora a  $4^{\circ}\text{C}$ . Por fim, as células foram lavadas 2 vezes com PBS+Triton X-110, acrescidas de DAPI para permitir a visualização do núcleo das mesmas. Posteriormente, foi feita a leitura das lâminas em microscópio em um aumento de 40x (YAMASHITA *et al.*, 2017).

#### **4.2.3. Nitrosilação da MMP-2 através do ensaio de troca de biotina**

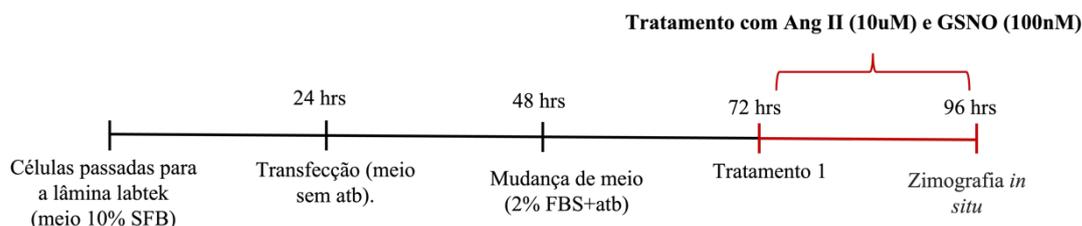
Foi medida a nitrosilação da MMP-2 em células controle ou tratadas com RNAi para GSNOR utilizando o kit ab236207, conforme descrito anteriormente (CHEN, Shanwen *et al.*, 2021). Resumidamente, as células foram coletadas utilizando um tampão de lavagem e lise do kit e centrifugadas para formação de um pellet. Posteriormente, estas foram incubadas com o reagente de bloqueio dos grupos tiois livres em agitação por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e centrifugadas novamente para posterior precipitação com acetona gelada seguida de centrifugação a 500x g por 5 minutos. Em seguida, as proteínas foram ressuspendidas com um tampão contendo o reagente de redução e biotinilação dos grupos S-NO e novamente precipitadas com acetona gelada e ressuspendidas para realização da etapa de western-blot, onde foi detectada a expressão da MMP-2 total (#10373-2-AP, 1:500, ThermoFisher). Para detecção da nitrosilação da MMP-

2, especificamente, foi realizada uma imunoprecipitação da proteína (kit #26149, ThermoFisher). Por fim, foi utilizado o anticorpo HRP em uma proporção de 1:75 conforme recomendado no kit para detecção da MMP-2 nitrosilada, que foi obtida através da razão MMP-2 nitrosilada/MMP-2 total na amostra. Para a quantificação da nitrosilação total das proteínas foi realizada diretamente a etapa com o anticorpo HRP.

Após confirmação da deleção parcial da enzima GSNOR pelos métodos de western-blot e imunofluorescência, as células foram transfectadas com RNAi para GSNOR (GSNOR-) na lâmina labtek, como descrito anteriormente para a placas. Vinte e quatro horas após a transfecção, foi adicionado o meio DMEM acrescido de 2% de soro e antibióticos. Após 24 horas, foram acrescidos às células controle e GSNOR- o PMA (100nM) e o GSNO (100nM) separada ou concomitantemente, como descrito na Figura 4, sendo este tratamento realizado novamente 24 horas depois. Por fim, foi realizado o método de zimografia *in situ* a fim de verificar a atividade das gelatinases em todos os grupos de tratamento. Para os grupos em que a Angiotensina II foi utilizada como ativadora de MMPs, o tratamento com as drogas foi realizado apenas uma vez, como descrito na Figura 5.



**Figura 4:** Tratamento das células com RNAi para GSNOR (20nM), PMA (100nM) e GSNO (100nM).



**Figura 5:** Tratamento das células com RNAi para GSNOR (20nM), Ang II(10 $\mu$ M) e GSNO (100nM).

### 4.3. Protocolo III: Avaliação, *in vivo*, da influência da S-nitrosilação nos efeitos de diminuição de MMP-2 exercida pelo nitrito de sódio.

#### 4.3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Sprague-dawley (180 a 200 gramas), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA 076/2020). Os animais foram mantidos em salas com ciclos claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25°C) e acesso livre a ração e água.

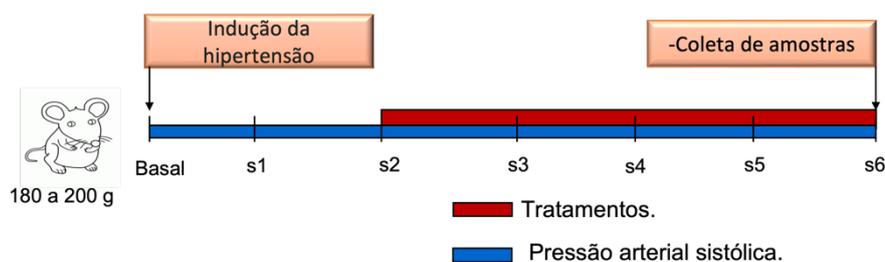
#### 4.3.2. Hipertensão Arterial Induzida pela Técnica de Goldblatt

Nesse protocolo, avaliamos primeiramente se o tratamento crônico com nitrito de sódio, em uma dose de 15mg/kg via oral, que é conhecidamente capaz de reduzir a pressão arterial (PINHEIRO *et al.*, 2015) diminuiu a atividade das gelatinases e se a diminuição da formação de S-nitrosotiois no estômago por aumento do pH gástrico causado pelo tratamento com Omeprazol, em uma dose de 10mg/kg via intraperitoneal (CAMPBELL *et al.*, 2008) interferiu nesses efeitos. Em contrapartida, também avaliamos se o tratamento com nitrito de sódio em uma dose menor (1mg/kg) teria seus efeitos anti-hipertensivos e anti-MMP potencializados pelo tratamento concomitante com um inibidor da GSNOR (SPL-334). Para isso, utilizamos a técnica de Goldblatt, também conhecida como modelo de hipertensão 2 rins 1 clipe, que consiste na indução de estenose da artéria renal por meio da inserção de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm, que foi realizada conforme descrito anteriormente (DE LA RIVA *et al.*,

2000; GOUVÊA *et al.*, 2003). Os animais foram anestesiados com uma combinação de cetamina e xilazina (100mg/kg e 5mg/kg, respectivamente), seguido por tricotomia e assepsia da área iodopolividona para posterior laparotomia e colocação do clipe de prata ao redor da artéria renal esquerda. Os animais usados como controle foram submetidos apenas a laparotomia, sem introdução do clipe na artéria renal. Os tratamentos iniciaram após as duas semanas iniciais que se seguiram à indução de hipertensão arterial renovascular (PINHEIRO *et al.*, 2015)..

Uma parte dos ratos hipertensos (2R1C) e não hipertensos (SHAM) foram tratados com água, Nitrito de sódio (15mg/kg), Omeprazol (10mg/kg) ou Nitrito de sódio+Omeprazol, durante quatro semanas (início no começo da terceira semana após indução de HAS), resultando nos grupos: **Sham e 2R1C Veículo, Nitrito e Nitrito+Omeprazol.**

A fim de verificar se a inibição da enzima GSNOR poderia ser capaz de potencializar os efeitos do nitrito de sódio, os ratos Sham e hipertensos 2R1C foram tratados com o SPL-334 (inibidor da GSNOR em uma dose de 0,3mg/kg diluído em DMSO, IP) (HAYASHIDA *et al.*, 2019), e com o nitrito em uma dose (1mg/kg) via oral que, isoladamente, não foi capaz de reduzir a pressão arterial de maneira estatisticamente significativa em estudos anteriores (RIZZI *et al.*, 2019). Estes tratamentos resultaram nos grupos **Sham e 2R1C Veículo, SPL-334 e Nitrito+SPL-334.** A pressão de todos os grupos experimentais foi aferida semanalmente por pletismografia de cauda. O desenho experimental encontra-se esquematizado na figura 6:



**Figura 6:** Protocolo animal.

Ao final da quarta semana de tratamento, todos os animais foram eutanasiados para coleta de amostras (sangue e tecidos). Foi realizada a medida do pH estomacal no protocolo de tratamento com omeprazol, além dos ensaios de DHE e de atividade de NADPH oxidase para avaliação do estresse oxidativo, zimografia *in situ* e zimografia *in gel* para avaliação da atividade e dos níveis de gelatinases (MMP-2 e MMP-9), além das concentrações de nitrito e RXNO na aorta e nitrito, RXNO e RSNO no plasma e avaliado o remodelamento aórtico, como descrito a seguir, em ambos os protocolos.

#### **4.3.3. Determinação do pH estomacal**

Para determinação do pH estomacal dos animais e confirmação do efeito farmacológico do omeprazol, após anestesia e verificação de ausência de sinal de dor, a porção pilórica do estômago do animal foi laçada e foi feita uma pequena incisão no mesmo para possibilitar a inserção de um microeletrodo acoplado a um pHmetro e consequente medição do pH estomacal (NOGUEIRA *et al.*, 2021). Os animais foram deixados em jejum pelo menos uma hora anteriormente ao procedimento.

#### **4.3.4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelo método DHE.**

Para avaliar o estresse oxidativo nos animais tratados e controles, foi realizado o ensaio bioquímico de análise da produção de espécies reativas de oxigênio utilizando o dihidroetídio (DHE) (BATISTA *et al.*, 2021). Primeiramente, camadas de cortes transversais de aorta foram congeladas em Tissue-Tek (O.C.T). Após o congelamento, as amostras foram cortadas em 3 criosecções seriadas de 4 µm de espessura. Posteriormente, foram adicionados sobre os cortes de aorta, 100 µl de uma solução tampão sódio-fosfato (PBS) na concentração de 0,1 mol/l, para hidratá-los. Passados 15 minutos, o PBS foi retirado e foram adicionados 30 µl de DHE a uma concentração de 10 µmol/l sobre as criosecções, para incubação por 30 minutos em estufa à 37°C. Após a incubação com DHE, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS, para que então,

fossem realizadas leituras por microscopia de fluorescência com comprimentos de onda de 525 nm para excitação e 605 nm para emissão. As imagens foram capturadas sob um aumento de 400x em microscópio de fluorescência. A quantificação foi feita medindo a fluorescência vermelha em 40 campos/imagem com o auxílio do programa ImageJ (NIH, EUA).

#### **4.3.5. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelo método da lucigenina.**

O ensaio de quimioluminescência da lucigenina também foi utilizado para avaliar a produção de ânion superóxido, conforme descrito anteriormente (AMARAL *et al.*, 2015). Resumidamente, foram obtidas secções de aorta de aproximadamente 4mm e estas secções foram, individualmente, transferidas para a microplaca de luminescência e 175 µl de tampão fosfato com 5 µmol/L de lucigenina foram adicionados. Após a medição de fundo, foi adicionada a NADPH 300 mM à reação. A luminescência foi medida a 37°C a cada segundo durante 15 min em um luminômetro (Luminômetro Orion II, Berthold). Os sinais de fundo das amostras foram subtraídos dos sinais obtidos após adição da NADPH e os resultados foram normalizados pelo peso seco da aorta. A quimioluminescência da lucigenina foi representada como unidades de luminescência relativa (RLU)/mg.

#### **4.3.6. Determinação da atividade gelatinolítica *in situ* de MMPs**

A atividade de MMPs *in situ* foi obtida utilizando a DQ-gelatin (substrato das gelatinases) diluída na proporção de 1:10 em 50 mmol/l de Tris-HCl + 10 mmol/l CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O num pH de 7,4, que foi adicionado em cortes transversais de aorta anteriormente imersas em Tissue-Tek. As aortas foram incubadas com o substrato a 37 °C em estufa e câmara úmida e escura. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes por 1 minuto com a solução tampão sódio-fosfato (PBS). Após as lavagens, os cortes foram incubados com solução de 4% de paraformaldeído por 20 minutos em temperatura ambiente e lavados a última vez com 0,1 mol/l PBS. Em suma, a degradação da DQ-gelatin emite uma fluorescência verde e reflete a capacidade gelatinolítica de MMPs presentes na criosecção (RIZZI *et al.*, 2019). Com auxílio

de um microscópio de fluorescência as imagens foram fotografadas em objetiva de 400x e a fluorescência quantificada utilizando o programa ImageJ (NIH, EUA).

#### **4.3.7. Avaliação de níveis e atividade de MMP-2 e -9 por zimografia em gel**

Os níveis das diferentes isoformas da MMP-2 foram obtidos de extratos de aorta dos animais oriundos dos diferentes grupos (NOGUEIRA *et al.*, 2021). Para isto, foi realizada a homogeneização deste extrato para extração de proteínas, utilizando o RIPA (R028 – Sigma-Aldrich) suplementado com inibidor de proteases (S8820 – Sigma-Aldrich) e inibidores de fosfatases (Ortovanadato 1 mmol/l e NaF 10 mmol/l). O homogenato foi então centrifugado a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante (extrato) foi coletado.

Posteriormente, 20 µg de proteína foram diluídas na proporção de 1:1 com tampão de amostras e incubadas por 15 minutos a 37°C em estufa. Após esta incubação, as amostras foram submetidas a separação por eletroforese em géis de 10% SDS-poliacrilamida, enriquecidos com gelatina (0.1%) como substrato da MMP-2. Posteriormente à eletroforese, os géis foram incubados com uma solução renaturante de Triton x-100 a 2% durante 1h sob agitação horizontal, para então serem incubados com solução tampão para ativação de MMPs (Tris-HCl a 1 mmol/l contendo CaCl<sub>2</sub> a 10 mmol/l) durante 18 horas.

Por fim, os géis foram corados com Comassie azul brilhante G-250 e descorados com solução de 30% de metanol e 10% de ácido acético em agitação horizontal. Os níveis de MMP-2 foram quantificados por análise de densitometria das bandas descoradas contra o fundo azul do gel, o que indica a degradação de substrato. A quantificação foi feita utilizando o programa ImageJ (NIH, EUA).

#### **4.3.8. Determinação das concentrações plasmáticas de nitrito, RXNO e RSNO e aórticas de nitrito e RXNO.**

Amostras de aorta foram homogeneizadas em PBS pH 7,4 contendo NEM (10 mmol/l) e EDTA (2 mmol/l) e as amostras de plasma foram coletadas do animal, centrifugadas para a

obtenção do plasma e armazenadas em solução estabilizadora contendo NEM (10 mmol/l) e DTPA. O homogenato de tecido, assim como as amostras de plasma foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio ( $O_3$ ). A adição dos reagentes a estas amostras, foi feita na proporção de 10% do seu volume. Após preparadas, as amostras foram injetadas no aparelho contendo uma solução de tri-iodeto acidificada, favorecendo a redução das espécies em NO, o qual é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de óxido nítrico (Analyzer CLD 88sp, ECOMEDICS, 8635 Duernten, Switzerland). Após a reação do NO com o  $O_3$ , ocorre a formação do dióxido de nitrogênio em seu estado eletronicamente excitado, que emite luz, a qual é detectada pelo analisador e reflete a produção de NO oriunda das espécies analisadas (MACARTHUR; SHIVA; GLADWIN, 2007).

Por este método, é possível determinar a concentração de nitrito e de espécies S- e N-nitrosiladas (RSNO e RNNO respectivamente) presente em tecidos ou fluidos biológicos. Enquanto o nitrito é obtido com o uso da amostra pura, as espécies nitrosiladas totais (RXNO) são obtidas com o pré-tratamento com sulfanilamida ácida (5% em 1mol/l HCl) e para a obtenção das espécies RNNO, o tratamento de amostra é feito primeiramente com sulfanilamida ácida (5% em ácido fosfórico) e posteriormente com solução de  $HgCl_2$  2%. De posse dessas duas medidas, é possível determinar a concentração de RSNO subtraindo os níveis de RSNO das espécies RNNO (FEELISCH *et al.*, 2002). Os dados obtidos foram analisados pelo programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA).

#### **4.3.9. Análise morfométrica e composição da parede vascular**

As aortas torácicas foram coletadas, limpas do tecido conjuntivo, fixadas em paraformaldeído tamponado com fosfato a 4%, pH 7,4 e embebidas em blocos de parafina. Quatro cortes de micrômetro foram corados com hematoxilina e eosina. A média da área de secção transversal (CSA) foi calculada subtraindo a área interna do lúmen ( $A_i$ ) da área externa ( $A_e$ ) medida em secções de tecido (50x). Os diâmetros externos e internos (ED e ID,

respectivamente) foram calculados como a raiz quadrada de  $4A_e / \pi$  (ED) e  $4A_i / \pi$  (ID), respectivamente, e a espessura média (M) foi calculada como  $(ED-ID) / 2$ . Finalmente, também foi calculado o diâmetro da Média por lúmen (M / L). (CASTRO *et al.*, 2008).

#### **4.3.10. Análise dos resultados**

Os resultados foram analisados por Test t de student para comparação de dois grupos, análise de variância de um ou dois fatores (quando aplicável), seguida de pós-teste de Newman-Keuls. Diferença estatística foi considerada significativa quando o valor de probabilidade foi menor que 0,05 ( $P < 0,05$ ). Os gráficos foram representados com média  $\pm$  erro padrão da média.

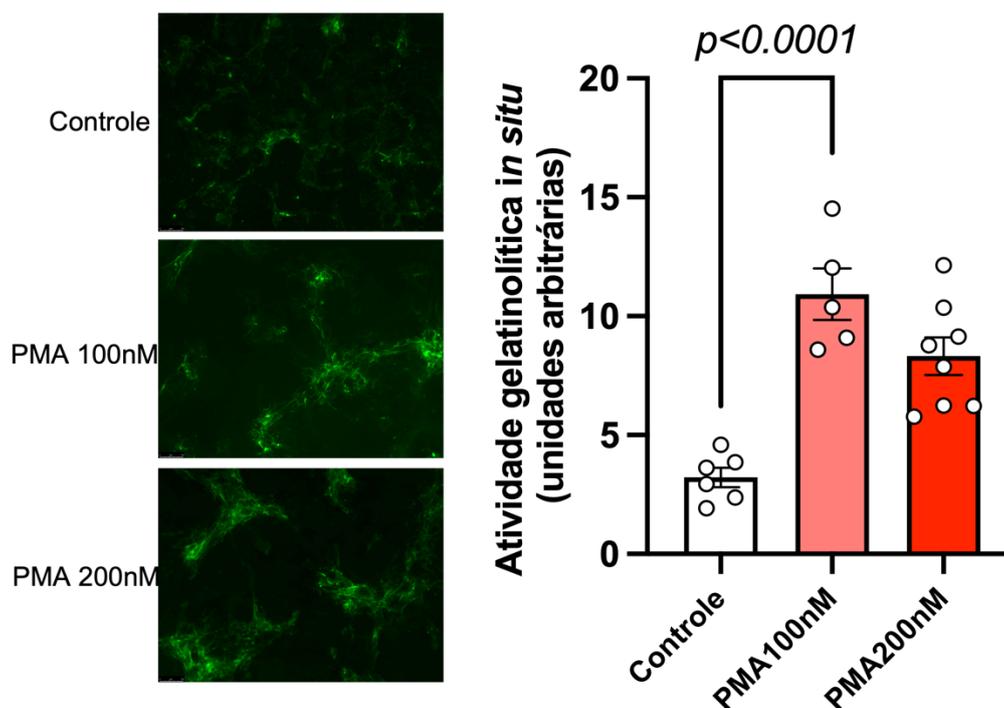
## ***RESULTADOS***

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. O 12-Miristato 13-Acetato de Forbol (PMA) aumentou a atividade das gelatinases em células musculares lisas vasculares.

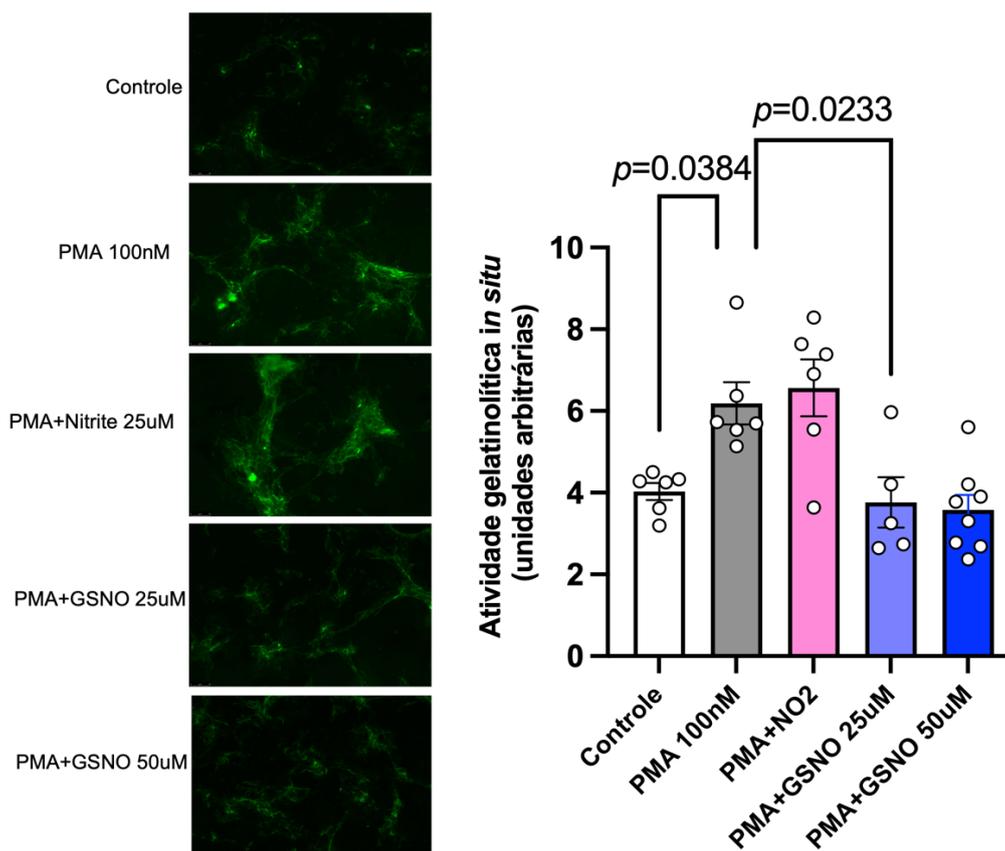
O tratamento com PMA nas duas concentrações utilizadas (100nM e 200nM) foi capaz de aumentar a atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) *in situ*. Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos foram, respectivamente, controle:  $3.218 \pm 0.4047$ , PMA 100nM:  $10.92 \pm 1.080$ , PMA 200nM  $8.317 \pm 0.7909$ . Por esse motivo, a menor concentração (100nM) foi escolhida para os experimentos subsequentes (Figura 7).



**Figura 7:** Efeito do PMA (12-Miristato 13-Acetato de Forbol) nas concentrações de 100nM e 200nM na atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) em células musculares lisas vasculares (n=5-8/grupo).  $p < 0.0001$  em relação ao grupo controle. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

## 5.2. O GSNO, mas não o nitrito, foi capaz de reduzir o aumento na atividade das gelatinases ocasionado pelo tratamento com PMA 100nM.

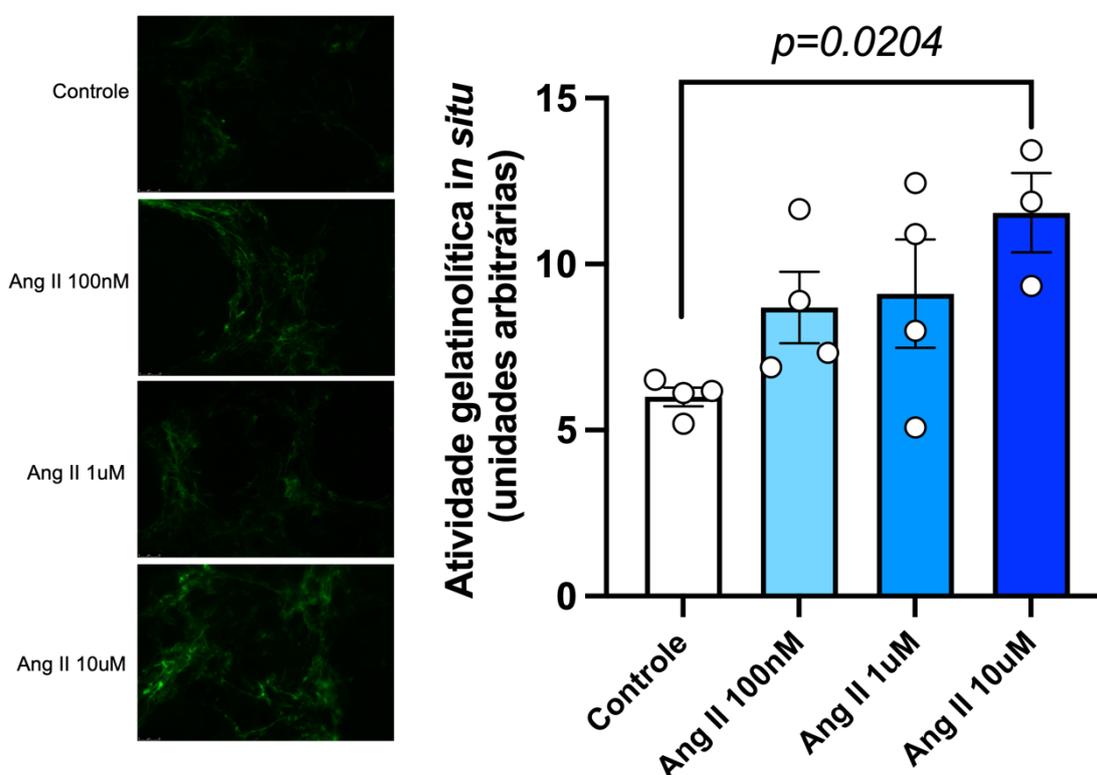
O tratamento de células musculares lisas vasculares com as duas concentrações de GSNO utilizadas (25 $\mu$ M e 50 $\mu$ M) foi capaz de reduzir o aumento na atividade das gelatinases ocasionado pelo PMA. O mesmo não foi encontrado no que diz respeito ao tratamento com nitrito de sódio (25 $\mu$ M), que não foi capaz de reverter o efeito do PMA. Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos foram, respectivamente, controle: 4.031 $\pm$ 0.2073, PMA 100nM: 6.188 $\pm$ 0.5196, PMA+NO<sub>2</sub>: 6.566 $\pm$ 0.6956, PMA+GSNO 25 $\mu$ M: 3.763 $\pm$ 0.6162, PMA+GSNO 50 $\mu$ M: 3.572 $\pm$ 0.3681. A magnitude de efeito do GSNO 25 e 50 $\mu$ M foi semelhante, portanto a concentração utilizada nos experimentos subsequentes foi a de 25 $\mu$ M.



**Figura 8:** Efeitos do Nitrito (25 $\mu$ M) e GSNO (25 $\mu$ M e 50 $\mu$ M) no aumento da atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) ocasionado pelo PMA (12-Miristato 13-Acetato de Forbol) em células musculares lisas vasculares (n=5-8/grupo).  $p=0.0384$  em relação ao grupo controle.  $p=0.0233$  em relação ao grupo PMA 100nM. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

### 5.3. A Angiotensina II aumentou a atividade das gelatinases em células musculares lisas vasculares.

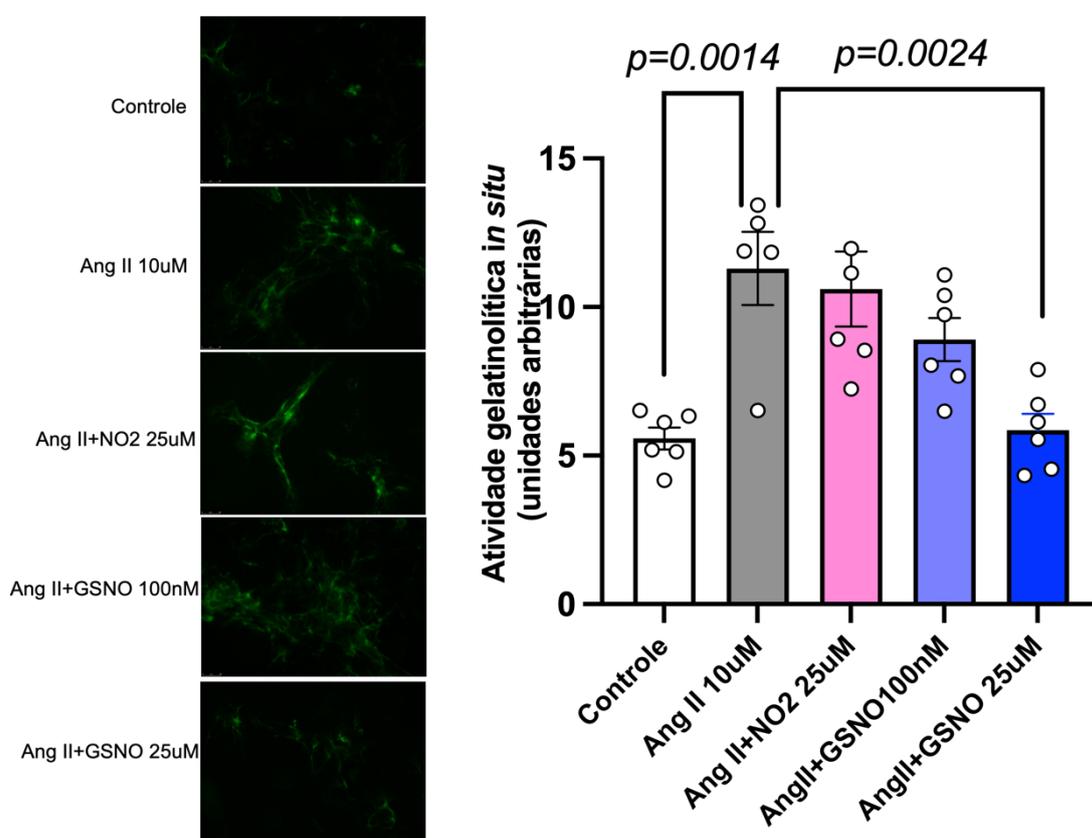
O tratamento com Ang II só foi capaz de aumentar a atividade das gelatinases de maneira estatisticamente significativa na maior concentração utilizada (10 $\mu$ M). Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos foram, respectivamente, controle: 6.002 $\pm$ 0.2835, Ang II 100nM: 8.693 $\pm$ 1.076, Ang II 1 $\mu$ M: 9.109 $\pm$ 1.629, Ang II 10 $\mu$ M: 11.55 $\pm$ 1.188. Por esse motivo, a concentração de Ang II de 10 $\mu$ M foi escolhida para os experimentos subsequentes.



**Figura 9:** Efeito da Angiotensina II (Ang II) nas concentrações de 100nM, 1 $\mu$ M e 10 $\mu$ M na atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) em células musculares lisas vasculares (n=3-4/grupo).  $p=0.0204$  em relação ao grupo controle. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

#### 5.4. O GSNO, mas não o nitrito, foi capaz de reduzir o aumento na atividade das gelatinases ocasionado pelo tratamento com Ang II 10 $\mu$ M.

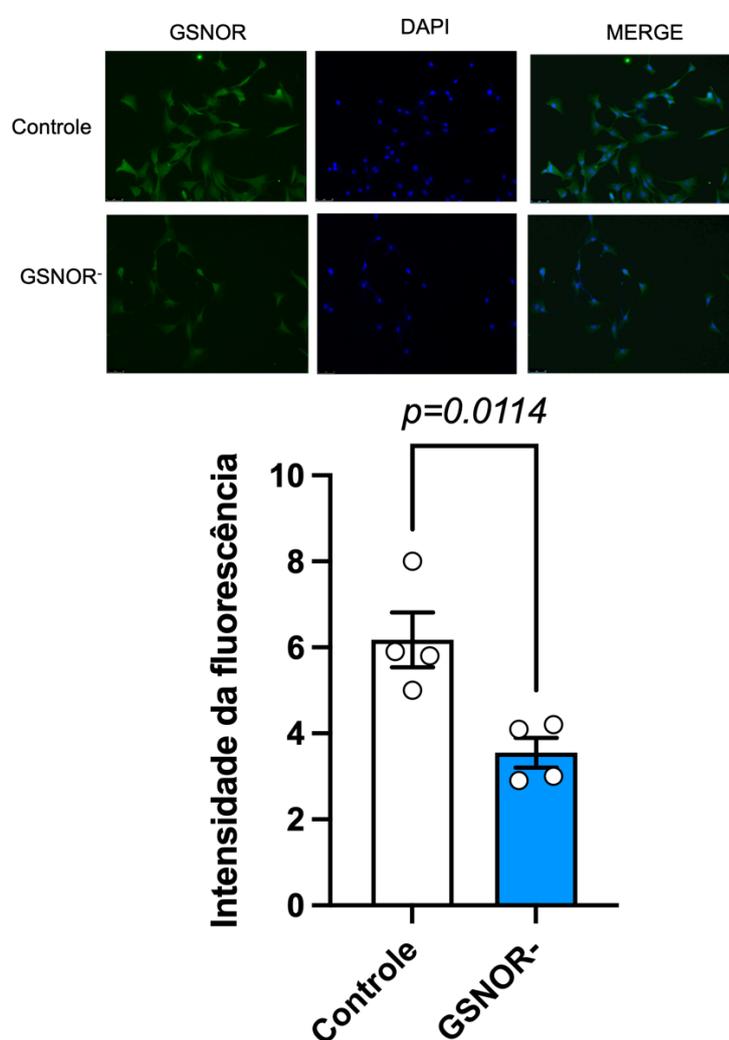
O tratamento de células musculares lisas vasculares com a concentração de GSNO escolhida (50 $\mu$ M) foi capaz de reduzir o aumento na atividade das gelatinases ocasionado pelo tratamento com Ang II. O mesmo não ocorreu no que diz respeito ao tratamento com nitrito de sódio (25 $\mu$ M), que não foi capaz de reverter o efeito da Ang II. Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos foram, respectivamente, controle: 5.576 $\pm$ 0.3696, Ang II 10 $\mu$ M: 11.30 $\pm$ 1.231, Ang II+NO<sub>2</sub>: 10.61 $\pm$ 1.263, Ang II+GSNO 25 $\mu$ M: 5.861 $\pm$ 0.5512.



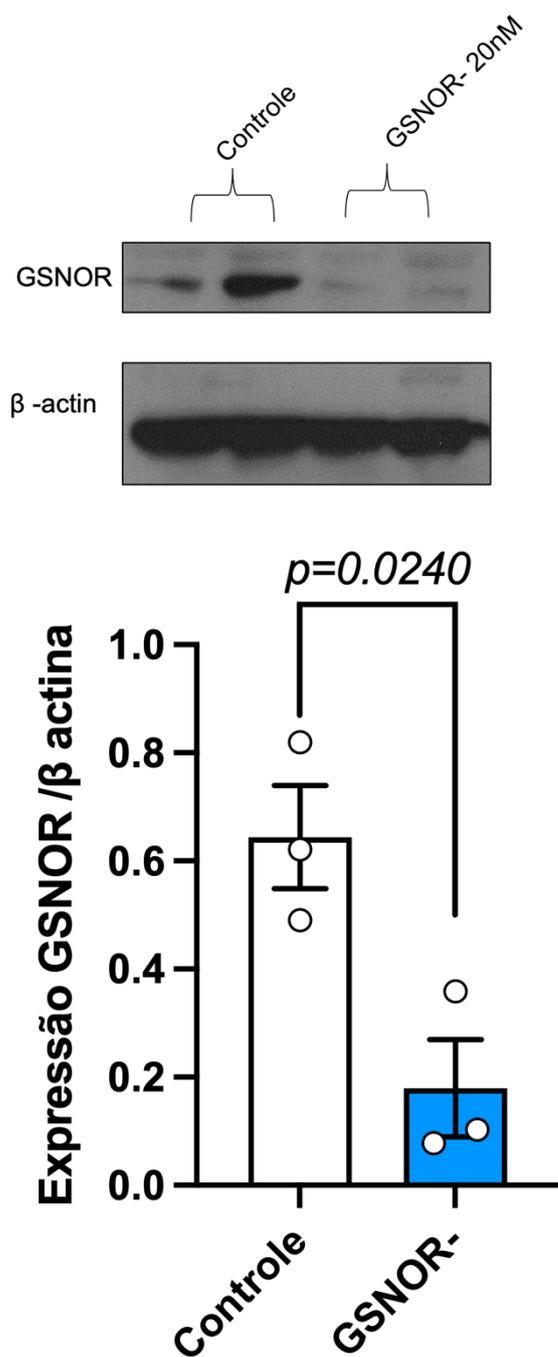
**Figura 10:** Efeitos do Nitrito (25 $\mu$ M) e GSNO (25 $\mu$ M e 50 $\mu$ M) no aumento da atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) ocasionado pela Ang II em células musculares lisas vasculares (n=5-6/grupo).  $p=0.0014$  em relação ao grupo controle.  $p=0.0024$  em relação ao grupo Ang II 10 $\mu$ M. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

**5.5. O tratamento de células musculares lisas com RNAi para GSNOR foi capaz de reduzir a expressão desta enzima.**

O tratamento das CMLVs com o RNAi na concentração de 20nM para a GSNOR foi capaz de ocasionar a deleção parcial desta enzima em ambas as metodologias utilizadas (imunofluorescência e western blot) (Figuras 11 e 12). Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos foram, respectivamente, controle:  $6.175 \pm 0.6408$ , GSNOR-:  $3.550 \pm 0.3476$  (Figura 11). Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos foram, respectivamente, foram controle:  $0.6439 \pm 0.09546$ , GSNOR-:  $0.1798 \pm 0.0979$  (Figura 12).



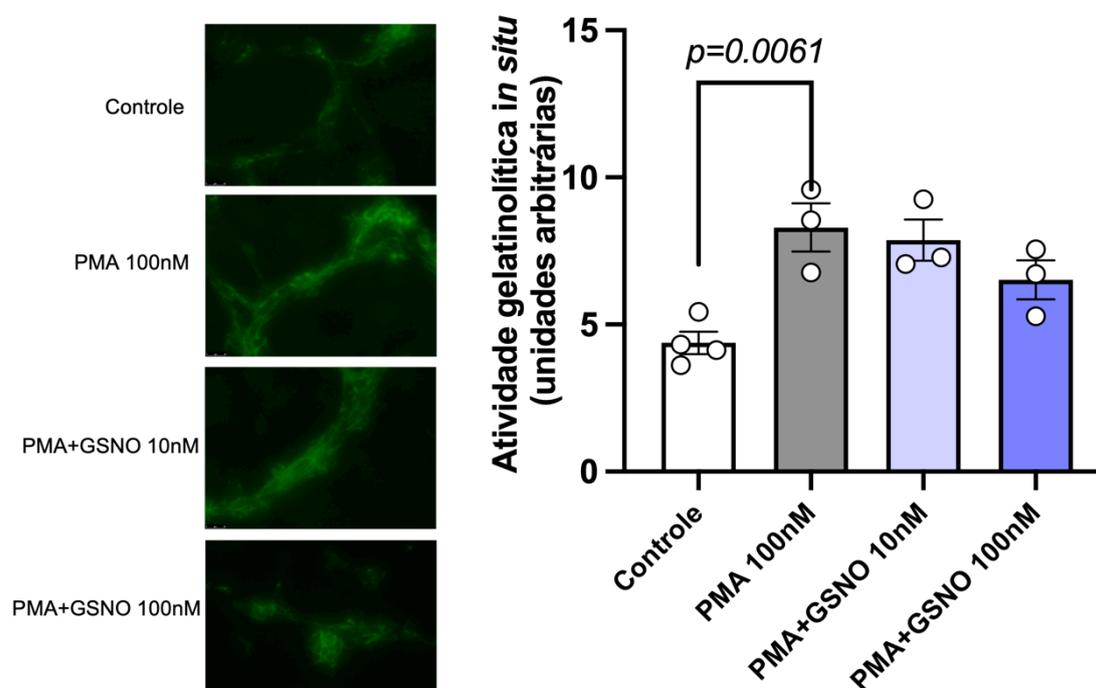
**Figura 11:** Expressão da GSNOR por imunofluorescência nos grupos controle e GSNOR- (deleção parcial da GSNOR) (n=4/grupo).  $p=0.0114$  em relação ao grupo controle. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.



**Figura 12:** Expressão da GSNOR por western-blot normalizada pela expressão da β-actina nos grupos controle e GSNOR- (deleção parcial da GSNOR) (n=3/grupo).  $p=0.0240$  em relação ao grupo controle. Dados mostrados como média ± E.P.M.

**5.6. Em menores concentrações (10 e 100nM), o GSNO não reverteu o aumento na atividade das gelatinases ocasionado pelo PMA.**

Foram utilizadas menores concentrações de GSNO (10 e 100nM), a fim de determinar uma concentração onde este não seria capaz de reverter totalmente o efeito do PMA. Como observado na Figura 13, as concentrações escolhidas não foram capazes de diminuir a atividade das gelatinases de maneira estatisticamente significativa. Os valores de média e desvio padrão obtidos para os grupos foram, respectivamente, controle:  $4.377 \pm 0.3816$ , PMA 100nM:  $8.297 \pm 0.8219$ , PMA+GSNO10nM:  $7.863 \pm 0.6997$ , PMA+GSNO100nM:  $6.519 \pm 0.6618$ .

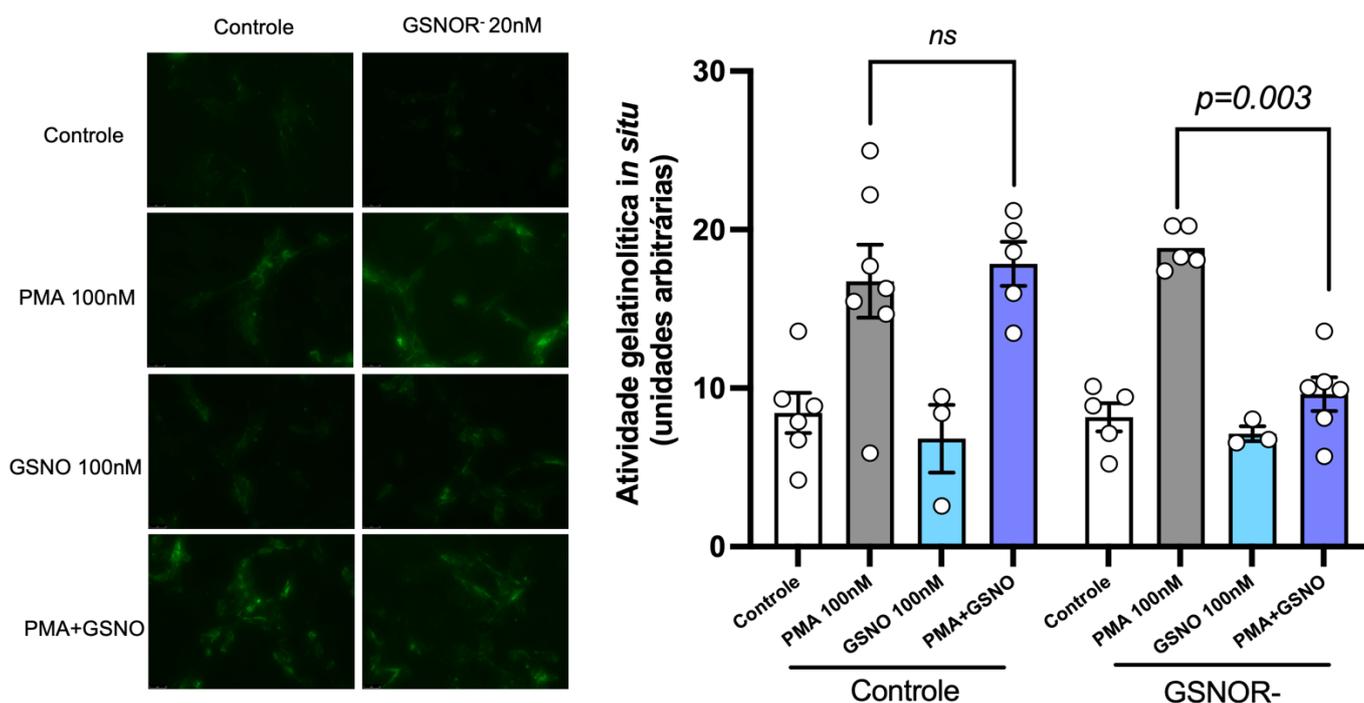


**Figura 13:** Efeitos do GSNO (10nM e 100nM) no aumento da atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) ocasionado pelo PMA (12-Miristato 13-Acetato de Forbol) (100nM) em células musculares lisas vasculares (n=3-4/grupo).  $p=0.0061$  em relação ao grupo controle. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

**5.7. A deleção parcial da enzima GSNOR potencializou o efeito do GSNO na reversão do aumento das gelatinases ocasionado pelo PMA.**

Com base nos resultados obtidos na figura 13, a concentração de 100nM foi utilizada nos experimentos com o RNAi (Figuras 14 e 15). Como resultados, obtivemos que esta concentração não foi capaz de reverter o efeito de aumento da atividade das gelatinases ocasionado pelo tratamento com PMA nas células controle. No entanto, nas células previamente

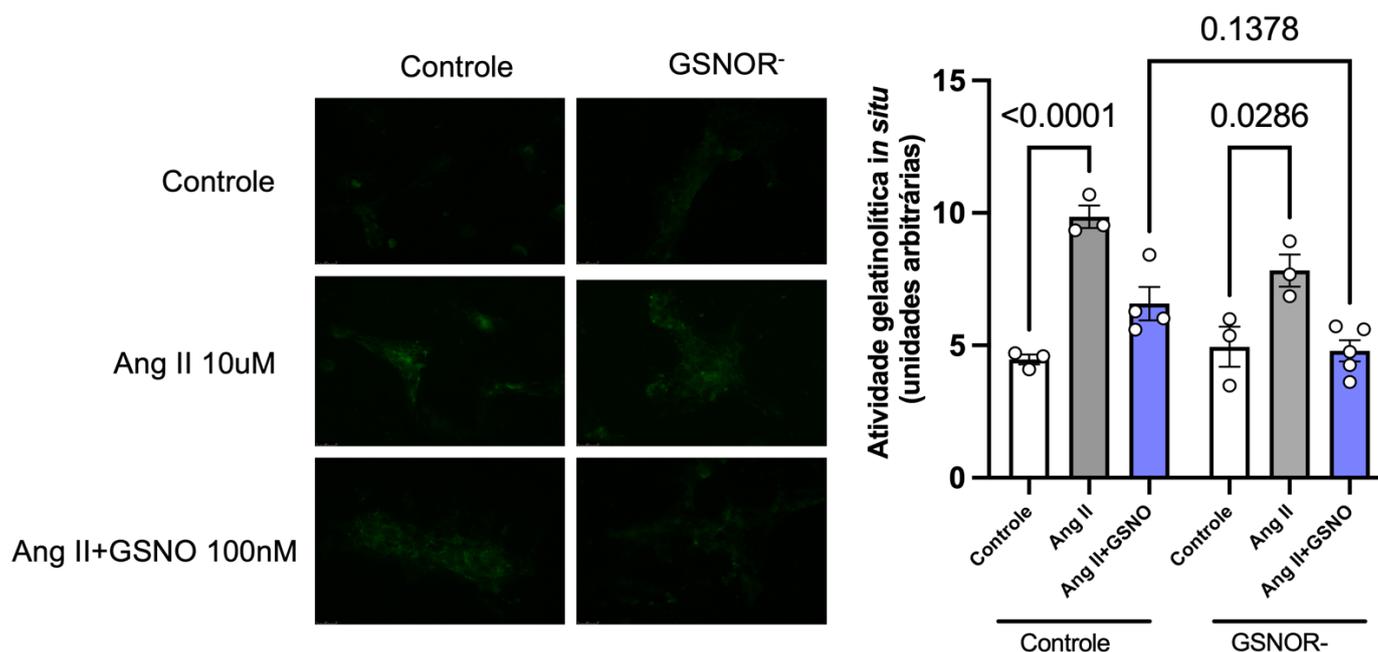
tratadas com RNAi para GSNOR, o GSNO foi capaz de reverter os efeitos de aumento das MMPs resultantes do tratamento com PMA. Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos foram, respectivamente: Controle:  $8.434 \pm 1.273$ , Controle+PMA 100nM:  $16.74 \pm 2.301$ , Controle+GSNO 100nM:  $6.814 \pm 2.141$ , Controle+PMA+GSNO:  $17.83 \pm 1.391$ , GSNOR-20nM:  $8.160 \pm 0.8819$ , GSNOR-+PMA 100nM 100nM:  $18.85 \pm 0.5864$ , GSNOR-+GSNO 100nM:  $7.123 \pm 0.4692$ , GSNOR-+PMA+GSNO:  $9.621 \pm 1.070$ .



**Figura 14** :Efeitos do GSNO (100nM) no aumento da atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) ocasionado pelo PMA (12-Miristato 13-Acetato de Forbol) (100nM) em células musculares lisas vasculares controle ou com deleção parcial de GSNOR (grupo GSNOR-) ( $n=3-7$ /grupo).  $p=0.003$  em relação ao grupo PMA 100nM. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

### 5.8. A deleção parcial da enzima GSNOR não potencializou o efeito do GSNO na reversão do aumento das gelatinases ocasionado pela Ang II.

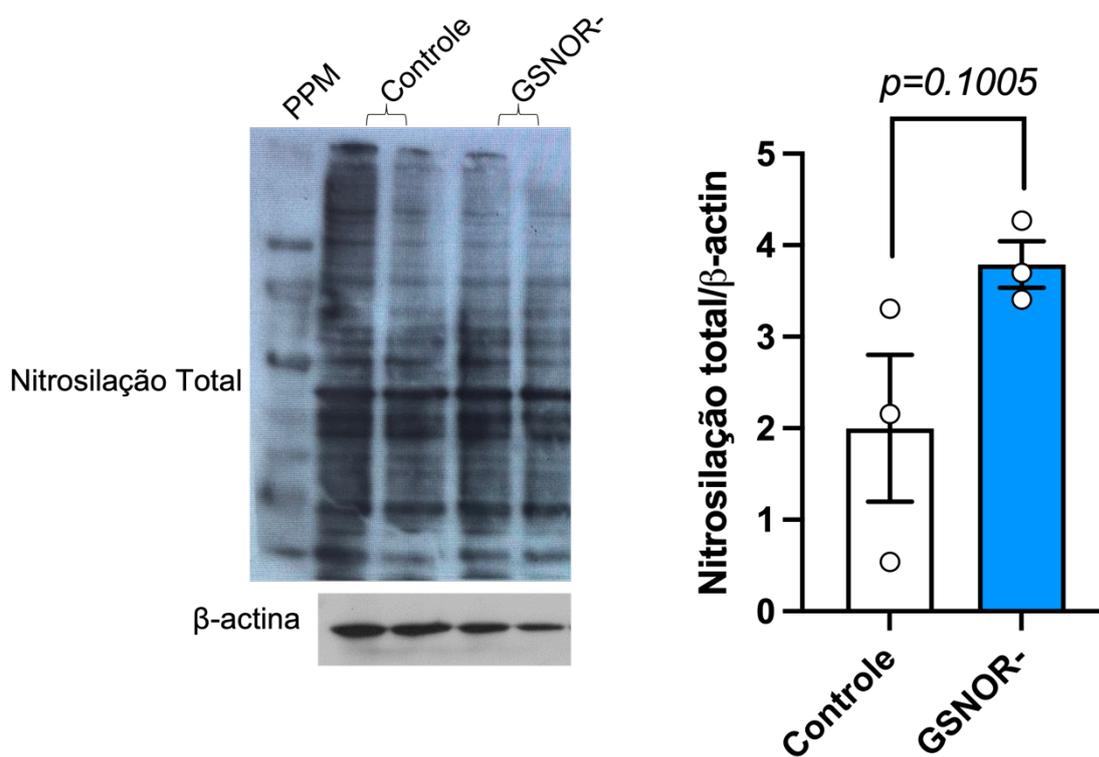
No que diz respeito aos experimentos com RNAi e Angiotensina II, obtivemos que a deleção parcial da GSNOR não potencializou o efeito do GSNO 100nM na reversão do aumento das gelatinases ocasionado pelo tratamento com Ang II. Nesse experimento, o tratamento com GSNO nas células controle já teve um efeito pronunciado sobre a atividade das MMPs nos grupos tratados com angiotensina. Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos foram, respectivamente, Controle:  $4.466 \pm 0.1904$ , Controle+ Ang II  $10 \mu\text{M}$ :  $9.856 \pm 0.4209$ , Controle+Ang II+GSNO 100nM:  $6.577 \pm 0.6288$ , GSNOR-:  $4.946 \pm 0.7569$ , GSNOR-+Ang II  $10 \mu\text{M}$ :  $7.827 \pm 0.6045$ , GSNOR-+Ang II+GSNO 100nM:  $4.790 \pm 0.3987$ .



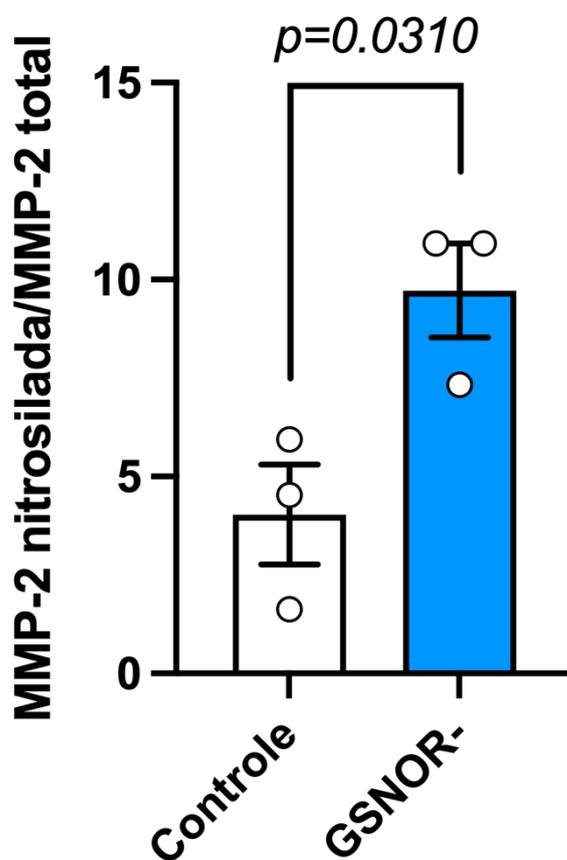
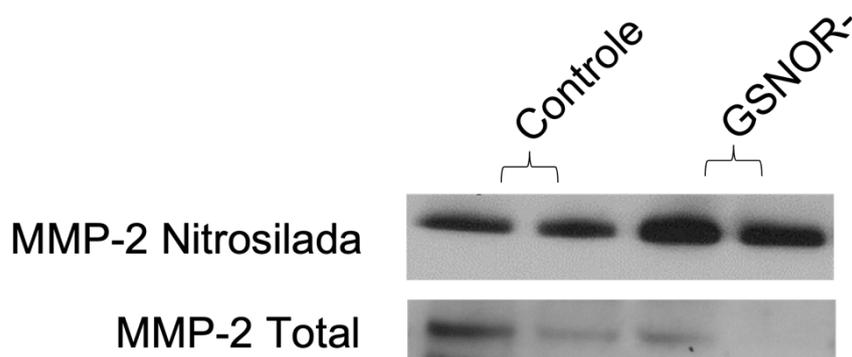
**Figura 15:** Efeitos do GSNO (100nM) no aumento da atividade das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) ocasionado pela Ang II (10 $\mu$ M) em células musculares lisas vasculares controle ou com deleção parcial de GSNOR (grupo GSNOR-) (n=3-5/grupo).  $p=0.1371$  em relação ao grupo Controle+AngII+GSNO. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

### 5.9. A deleção parcial da enzima GSNOR aumentou a nitrosilação da MMP-2.

A deleção parcial da enzima GSNOR gerou tendência de aumento na nitrosilação total das CMLVs (Figura 16) e aumentou de maneira estatisticamente significativa a nitrosilação da MMP-2 (Figura 17). Os valores de média e erro padrão obtidos na Figura 16 nos grupos foram, respectivamente, Controle:  $2 \pm 0.8023$ , GSNOR-:  $3.790 \pm 0.2534$ . Os valores de média e erro padrão obtidos na Figura 17 nos grupos foram, respectivamente, Controle:  $4.034 \pm 1.271$ , GSNOR-:  $9.722 \pm 1.194$ .



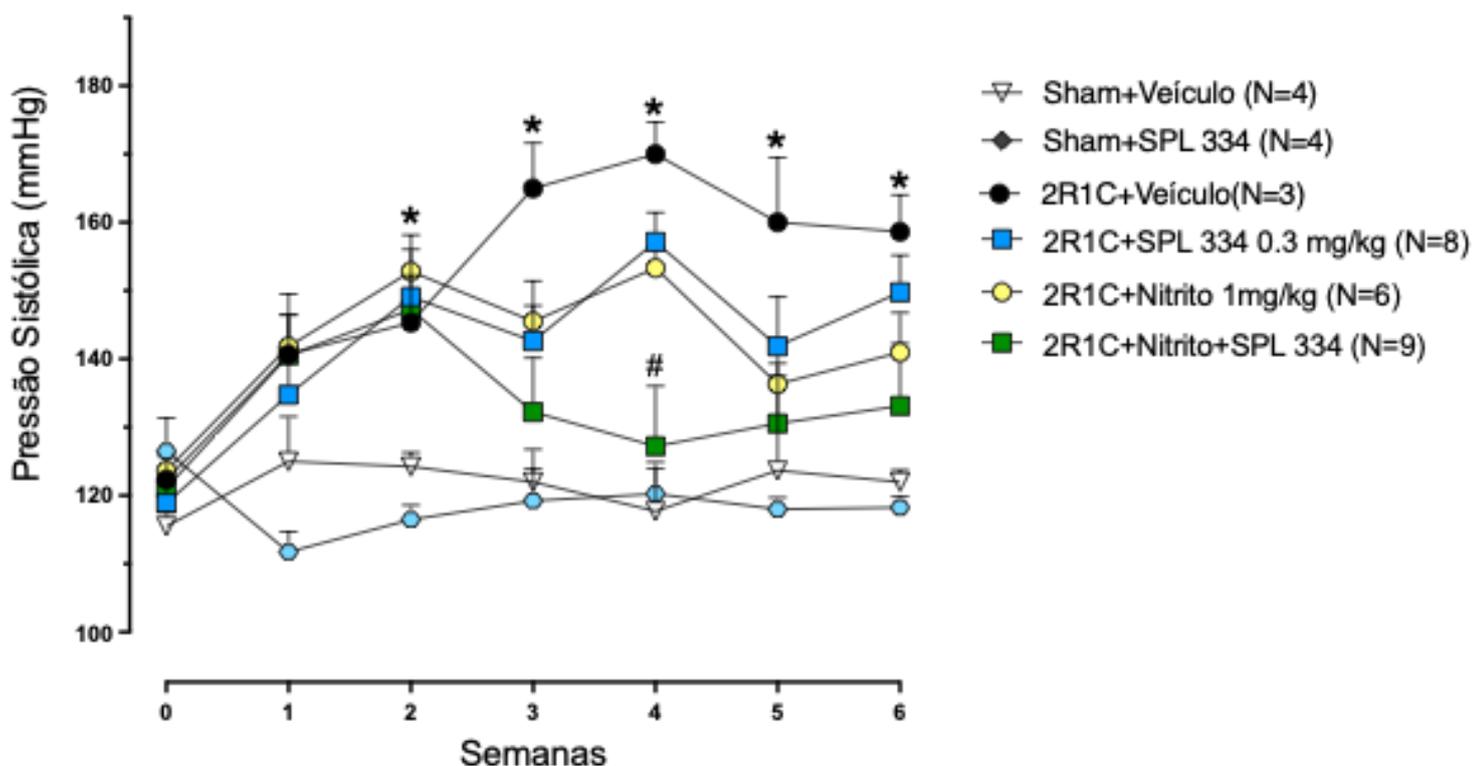
**Figura 16:** Nitrosilação total nos grupos controle e com deleção parcial de GSNOR (GSNOR-).  $p=0.1005$  em relação ao grupo Controle ( $n=3$ /grupo). Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.



**Figura 17:** MMP-2 nitrosilada normalizada pelos níveis totais de MMP-2 nos grupos controle e com deleção parcial de GSNOR (GSNOR-) (n=3/grupo).  $p=0.0310$  em relação ao grupo Controle. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

### 5.10. O tratamento com SPL 334 potencializou os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio (1mg/kg) na hipertensão renovascular.

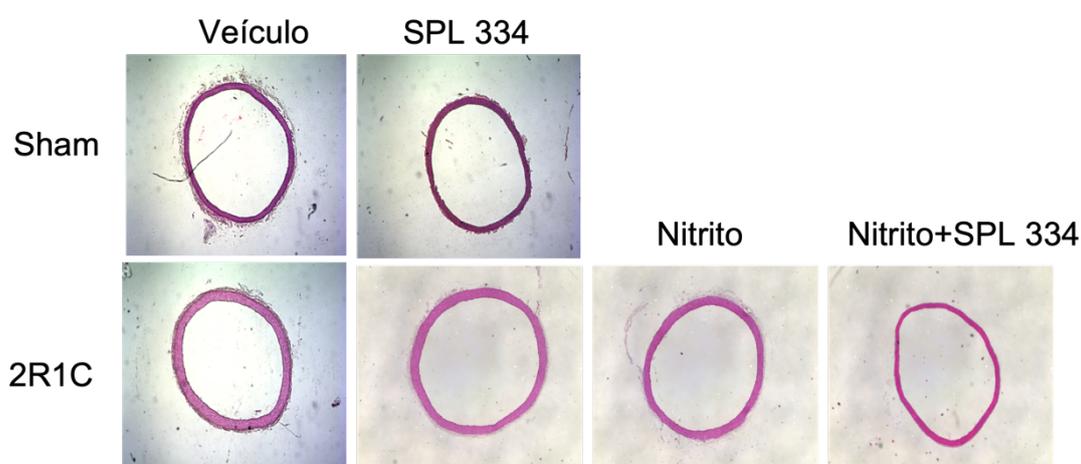
No que diz respeito a pressão sistólica, foi possível observar que o modelo de hipertensão utilizado foi capaz de aumentar os níveis pressóricos desde a primeira semana do protocolo (Sham+Veículo: 122mmHg $\pm$ 4.778; 2R1C+Veículo: 165mmHg $\pm$ 6.658;  $p < 0.05$ ). O tratamento com nitrito 1mg/kg, via oral, não foi capaz de diminuir a pressão sistólica dos animais hipertensos de maneira estatisticamente significativa em nenhuma semana de tratamento, bem como o tratamento com SPL 334 (0.3mg/kg), isoladamente. No entanto, o tratamento concomitante das drogas foi capaz de reduzir de maneira estatisticamente significativa a pressão sistólica dos animais hipertensos na semana 2 de tratamento (semana 4 do protocolo) (2R1C+Veículo: 170 $\pm$ 4.726; 2R1C+Nitrito+SPL 334: 127 $\pm$ 8.846 mmHg $\pm$ 8.852;  $p < 0.05$ ). O tratamento com nitrito e SPL-334 nas doses utilizadas não causou alterações pressóricas nos animais normotensos.

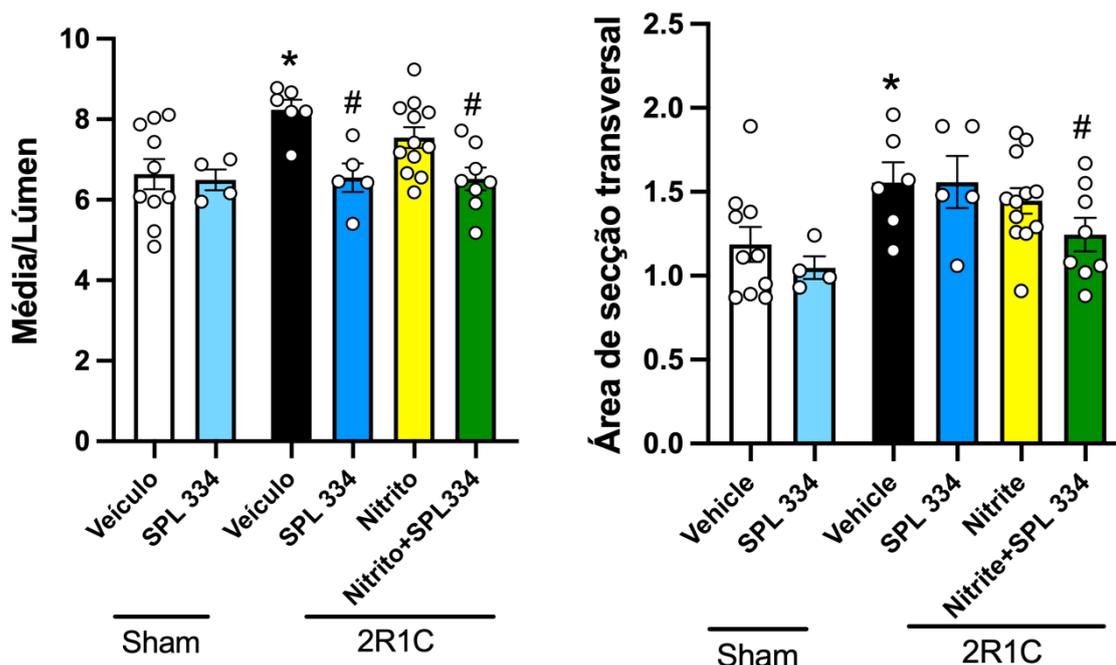


**Figura 18:** Pressão arterial sistólica de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, SPL-334, Nitrito ou Nitrito+SPL 334. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham+Veículo (n=3-9/grupo). #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C+Veículo. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

**5.11. O tratamento com SPL 334 isoladamente e a combinação Nitrito+SPL 334 foram capazes de melhorar parâmetros de remodelamento vascular na hipertensão renovascular.**

No que diz respeito aos parâmetros de remodelamento vascular, obtivemos que o modelo de hipertensão utilizado aumentou a média por lúmen (Sham+Veículo:  $6.641 \pm 0.3754$ ; 2R1C+Veículo:  $8.237 \pm 0.2475$ ;  $p < 0.05$ ) e a área de secção transversal (Sham+Veículo:  $1.186 \pm 0.1040$ ; 2R1C+Veículo:  $1.555 \pm 0.1553$ ;  $p < 0.05$ ) dos animais. O tratamento com SPL 334 isoladamente foi capaz de melhorar o parâmetro Média/lúmen (2R1C+Veículo:  $8.237 \pm 0.2475$ ; 2R1C+SPL-334:  $6.550 \pm 0.3572$ ;  $p < 0.05$ ), mas não a área de secção transversal (2R1C+Veículo:  $1.555 \pm 0.1553$ , 2R1C+SPL-334:  $1.558 \pm 0.1553$ ;  $p > 0.05$ ). O tratamento concomitante de Nitrito de sódio e SPL-334 foi capaz de melhorar ambos os parâmetros de remodelamento vascular avaliados M/L (2R1C+Veículo:  $8.237 \pm 0.2475$ ; 2R1C+Nitrito+SPL 334:  $6.521 \pm 0.2860$ ) e área de secção transversal (2R1C+Veículo:  $1.555 \pm 0.1553$ ; 2R1C+Nitrito+SPL 334:  $1.245 \pm 0.09975$ ) (Figura 19).

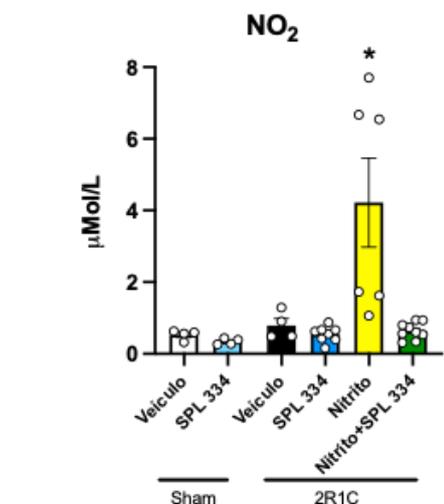




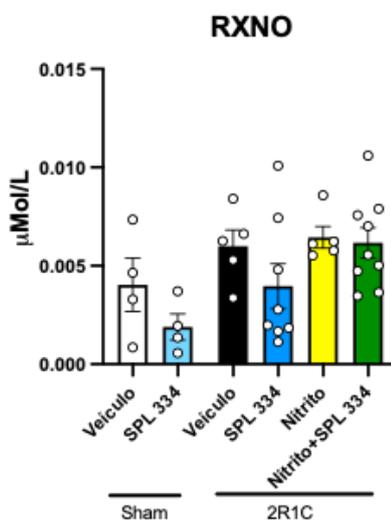
**Figura 19:** Remodelamento vascular (aorta) obtido pelos parâmetros média/lúmen e área de secção transversal em animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, SPL-334, Nitrito ou Nitrito+SPL 334. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham+Veículo ( $n=3-12$ /grupo). #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C+Veículo. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M

### 5.12. O tratamento concomitante de Nitrito e SPL 334 não gerou aumento nos metabólitos do NO no plasma de animais normotensos ou hipertensos.

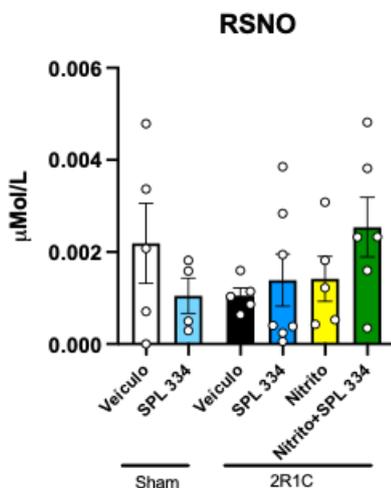
O tratamento com nitrito de sódio na dose de 1mg/kg aumentou o nitrito no plasma dos animais hipertensos 2R1C. Os valores obtidos de média e erro padrão foram, respectivamente, grupo 2R1C+Veículo:  $0.7920 \pm 0.1934$ ; grupo 2R1C+Nitrito 1mg/kg:  $4.222 \pm 1.244$ ). Nos demais metabólitos não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos tratamentos utilizados (Figura 20).



B



C

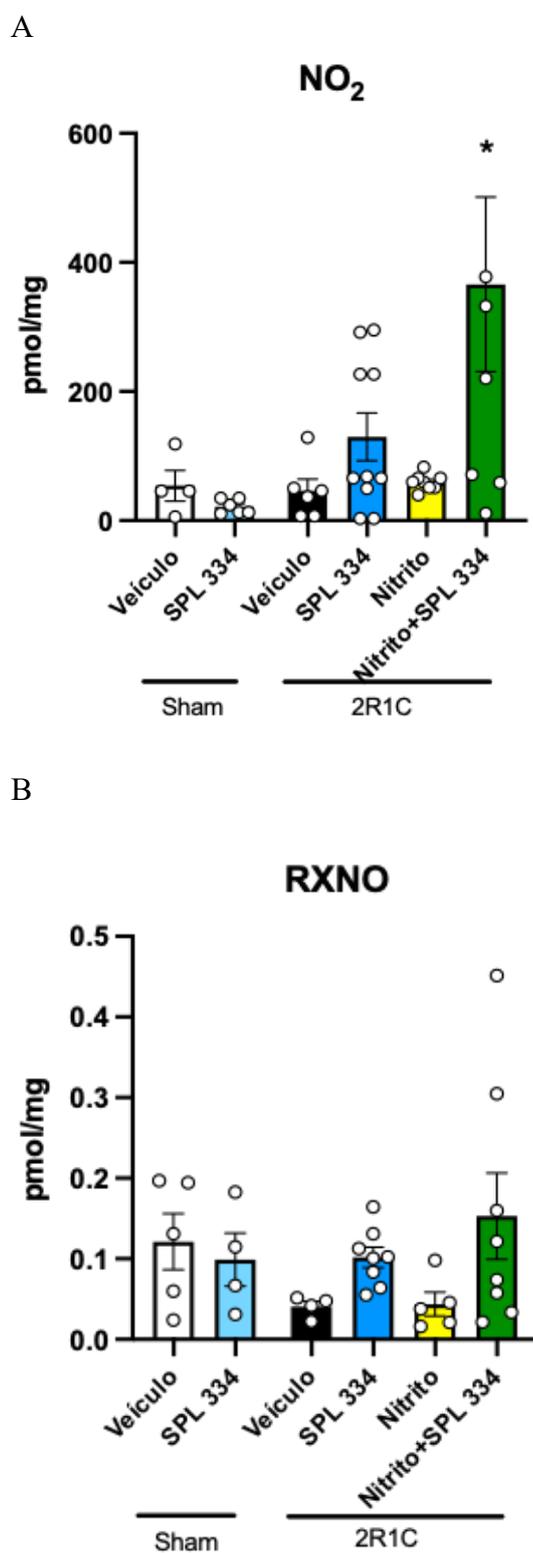


**Figura 20:** Determinação dos níveis de espécies relacionadas ao NO no plasma de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, SPL-334, Nitrito ou Nitrito+SPL 344 (n=4-9/grupo). (A) Determinação da concentração de nitrito no plasma.\* $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C+Veículo (B) Quantificação dos níveis de espécies nitrosiladas totais presentes no plasma.

(C) Determinação de espécies S-nitrosiladas presentes no plasma. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

**5.13. O tratamento concomitante de Nitrito e SPL 334 gerou aumento de nitrito na aorta de animais hipertensos.**

O tratamento isolado com nitrito ou SPL-334 não gerou alterações estatisticamente significativas nas concentrações dos metabólitos do NO na aorta de animais normotensos ou hipertensos. No entanto, o tratamento concomitante com ambas as drogas, foi capaz de aumentar o nitrito na aorta de animais hipertensos. Os valores obtidos de média e erro padrão foram, respectivamente: 2R1C+Veículo:  $46.12 \pm 18.23$ ; 2R1C+Nitrito+SPL 334:  $366 \pm 135.3$ ;  $p < 0.05$  (Figura 21). No que diz respeito ao RXNO, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

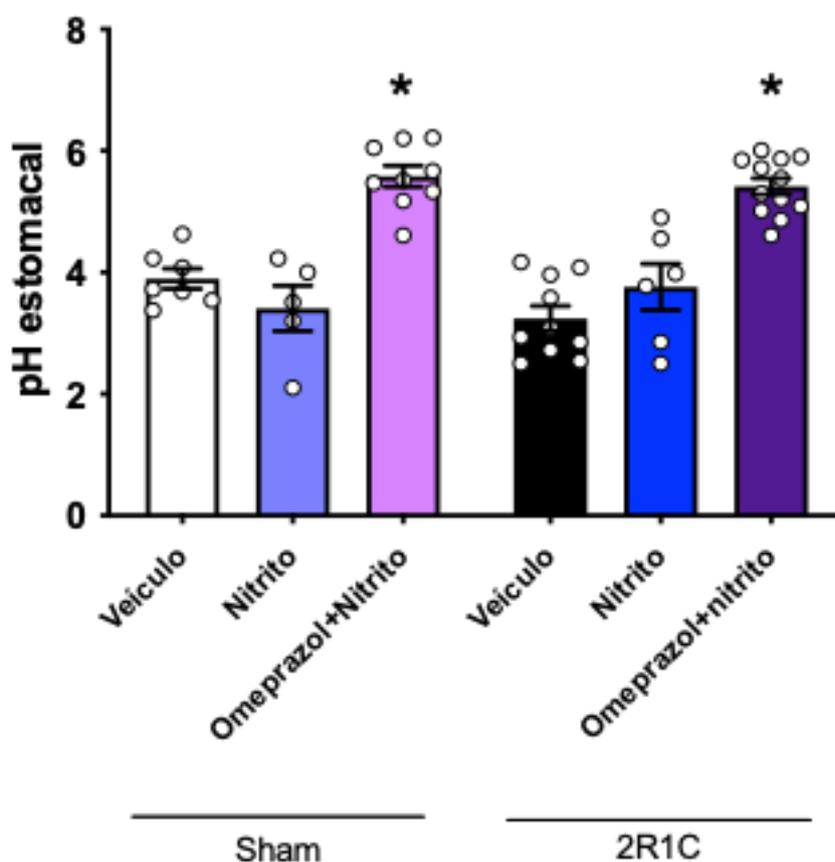


**Figura 21:** Determinação dos níveis de espécies relacionadas ao NO na aorta de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, SPL-334, Nitrito ou Nitrito+SPL 334 (n=4-8/grupo). (A) Determinação da concentração de nitrito na aorta. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C+Veículo

(B) Quantificação dos níveis de espécies nitrosiladas totais presentes na aorta. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

#### 5.14. O tratamento com omeprazol aumentou o pH estomacal dos animais tratados.

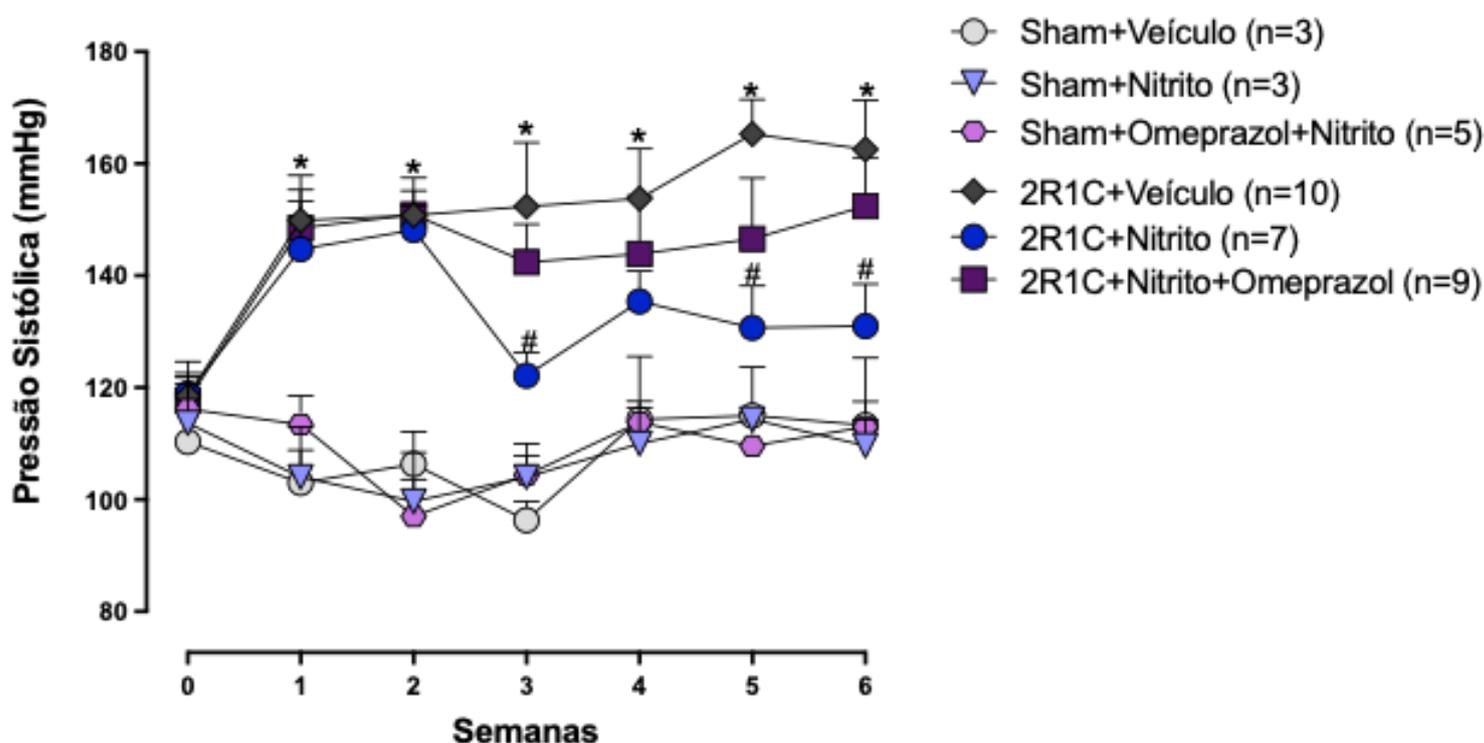
O tratamento com omeprazol aumentou o pH gástrico de todos os animais que receberam o tratamento com a droga, independentemente de serem normotensos ou hipertensos (Figura 22). Os valores obtidos de média e erro padrão foram, respectivamente, grupo Sham+Veículo:  $3.894 \pm 0.1658$ ; grupo Sham+Omeprazol+Nitrito:  $5.583 \pm 0.1749$ ;  $p < 0.05$ ; 2R1C+Veículo:  $3.244 \pm 0.2046$ ; 2R1C+Omeprazol+Nitrito:  $5.415 \pm 0.1341$ ;  $p < 0.05$ ).



**Figura 22:** pH estomacal de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Nitrito+Omeprazol (n=5-12/grupo). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham+Veículo. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

**5.15. O tratamento com Omeprazol (10mg/kg) tendeu a reverter os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio (15mg/kg) na hipertensão renovascular.**

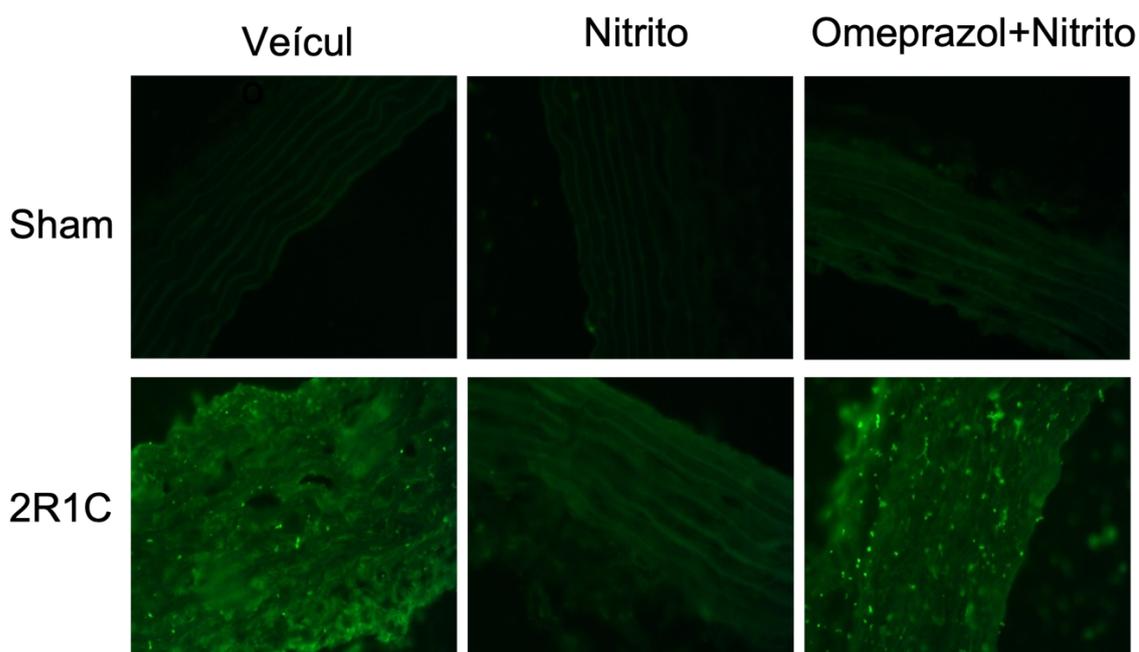
No que diz respeito a pressão sistólica, foi possível observar que o modelo de hipertensão utilizado foi capaz de aumentar os níveis pressóricos desde a primeira semana do protocolo (Sham+Veículo: 106mmHg±5.812; 2R1C+Veículo: 150mmHg±6.723;  $p<0.05$ ). O tratamento com nitrito 15mg/kg, via oral, foi capaz de diminuir a pressão sistólica dos animais hipertensos de maneira estatisticamente significativa nas semanas 3, 5 e 6 do protocolo. O tratamento concomitante com omeprazol tendeu a reverter estes efeitos. Os valores de média e erro padrão obtidos na semana 6 do protocolo foram, respectivamente grupo 2R1C+Veículo: 162mmHg±8.782; 2R1C+Nitrito: 131mmHg±7.540;  $p<0.05$ . O tratamento com nitrito e omeprazol nas doses utilizadas não causou alterações pressóricas nos animais normotensos.

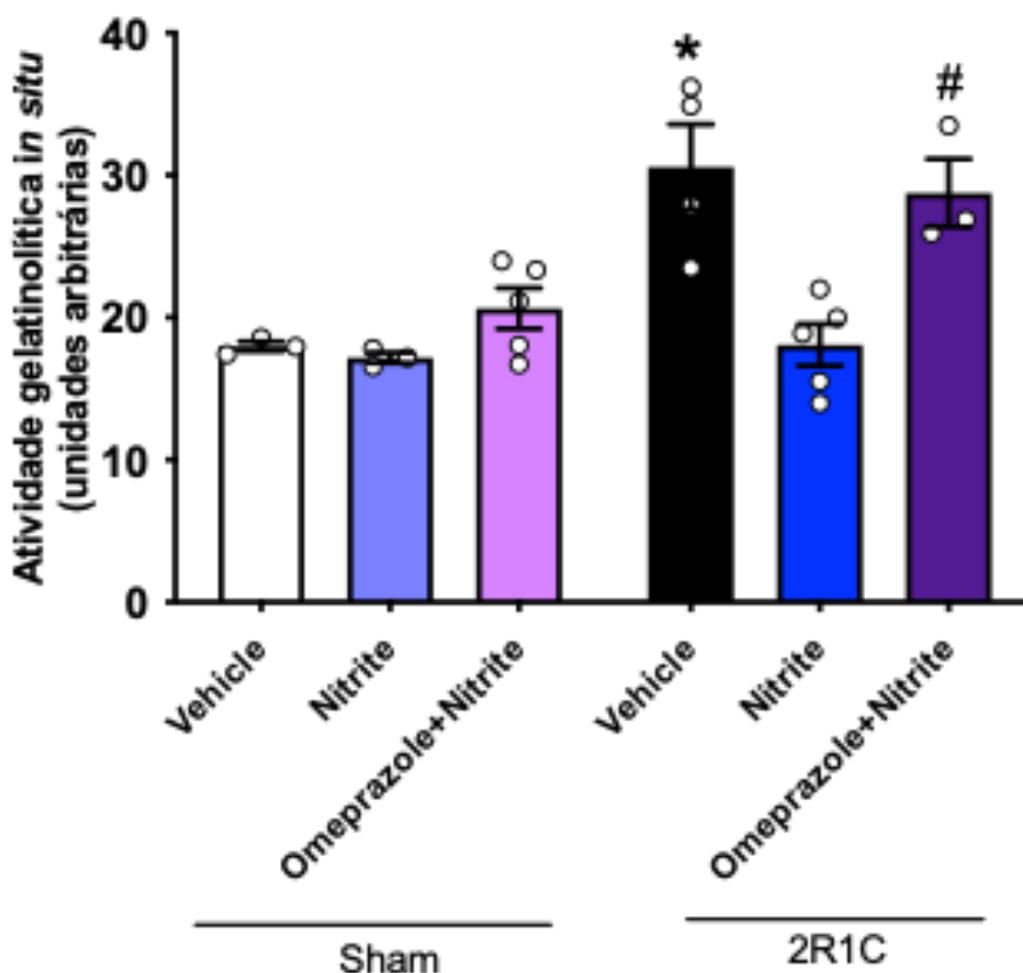


**Figura 23:** Pressão arterial sistólica de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Nitrito+Omeprazol (n=3-10/grupo). \* $p<0,05$  em relação ao grupo Sham+Veículo. #  $p<0,05$  em relação ao grupo 2R1C+Veículo. Dados mostrados como média ± E.P.M.

**5.16. O tratamento com Omeprazol (10mg/kg) reverteu os efeitos *in situ* na redução das gelatinases exercidos pelo nitrito de sódio (15mg/kg) na hipertensão renovascular.**

O modelo de hipertensão utilizado (2R1C) aumentou a atividade das gelatinases *in situ*. O nitrito de sódio na dose de 15mg/kg foi capaz de reduzir esta atividade nos animais hipertensos 2R1C. O tratamento com omeprazol reverteu este efeito (Figura 24). Os valores obtidos de média e erro padrão foram, respectivamente, grupo 2R1C+Veículo:  $30,60 \pm 2,995$ ;  $18,07 \pm 1,464$ ; 2R1C+Nitrito: 2R1C+Omeprazol+Nitrito:  $28,76 \pm 2,378$ . Os tratamentos utilizados não alteraram de maneira estatisticamente significativa a atividade das gelatinases em animais Sham. Os valores obtidos de média e erro padrão foram, respectivamente, grupo Sham+Veículo:  $17,98 \pm 0,3330$ , Sham+Nitrito:  $17,19 \pm 0,3624$ , Sham+Omeprazol+Nitrito:  $20,65 \pm 1,431$ .



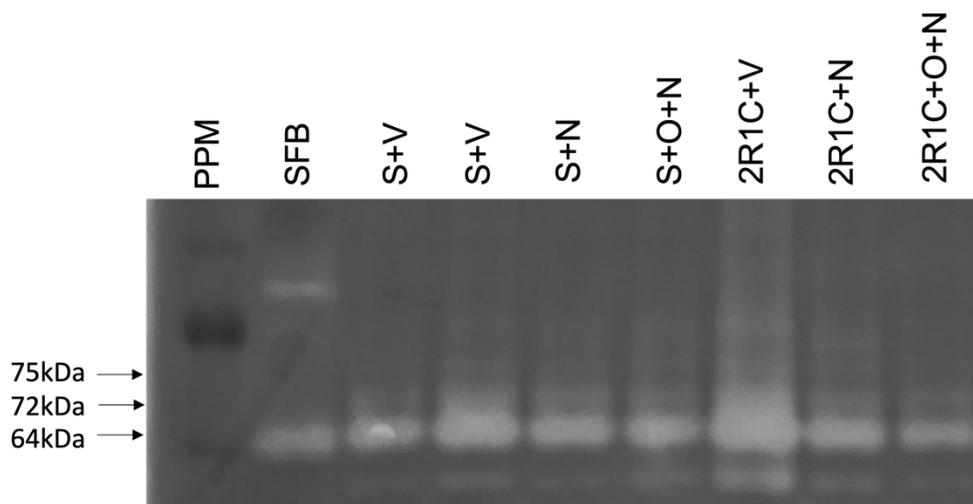


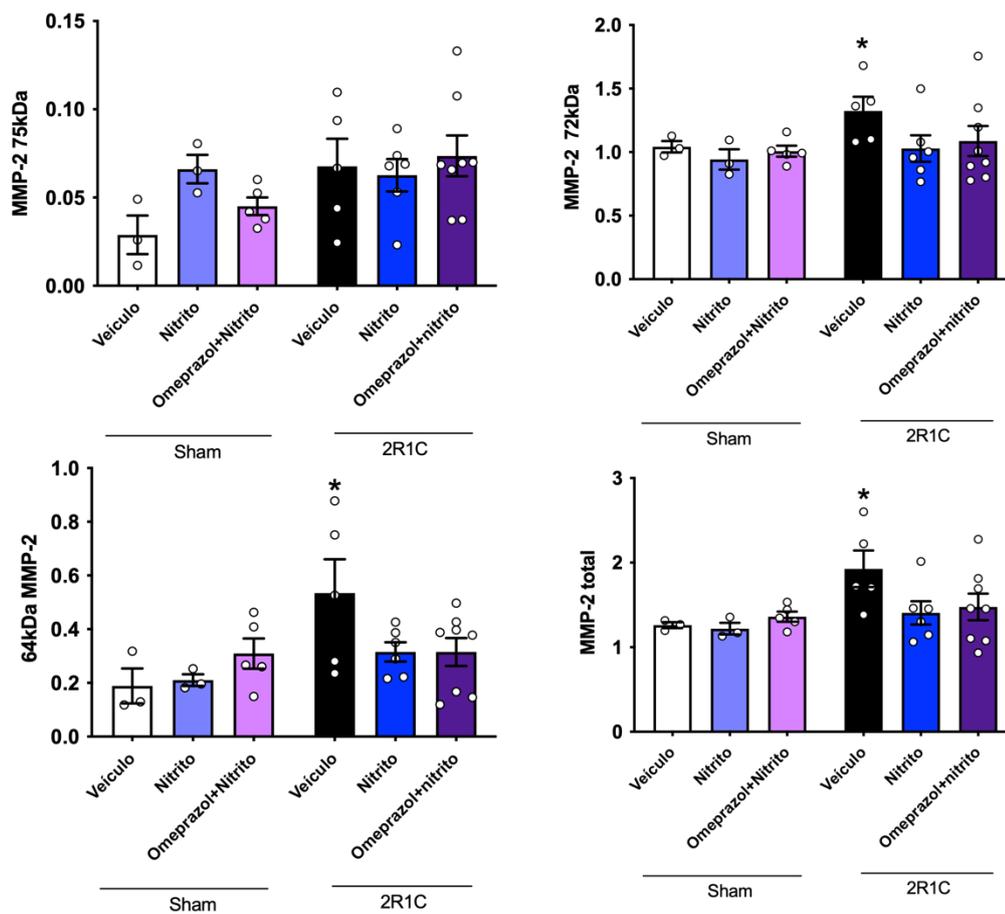
**Figura 24:** Atividade gelatinolítica in situ de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito (n=3-5/grupo). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham+Veículo # $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C+Nitrito. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

**5.17. O tratamento com nitrito de sódio (15mg/kg) tendeu a reduzir os níveis de MMP-2 em animais hipertensos 2R1C e o tratamento concomitante com omeprazol não interferiu neste efeito.**

A hipertensão 2R1C aumentou os níveis de MMP-2 total e de suas isoformas isoladamente (72 e 64 kDa). No que diz respeito a isoforma de 75 kDa não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. O tratamento com nitrito de sódio tendeu a diminuir os níveis de MMP-2, especialmente da isoforma de 64kDa (anova de duas vias  $p=0.0916$ ), a isoforma ativa da enzima. O omeprazol, na dose utilizada não causou alterações nos efeitos do nitrito de sódio. No que diz respeito aos animais normotensos (Sham), os tratamentos utilizados não causaram alterações estatisticamente significativas (Figura 25). Os valores obtidos de média e erro padrão, para a MMP-2 de 64kDa foram, respectivamente,

grupo Sham+Veículo:  $0.1887 \pm 0.06478$ ; Sham+Nitrito:  $0.2104 \pm 0.02180$ ;  
Sham+Omeprazol+Nitrito:  $0.3095 \pm 0.05615$ ; 2R1C+Veículo:  $0.5342 \pm 0.1263$ ; 2R1C+Nitrito:  
 $0.5134 \pm 0.03552$ ; 2R1C+Omeprazol+Nitrito:  $0.3151 \pm 0.05185$ .

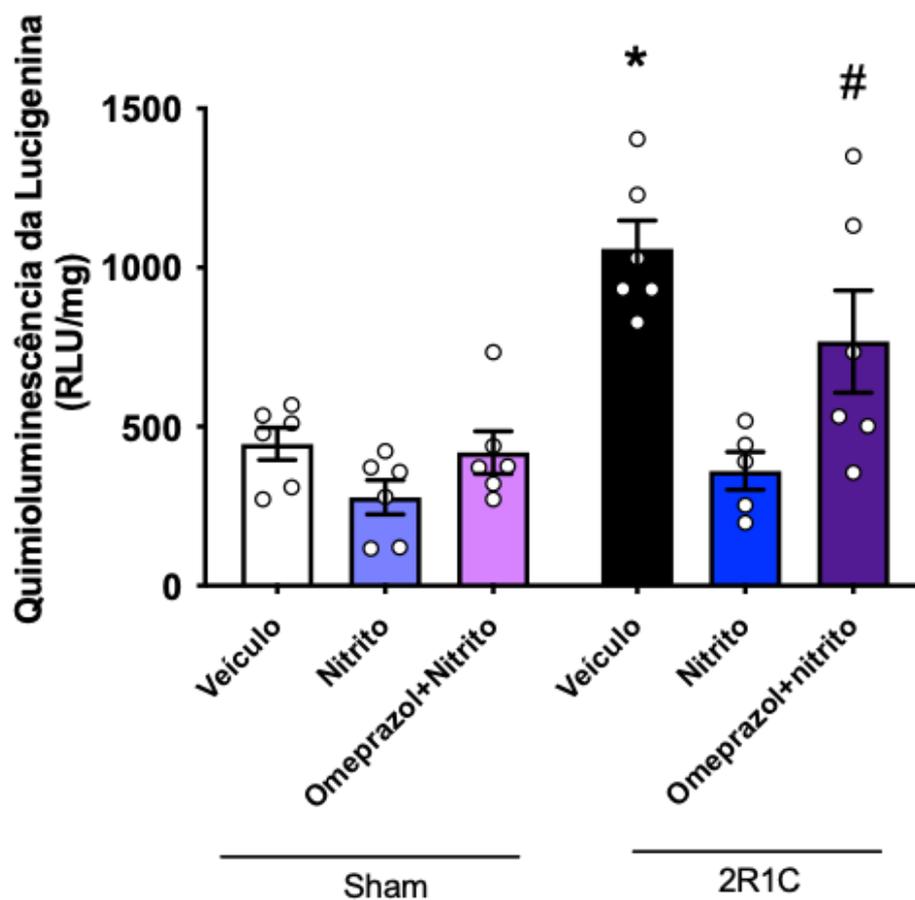




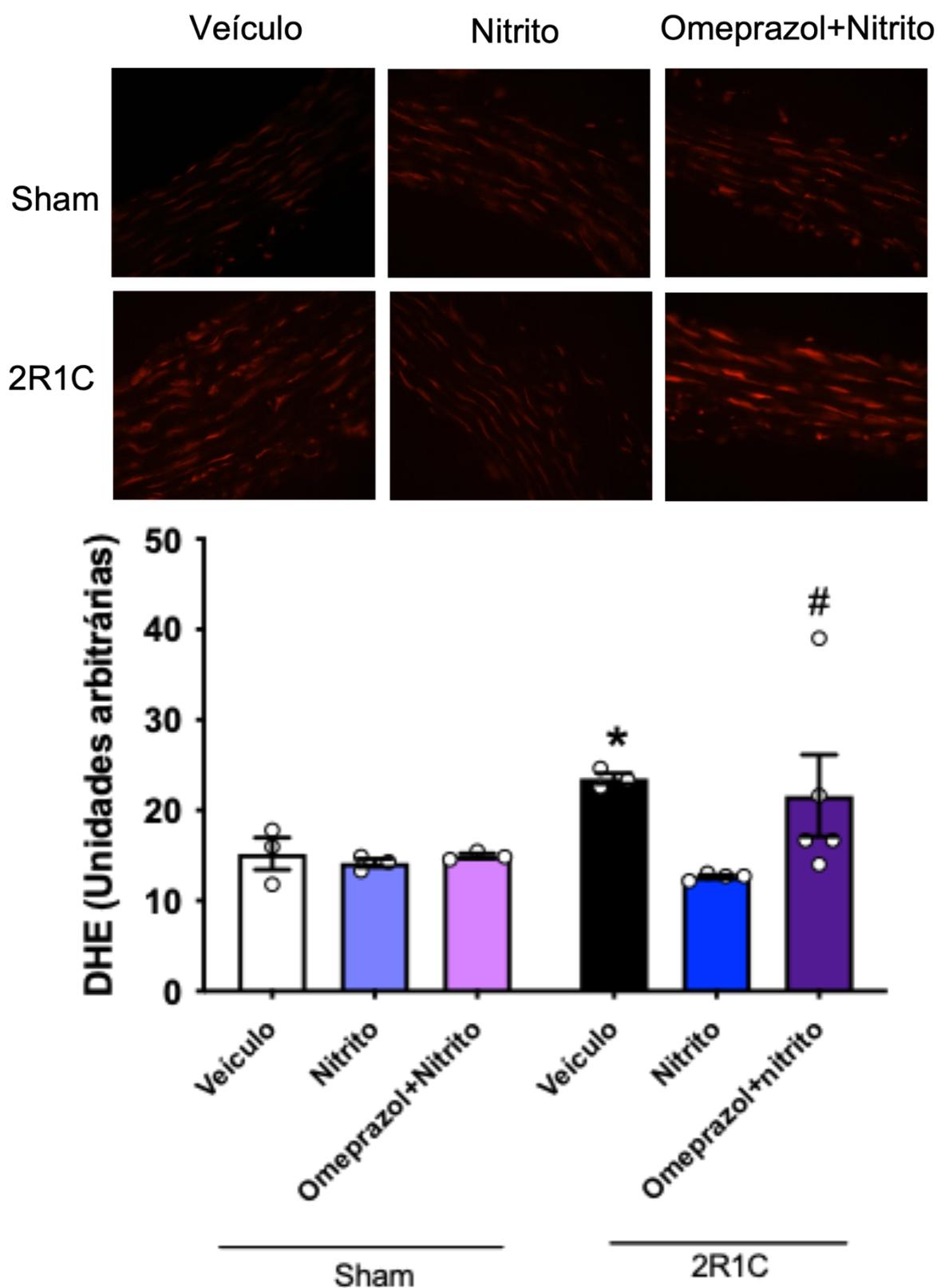
**Figura 25:** Atividade gelatinolítica em gel de animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito (n=3-8/grupo). \*p<0,05 em relação ao grupo Sham+Veículo. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

**5.18. O tratamento com nitrito de sódio (15mg/kg) diminuiu o estresse oxidativo em animais hipertensos 2R1C e o tratamento concomitante com omeprazol reverteu este efeito.**

O modelo de hipertensão utilizado (2R1C) aumentou o estresse oxidativo pelos dois métodos utilizados, lucigenina (atividade da NADPH oxidase) e DHE (quantificação de superóxido). O tratamento com nitrito reduziu o estresse oxidativo enquanto o omeprazol reverteu este efeito, também em ambas as metodologias utilizadas. Os tratamentos não alteraram o estresse oxidativo de maneira estatisticamente significativa nos animais Sham (Figuras 26 e 27). Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos pelo método da lucigenina foram, respectivamente, grupo Sham+Veículo:  $445.8 \pm 50.72$ , Sham+nitrito:  $278.3 \pm 53.80$ , Sham+Omeprazol+Nitrito:  $418.9 \pm 67.4$ ; 2R1C+Veículo:  $1059 \pm 88.40$ ; 2R1C+Nitrito:  $360.7 \pm 59.35$ ; 2R1C+Omeprazol+Nitrito:  $767.6 \pm 160.2$ . Os valores de média e erro padrão obtidos para os grupos pelo método do DHE foram, respectivamente, grupo Sham+Veículo:  $14.81 \pm 2.999$ ; Sham+Nitrito:  $13.82 \pm 0.5120$ ; Sham+Omeprazol+Nitrito:  $14.96 \pm 0.28$ ; 2R1C+Veículo:  $23.52 \pm 0.6012$ ; 2R1C+Nitrito:  $12.67 \pm 0.1832$ ; 2R1C+Omeprazol+Nitrito:  $21.61 \pm 4.519$ .



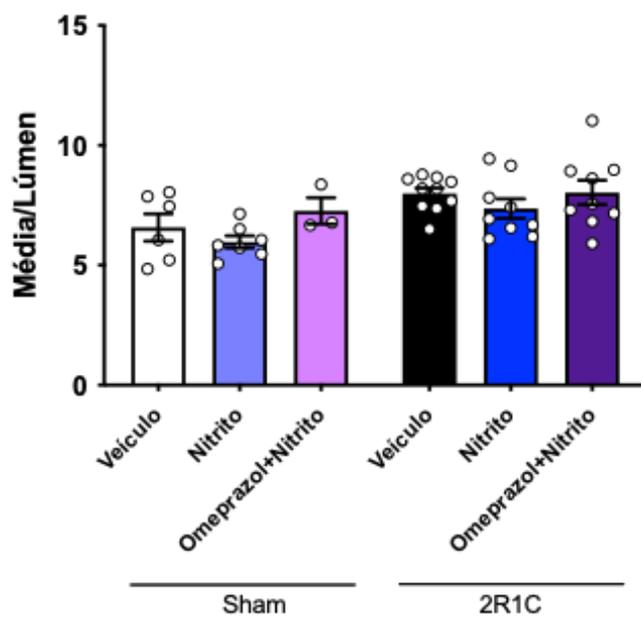
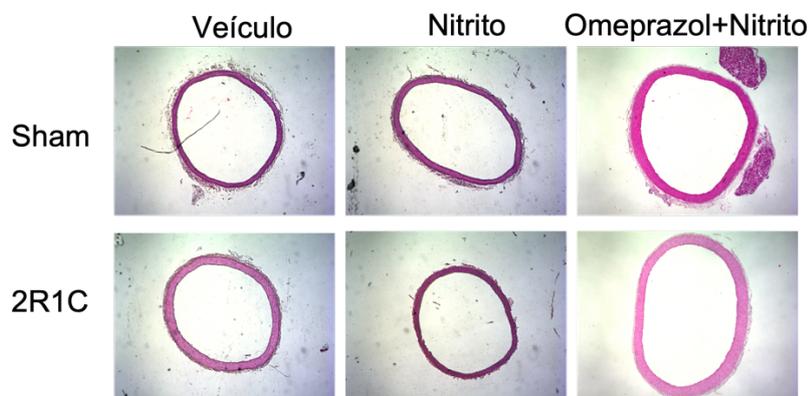
**Figura 26:** Atividade da NADPH oxidase em animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito (n=5-6/grupo). \*p<0,05 em relação ao grupo Sham+Veículo. #p<0,05 em relação ao grupo 2R1C+Nitrito. Dados mostrados como média ± E.P.M.

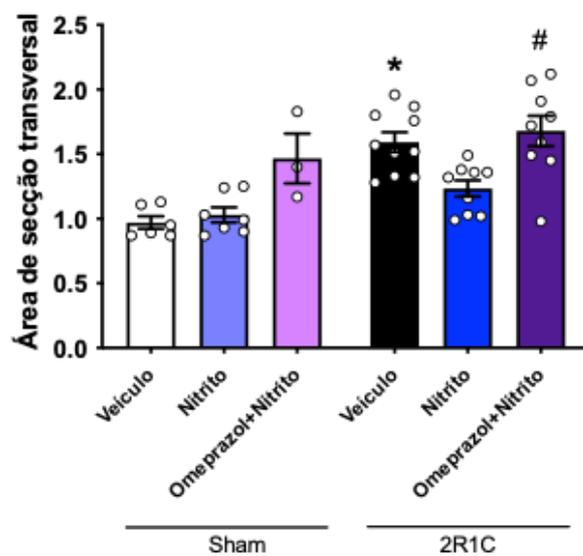


**Figura 27:** Níveis de superóxido obtidos pelo método de DHE em animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito (n=3-5/grupo). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham+Veículo. # $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C+Nitrito. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

**5.19. O tratamento com nitrito de sódio (15mg/kg) foi capaz de melhorar um dos parâmetros de remodelamento vascular avaliados na hipertensão e o omeprazol reverteu este efeito.**

No que diz respeito aos parâmetros de remodelamento vascular, obtivemos que o modelo de hipertensão utilizado aumentou a área de secção transversal (Sham+Veículo:  $0.97 \pm 0.04899$ ; 2R1C+Veículo:  $1.592 \pm 0.2442$ ;  $p < 0.05$ ), mas não a média/lúmen (Sham+Veículo:  $6.580 \pm 0.5686$ ; 2R1C+Veículo:  $7.993 \pm 0.5493$ ;  $p > 0.05$ ) dos animais. O tratamento com nitrito reduziu a área de secção transversal dos animais hipertensos e o omeprazol reverteu este efeito (2R1C+Nitrito:  $1.234 \pm 0.06219$ ; 2R1C+Omeprazol+Nitrito:  $1.680 \pm 0.1178$ ;  $p < 0.05$ ). (Figura 28). Em relação aos animais normotensos, o grupo com tratamento concomitante de omeprazol e nitrito apresentou um aumento da área de secção transversal semelhante ao dos animais dos grupos hipertensos (Sham+Veículo:  $0.97 \pm 0.04899$ ; Sham+Omeprazol+Nitrito:  $1.467 \pm 0.1934$ ;  $p < 0.05$ ).





**Figura 28:** Remodelamento vascular (aorta) obtido parâmetros média/lúmen e área de secção transversal em animais Sham e 2R1C tratados com Veículo, Nitrito ou Omeprazol+Nitrito (n=3-10/grupo). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham+Veículo. #  $p < 0,05$  em relação ao grupo 2R1C+Veículo. Dados mostrados como média  $\pm$  E.P.M.

## ***DISCUSSÃO***

---

## 6. DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram os efeitos benéficos do nitrito em diversos modelos de hipertensão e em vários parâmetros, como diminuição da pressão arterial, diminuição de EROs, como o superóxido e de enzimas pró-oxidantes como a NADPH oxidase (AMARAL *et al.*, 2015; MONTENEGRO *et al.*, 2011). Já foi observado, inclusive, o efeito do nitrito no remodelamento vascular (aórtico) em todos os parâmetros avaliados, que foi atribuído ao fato de o mesmo ser capaz de diminuir a atividade das gelatinases, apesar de não alterar sua expressão. Este estudo relacionou os efeitos anti-MMP do nitrito à XOR, já que a utilização de um inibidor seletivo para a enzima (febuxostat) reverteu os efeitos vasculares na atividade gelatinolítica induzidos pelo nitrito de sódio (RIZZI *et al.*, 2019). Apesar de, como dito anteriormente, já terem sido observados os efeitos do nitrito no sentido de inibir a atividade das MMPs no contexto da hipertensão arterial, este estudo demonstrou, pela primeira vez, que este efeito poderia estar relacionado com a ação dos nitrosotiois, um dos metabólitos do nitrito, sobre as gelatinases, especialmente a MMP-2, através da nitrosilação da enzima e consequente diminuição de sua atividade.

O PMA consiste em um éster de forbol que possui uma estrutura análoga ao segundo mensageiro diacilglicerol (DAG) e, dependendo do tipo celular, pode ter efeitos proliferativos, antiproliferativos, antineoplásicos, promotores de tumor, inflamatórios e antimicrobianos (VEH *et al.*, 2023). Na célula endotelial, já foi observado que o PMA pode ser um indutor de MMP-9 (MESCHIARI *et al.*, 2016). Também já foi demonstrado que o PMA é um indutor de MMP-2 e MMP-9 em células tumorais, possivelmente por induzir a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição que regula a expressão de uma variedade de genes (SHIH *et al.*, 2010; WOO *et al.*, 2004). Em CMLVs de aorta em cultura, já foi demonstrado que o PMA é capaz de regular o metabolismo de fosfolípidos, aumentando o potencial proliferativo nesse tipo celular (BOWES; OU; RAMOS, 1993).

Em nosso estudo, o PMA foi utilizado como um indutor de gelatinases (MMP-2 e MMP-9) em CMLVs e resultou em aumento na atividade dessas enzimas, especialmente na menor concentração utilizada (100nM). Por esse motivo, esta foi a concentração escolhida para os experimentos subsequentes. O tratamento com nitrito de sódio não foi capaz de exercer quaisquer efeitos na atividade das MMPs induzidas por PMA, enquanto o GSNO nas duas concentrações utilizadas foi capaz de diminuir a atividade das gelatinases. Este resultado nos sugere que o nitrito, diretamente, não é capaz de exercer efeitos sobre as MMPs, porém que seus metabólitos (nitrosotiois) que dependem do pH ácido do estômago para a formação, possuem efeitos sobre a atividade dessas enzimas.

Já foram demonstrados efeitos benéficos do tratamento de animais com nitrito, mais especificamente no comprometimento contrátil das CMLVs, em um modelo animal de Síndrome de progéria de Hutchinson-Gilford, uma doença genética rara que causa envelhecimento precoce associado a doenças cardiovasculares (DEL CAMPO *et al.*, 2020). Em relação ao tratamento com nitrosotiois, um estudo demonstrou que a adição de GSNO (50 $\mu$ M) em células musculares lisas de aortas de ratos onde o estresse oxidativo foi induzido, resultou em diminuição deste estresse oxidativo, acompanhado de aumento da nitrosilação de proteínas pró-oxidantes, além de proteínas do citoesqueleto, observados por espectrometria de massas (BELCASTRO *et al.*, 2017). Estes resultados também nos reforçam a ideia de que os nitrosotiois poderiam ser os principais efetores das respostas benéficas do nitrito em doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial.

A Angiotensina II é um peptídeo bioativo que está relacionado com diversas doenças cardiovasculares por ser um dos mediadores do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Na hipertensão, a Ang II pode ser a causa do aumento da pressão arterial por promover vasoconstrição (SCHIFFRIN, 2012). No modelo animal de hipertensão renovascular, a estenose da artéria renal tem como resposta o aumento desse peptídeo e conseqüente aumento da pressão

arterial. Já foi demonstrada uma relação direta entre o aumento da angiotensina II e o aumento de metaloproteinases, em especial das gelatinases já que, por exemplo, em animais knockout para MMP-2 foi observado uma prevenção do dano vascular induzido pela Ang II (BARHOUMI *et al.*, 2017). Adicionalmente, já foi demonstrado em células musculares lisas vasculares que a Ang II (1 $\mu$ M) foi capaz de induzir a expressão de MMP-2 e MMP-9 (KONG *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, apenas a maior concentração de Ang II utilizada (10 $\mu$ M) foi capaz de aumentar a atividade das gelatinases em CMLVs. De maneira semelhante ao que foi observado no tratamento com PMA, o nitrito não foi capaz de exercer efeitos nas gelatinases, enquanto o GSNO foi capaz de reduzir a atividade das MMPs, especialmente na maior concentração testada (25  $\mu$ M). Estudos já demonstraram que o tratamento com GSNO inibiu completamente a vasoconstrição de artérias cerebrais mediada pelo receptor AT<sub>1</sub> dependente de Ang II. Este efeito foi atribuído à S-nitrosação do receptor AT<sub>1</sub> na cisteína 289, o que diminui sua afinidade com a Ang II (BOURESSAM *et al.*, 2019; LECLERC *et al.*, 2006). Apoiando estes achados relativos à nitrosilação proteica de alvos farmacológicos, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que o tratamento com nitrito de sódio oral aumenta a S-nitrosilação da proteína quinase C vascular (PKC), atenuando as respostas vasculares à Ang II (PINHEIRO *et al.*, 2021).

Juntos, estes resultados nos sugerem que os nitrosotiois poderiam ter uma ação direta nas gelatinases vasculares tais que o nitrito, isoladamente, não é capaz de exercer. Como dito anteriormente, a hipótese do estudo consiste na possibilidade de o GSNO estar agindo de maneira a resultar em uma S-nitrosilação das gelatinases, especialmente da MMP-2, o que estaria gerando uma diminuição na atividade da mesma. A fim de reforçar essa ideia, realizamos experimentos onde foi feita uma deleção parcial da enzima GSNOR nas CMLVs utilizando um RNAi. Esta deleção geraria um aumento na disponibilidade de GSNO e seria, portanto, possível

verificar se este aumento resultaria em potencialização da resposta anti-MMP promovida pelos nitrosotiois (GSNO).

Inicialmente, realizamos experimentos a fim de demonstrar que a utilização do RNAi na concentração escolhida realmente seria capaz de diminuir a expressão da enzima GSNOR. De fato, encontramos uma redução superior a 50%, especialmente pelo método de western-blot, na expressão desta enzima. De maneira semelhante, outro estudo em que foi realizada a deleção parcial da enzima, também observou uma diminuição na expressão da GSNOR por ambos os métodos, ainda que menos pronunciada do que a encontrada em nosso estudo (NIU; ZHOU; CUI, 2021). Posteriormente, foram feitos experimentos a fim de encontrar uma concentração de GSNO que gerasse uma resposta anti-MMP parcial, a fim de facilitar a observação de potencialização diante do tratamento concomitante com o RNAi para o GSNOR. Nesse sentido, a concentração escolhida foi de 100nM que, isoladamente, não foi capaz de exercer efeitos anti-MMP estatisticamente significativos. Como esperado, a deleção parcial da GSNOR (grupo GSNOR-) gerou efeitos na diminuição da atividade das MMPs que o GSNO, isoladamente e na concentração utilizada, não foi capaz de gerar, ressaltando os efeitos dos nitrosotiois na diminuição da atividade de gelatinases induzidas por PMA.

No que diz respeito às células onde a atividade das gelatinases foi induzida por angiotensina II, não foram observados efeitos semelhantes, já que o tratamento concomitante de RNAi para GSNOR com o GSNO 100nM não gerou efeito mais pronunciado do que o GSNO isoladamente. Isto pode ser explicado pelo fato de que, neste experimento, o tratamento com GSNO em si já foi capaz de gerar um efeito pronunciado. Sugere-se que, nesse caso, o ideal seria utilizar uma concentração menor de GSNO a fim de possibilitar a observação de uma potencialização de efeito diante do tratamento concomitante com o RNAi.

Nosso estudo também demonstrou que a deleção parcial da enzima GSNOR, provavelmente por gerar um aumento na disponibilidade de GSNO, tendeu a aumentar

nitrosilação total de proteínas e aumentou a nitrosilação especificamente da MMP-2 em mais de 50%, nos sugerindo, mais uma vez, que os efeitos anti-MMP-2 dos nitrostiois poderiam ser devidos à nitrosilação da enzima que, neste contexto, geraria uma diminuição na atividade da mesma. Um estudo demonstrou que, apesar de a inibição da GSNOR utilizando um inibidor específico, e também um RNAi para a enzima resultar em aumento progressivo da atividade da enzima após 72 horas, ambas as abordagens foram capazes de aumentar a produção de RSNO em culturas primárias de células musculares esqueléticas embrionárias, indicando que, de fato, a deleção parcial na expressão da enzima é capaz de aumentar a disponibilidade de S-nitrosotiois nas células. Nesse mesmo estudo, também foi observado um aumento da nitrosilação total de proteínas mediante a utilização do RNAi para a GSNOR (YAMASHITA *et al.*, 2017).

Como dito anteriormente, alterações na homeostase do NO, tanto na via canônica quanto na via alternativa (ciclo nitrato-nitrito-NO), estão diretamente relacionadas com os efeitos vasculares deletérios observados em doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial. Nesse sentido, abordagens farmacológicas que geram aumento na disponibilidade de NO e espécies relacionados poderiam exercer efeitos benéficos nessas situações patológicas. Em nosso estudo, utilizamos o SPL-334, que é um inibidor sintético da enzima GSNOR, a fim de observar se este seria capaz de potencializar os efeitos do nitrito de sódio em uma dose que, em estudos anteriores, não foi capaz de reduzir a pressão arterial (RIZZI *et al.*, 2019) e também de observar os efeitos isolados desta droga, já que não foram encontrados na literatura estudos anteriores com esta abordagem. Observamos que, apesar da tendência de diminuição da pressão arterial com ambas as drogas utilizadas isoladamente, apenas o tratamento concomitante foi capaz de diminuir a pressão arterial de maneira estatisticamente significativa, especialmente na semana 4 do protocolo (correspondente à segunda semana de tratamento). Em um estudo onde foi induzida a hipertensão pulmonar por um modelo de hipóxia crônica, foi observado um

aumento da expressão e atividade da GSNOR indicando que, de fato, a inibição da enzima poderia ter efeitos benéficos em um contexto de aumento de pressão (WU *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao remodelamento vascular, nossos resultados mostraram que o SPL-334, na concentração utilizada, apresentou efeitos benéficos isoladamente especialmente no que se refere ao parâmetro média/lúmen. No entanto, no que se refere ao parâmetro área de secção transversal, apenas a utilização concomitante das duas drogas foi capaz de gerar efeitos estatisticamente significativos no sentido de diminuição do remodelamento vascular. Ambos os parâmetros avaliados estão relacionados ao remodelamento hipertrófico normalmente observado em artérias de condutância como a aorta e estão associados com o crescimento e a hiperplasia das CMLVs (PRADO *et al.*, 2021). De maneira controversa, um estudo anterior realizado em nosso laboratório demonstrou que, embora não tivesse exercido efeitos na pressão arterial, esta dose de nitrito (1mg/kg) foi capaz de exercer efeitos anti-remodelamento na aorta.

O tratamento com nitrito de sódio na dose de 1mg/kg foi capaz de aumentar a concentração de nitrito no plasma dos animais hipertensos 2R1C, porém não foi capaz de alterar os níveis de espécies nitrosiladas totais (RXNO) ou nitrosotiois (RSNO). O SPL-334 isoladamente e o tratamento concomitante de ambas as drogas também não foi capaz de gerar quaisquer alterações nas concentrações plasmáticas de nitrito e seus metabólitos. Estes achados podem ser explicados pelo fato de que, como mostrado em um estudo anterior, o pico de espécies nitrosiladas totais no plasma de animais tratados com nitrito em uma dose maior (15mg/kg) ocorrer meia hora após o tratamento (FERREIRA *et al.*, 2021). Como, em nosso estudo, as amostras foram coletadas 1 hora após o último tratamento, não foi possível detectar tais aumentos. Em relação a concentração de nitrito na aorta, foi observado que apenas o tratamento concomitante de nitrito e SPL-334 foi capaz de promover um acúmulo tecidual de nitrito, além de tender a aumentar as concentrações de espécies nitrosiladas totais. Um estudo observou-se que, de fato, este acúmulo tecidual de nitrito na aorta se dá de maneira prolongada

(pico em 24 horas após administração), o que pode explicar nossos achados (FERREIRA *et al.*, 2021).

Os achados relacionados ao tratamento isolado e concomitante de nitrito e SPL-344 nos reforçam a ideia de que a inibição da GSNOR e consequente aumento da disponibilidade de nitrosotiois e nitrosilação de proteínas-alvo, como a MMP-2, pode potencializar os efeitos do tratamento com nitrito de sódio (em animais) ou diretamente com GSNO (em células).

Já foi demonstrado em outros estudos que o tratamento com omeprazol isoladamente é capaz de induzir remodelamento vascular e ativação de MMPs em animais normotensos, além de reverter efeitos anti-pressóricos e de aumento de espécies nitrosiladas totais do nitrito de sódio na dose de 15mg/kg em animais hipertensos L-NAME (NOGUEIRA *et al.*, 2021; SANCHES-LOPES *et al.*, 2020). Adicionalmente, em outro estudo do nosso grupo de pesquisa, que utilizou o modelo de hipertensão renovascular, foi observado que o tratamento concomitante com omeprazol reverteu os efeitos pressóricos e de aumento de nitrosotiois plasmático de animais tratados com nitrito e nitrato. Também foi demonstrado nesse estudo que em um aumento de pressão agudo induzido por L-NAME, os efeitos do tratamento com GSNO foram superiores aos do nitrito no sentido de diminuir a pressão arterial (PINHEIRO *et al.*, 2015). Tais achados reforçam a ideia de que os nitrosotiois seriam os principais efetores da resposta anti-hipertensiva do nitrito.

Em nosso estudo, utilizamos o omeprazol a fim de diminuir a formação de nitrosotiois no estômago pelo aumento do pH estomacal e verificar se este fato ocasionaria um bloqueio nos efeitos pressóricos, anti-MMP, anti-estresse oxidativo e anti-remodelamento vascular exercidos pelo nitrito de sódio, o que reforçaria a importância dos nitrosotiois nesses efeitos. De fato, observamos que o tratamento com omeprazol reverteu os efeitos pressóricos do nitrito de sódio em quase todas as semanas de tratamento (com exceção da semana 2), além de reverter os efeitos do nitrito nas gelatinases, especialmente pelo método *in situ*. Em relação a zimografia

in gel, essa reversão não foi observada possivelmente pelo fato de que esta metodologia reflete mais os níveis de MMP-2 do que sua atividade em si.

O tratamento com omeprazol também reverteu os efeitos antioxidantes do nitrito de sódio pelos dois métodos avaliados. No que diz respeito ao remodelamento vascular, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos em relação à média/lúmen. No entanto, em relação à área de secção transversal, observamos que o tratamento com nitrito de sódio melhorou este parâmetro de remodelamento vascular e o nitrito foi capaz de reverter estes efeitos. Como dito anteriormente, outros estudos já haviam demonstrado que o omeprazol reverte efeitos pressóricos do nitrito de sódio. Porém, nosso estudo demonstrou, pela primeira vez, que a diminuição na formação de nitrosotiois no estômago também compromete os efeitos do nitrito no estresse oxidativo e na diminuição da atividade das gelatinases e, conseqüentemente, nos seus efeitos anti-remodelamento vascular.

Em humanos, já foi demonstrado que o pré-tratamento com outro inibidor da bomba de prótons (esomeprazol) foi capaz de inibir os efeitos do nitrito de sódio na diminuição da pressão arterial em voluntários normotensos. A partir desse estudo, foi possível concluir que o efeito agudo de diminuição da pressão arterial exercido pelo nitrito é dependente da manutenção da acidez estomacal (MONTENEGRO *et al.*, 2017). Embora realizado em indivíduos normotensos, estes achados nos sugerem que a importância da formação de nitrosotiois para os efeitos do nitrito de sódio podem ser extrapolados para os seres humanos.

Como exposto acima, nossos experimentos procuraram demonstrar a importância da formação gástrica de nitrosotiois para as respostas cardiovasculares ao nitrito de sódio administrado por via oral, tanto ao tentarmos potencializar a formação de nitrosotiois, resultando em aumento dos efeitos cardiovasculares, quanto ao examinarmos os efeitos do aumento do pH gástrico, resultando em diminuição dos efeitos cardiovasculares do nitrito.

## **CONCLUSÕES**

---

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem sugerir que os efeitos do nitrito de sódio nas gelatinases, especialmente na MMP-2, seriam dependentes da acidez estomacal e formação de nitrosotiois nesse ambiente. Ainda, os resultados *in vitro*, nos sugerem que este efeito estaria relacionado a um aumento da nitrosilação da enzima decorrente de uma maior disponibilidade de nitrosotiois. Esta ideia foi reforçada pelos achados *in vivo*, onde a suplementação da via nitrato-nitrito-NO com a utilização de SPL-344 gerou uma potencialização nos efeitos benéficos do nitrito na hipertensão arterial. Em contrapartida, o bloqueio da via (pela utilização de omeprazol) reverteu estes efeitos, inclusive o de diminuição na atividade das gelatinases.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 8. REFERÊNCIAS

- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, England, vol. 357, no. 3, p. 593–615, Aug. 2001. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570593>.
- AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; PINHEIRO, L. C.; MONTENEGRO, M. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. **Redox biology**, Netherlands, vol. 5, p. 340–346, Aug. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.009>.
- AMARAL, J. H.; RIZZI, E. S.; ALVES-LOPES, R.; PINHEIRO, L. C.; TOSTES, R. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Antioxidant and antihypertensive responses to oral nitrite involves activation of the Nrf2 pathway. **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 141, p. 261–268, Sep. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.028>.
- ANAND, P.; HAUSLADEN, A.; WANG, Y.-J.; ZHANG, G.-F.; STOMBERSKI, C.; BRUNENGRABER, H.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Identification of S-nitroso-CoA reductases that regulate protein S-nitrosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, vol. 111, no. 52, p. 18572–18577, Dec. 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417816112>.
- BABA, S. P.; BHATNAGAR, A. ROLE OF THIOLS IN OXIDATIVE STRESS. **Current opinion in toxicology**, Netherlands, vol. 7, p. 133–139, Feb. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.03.005>.
- BARHOUMI, T.; FRAULOB-AQUINO, J. C.; ONEEB, M.; MIAN, R.; OUERD, S.; IDRIS-KHODJA, N.; HUO, K.; REHMAN, A.; CAILLON, A.; DANCOSÉ-GIAMBATTISTO, B.; EBRAHIMIAN, T.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Matrix metalloproteinase-2 knockout prevents angiotensin II-induced vascular injury. , p. 1–10, 2017. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx115>.
- BATISTA, R. I. M.; NOGUEIRA, R. C.; FERREIRA, G. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; DAMACENA-ANGELIS, C.; PINHEIRO, L. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Antiseptic mouthwash inhibits antihypertensive and vascular protective effects of L-arginine. **European journal of pharmacology**, Netherlands, vol. 907, p. 174314, Sep. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174314>.
- BEIGI, F.; GONZALEZ, D. R.; MINHAS, K. M.; SUN, Q.-A.; FOSTER, M. W.; KHAN, S. A.; TREUER, A. V.; DULCE, R. A.; HARRISON, R. W.; SARAIVA, R. M.; PREMER, C.; SCHULMAN, I. H.; STAMLER, J. S.; HARE, J. M. Dynamic denitrosylation via S-nitrosoglutathione reductase regulates cardiovascular function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, vol. 109, no. 11, p. 4314–4319, Mar. 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113319109>.
- BELCASTRO, E.; WU, W.; FRIES-RAETH, I.; CORTI, A.; POMPELLA, A.; LEROY, P.; LARTAUD, I.; GAUCHER, C. Oxidative stress enhances and modulates protein S-nitrosation in smooth muscle cells exposed to S-nitrosoglutathione. **Nitric oxide: biology and chemistry**, United States, vol. 69, p. 10–21, Sep. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.07.004>.

- BENHAR, M.; FORRESTER, M. T.; STAMLER, J. S. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. **Nature reviews. Molecular cell biology**, England, vol. 10, no. 10, p. 721–732, Oct. 2009. <https://doi.org/10.1038/nrm2764>.
- BENJAMIN, N.; O'DRISCOLL, F.; DOUGALL, H.; DUNCAN, C.; SMITH, L.; GOLDEN, M.; MCKENZIE, H. Stomach NO synthesis. **Nature**, England, vol. 368, no. 6471, p. 502, Apr. 1994. <https://doi.org/10.1038/368502a0>.
- BHANDARI, V.; CHOO-WING, R.; CHAPOVAL, S. P.; LEE, C. G.; TANG, C.; KIM, Y. K.; MA, B.; BALUK, P.; LIN, M. I.; MCDONALD, D. M.; HOMER, R. J.; SESSA, W. C.; ELIAS, J. A. Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, vol. 103, no. 29, p. 11021–11026, Jul. 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601057103>.
- BOURESSAM, M.-L.; LECAT, S.; RAOUL, A.; GAUCHER, C.; PERRIN-SARRADO, C.; LARTAUD, I.; DUPUIS, F. S-nitrosoglutathione inhibits cerebrovascular angiotensin II-dependent and -independent AT(1) receptor responses: A possible role of S-nitrosation. **British journal of pharmacology**, England, vol. 176, no. 12, p. 2049–2062, Jun. 2019. <https://doi.org/10.1111/bph.14644>.
- BOWES, R. C. 3rd; OU, X.; RAMOS, K. S. Differential phospholipid metabolism in rat aortic smooth muscle cells of varying proliferative potential upon long term exposure to phorbol 12-myristate 13-acetate. **Chemico-biological interactions**, Ireland, vol. 86, no. 3, p. 213–228, Mar. 1993. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(93\)90099-k](https://doi.org/10.1016/0009-2797(93)90099-k).
- BRONIOWSKA, K. A.; HOGG, N. The chemical biology of S-nitrosothiols. **Antioxidants and Redox Signaling**, vol. 17, no. 7, p. 969–980, 2012. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4590>.
- CAMPBELL, C. A.; GASKIN, P. J.; DARTON, J.; CHIU, P.; LEE, K.; MCLEAN, P. G. Validation of a conscious rat model for the discovery of novel agents that inhibit gastric acid secretion. **European journal of pharmacology**, Netherlands, vol. 589, no. 1–3, p. 260–263, Jul. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.026>.
- CASIN, K. M.; FALLICA, J.; MACKOWSKI, N.; VEENEMA, R. J.; CHAN, A.; ST PAUL, A.; ZHU, G.; BEDJA, D.; BISWAL, S.; KOHR, M. J. S-Nitrosoglutathione Reductase Is Essential for Protecting the Female Heart From Ischemia-Reperfusion Injury. **Circulation research**, United States, vol. 123, no. 11, p. 1232–1243, Nov. 2018. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313956>.
- CASTRO, M. M.; RIZZI, E.; FIGUEIREDO-LOPES, L.; FERNANDES, K.; BENDHACK, L. M.; PITOL, D. L.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Metalloproteinase inhibition ameliorates hypertension and prevents vascular dysfunction and remodeling in renovascular hypertensive rats. **Atherosclerosis**, Ireland, vol. 198, no. 2, p. 320–331, Jun. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.10.011>.
- CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends in cell biology**, England, vol. 11, no. 11, p. S37–

43, Nov. 2001. .

- CHEN, Q.; SIEVERS, R. E.; VARGA, M.; KHARAIT, S.; HADDAD, D. J.; PATTON, A. K.; DELANY, C. S.; MUTKA, S. C.; BLONDER, J. P.; DUBÉ, G. P.; ROSENTHAL, G. J.; SPRINGER, M. L. Pharmacological inhibition of S-nitrosoglutathione reductase improves endothelial vasodilatory function in rats in vivo. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, vol. 114, no. 6, p. 752–760, Mar. 2013. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01302.2012>.
- CHEN, S.; BU, D.; ZHU, J.; YUE, T.; GUO, S.; WANG, X.; PAN, Y.; LIU, Y.; WANG, P. Endogenous hydrogen sulfide regulates xCT stability through persulfidation of OTUB1 at cysteine 91 in colon cancer cells. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, United States, vol. 23, no. 5, p. 461–472, May 2021. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2021.03.009>.
- CHOW, A. K.; CENA, J.; SCHULZ, R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. , p. 189–205, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707344>.
- CHRYSANT, S. G. Proton pump inhibitor-induced hypomagnesemia complicated with serious cardiac arrhythmias. **Expert review of cardiovascular therapy**, England, vol. 17, no. 5, p. 345–351, May 2019. <https://doi.org/10.1080/14779072.2019.1615446>.
- COHUET, G.; STRUIJKER-BOUDIER, H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. **Pharmacology & therapeutics**, England, vol. 111, no. 1, p. 81–98, Jul. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.09.002>.
- CREEMERS, E. E.; CLEUTJENS, J. P.; SMITS, J. F.; DAEMEN, M. J. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? **Circulation research**, United States, vol. 89, no. 3, p. 201–210, Aug. 2001. .
- DANIELLE, V. A. B.; MICHELE, A. G.; CASTRO, M. Matrix Metalloproteinase 2 as a Potential Mediator of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Chronic Vascular Remodeling in Hypertension. , p. 221–231, 2016. <https://doi.org/10.1159/000441621>.
- DE LA RIVA, I. J.; ROSON, M. I.; VEGA, G. W.; SPEZIALE, N.; ALBORNOZ, L. E.; PALUMBO, E. L.; FERRERO, A. J.; DAMIANO, P. F. Effect of oral L-arginine administration for three weeks in two kidney-two clip hypertensive rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, vol. 108, no. 5, p. 415–421, 2000. <https://doi.org/Doi10.1076/0954-6794.108.5.415>.
- DEL CAMPO, L.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, C.; ANDRÉS-MANZANO, M. J.; DORADO, B.; ANDRÉS, V. Vascular Smooth Muscle Cell-Specific Progerin Expression Provokes Contractile Impairment in a Mouse Model of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome that Is Ameliorated by Nitrite Treatment. **Cells**, Switzerland, vol. 9, no. 3, Mar. 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9030656>.
- DING, Q.; CAO, F.; LAI, S.; ZHUGE, H.; CHANG, K.; VALENCAK, T. G.; LIU, J.; LI, S.; REN, D. Lactobacillus plantarum ZY08 relieves chronic alcohol-induced hepatic steatosis and liver injury in mice via restoring intestinal flora homeostasis. **Food research international (Ottawa, Ont.)**, Canada, vol. 157, p. 111259, Jul. 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111259>.

- EGAN, B. M.; KJELDSEN, S. E.; GRASSI, G.; ESLER, M.; MANCIA, G. The global burden of hypertension exceeds 1.4 billion people: should a systolic blood pressure target below 130 become the universal standard? **Journal of hypertension**, Netherlands, vol. 37, no. 6, p. 1148–1153, Jun. 2019. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002021>.
- FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N.; BRYAN, N. S.; JOURD'HEUIL, D.; KELM, M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. **The FASEB Journal**, United States, vol. 16, no. 13, p. 1775–1785, Nov. 2002. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0363com>.
- FENG, J.; CHEN, L.; ZUO, J. Protein S-Nitrosylation in plants: Current progresses and challenges. **Journal of integrative plant biology**, China (Republic : 1949- ), vol. 61, no. 12, p. 1206–1223, Dec. 2019. <https://doi.org/10.1111/jipb.12780>.
- FERREIRA, G. C.; PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; ANGELIS, C. D.; PORTELLA, R. L.; TANUS-SANTOS, J. E. Antioxidant tempol modulates the increases in tissue nitric oxide metabolites concentrations after oral nitrite administration. **Chemico-biological interactions**, Ireland, vol. 349, p. 109658, Nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109658>.
- FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular aspects of medicine**, England, vol. 30, no. 1–2, p. 1–12, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
- FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, England, vol. 288, no. 5789, p. 373–376, Nov. 1980. .
- GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**, vol. 93, no. 1, p. 105–113, 2004. DOI 10.1093/bja/ae163. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/bja/ae163>.
- GHEBREMARIAM, Y. T.; LEPENDU, P.; LEE, J. C.; ERLANSON, D. A.; SLAVIERO, A.; SHAH, N. H.; LEIPER, J.; COOKE, J. P. Unexpected effect of proton pump inhibitors: elevation of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine. **Circulation**, United States, vol. 128, no. 8, p. 845–853, Aug. 2013. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003602>.
- GODO, S.; SHIMOKAWA, H. Endothelial Functions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, United States, vol. 37, no. 9, p. e108–e114, Sep. 2017. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309813>.
- GOUVÊA, S. A.; MOYSÉS, M. R.; BISSOLI, N. S.; PIRES, J. G. P.; CABRAL, A. M.; ABREU, G. R. Oral administration of L-arginine decreases blood pressure and increases renal excretion of sodium and water in renovascular hypertensive rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 36, no. 7, p. 943–949, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000700017>.

- GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, vol. 48, p. 1014–1022, Jun. 1962. .
- GU, Z.; KAUL, M.; YAN, B.; KRIDEL, S. J.; CUI, J.; STRONGIN, A.; SMITH, J. W.; LIDDINGTON, R. C.; LIPTON, S. A. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. **Science (New York, N.Y.)**, United States, vol. 297, no. 5584, p. 1186–1190, Aug. 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1073634>.
- GUIMARAES, D. A.; RIZZI, E.; CERON, C. S.; OLIVEIRA, A. M.; OLIVEIRA, D. M.; CASTRO, M. M.; TIRAPELLI, C. R.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Doxycycline dose-dependently inhibits MMP-2-mediated vascular changes in 2K1C hypertension. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, England, vol. 108, no. 5, p. 318–325, May 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00656.x>.
- HABERMEYER, M.; ROTH, A.; GUTH, S.; DIEL, P.; ENGEL, K.-H.; EPE, B.; FURST, P.; HEINZ, V.; HUMPF, H.-U.; JOOST, H.-G.; KNORR, D.; DE KOK, T.; KULLING, S.; LAMPEN, A.; MARKO, D.; RECHKEMMER, G.; RIETJENS, I.; STADLER, R. H.; VIETHS, S.; ... EISENBRAND, G. Nitrate and nitrite in the diet: how to assess their benefit and risk for human health. **Molecular nutrition & food research**, Germany, vol. 59, no. 1, p. 106–128, Jan. 2015. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400286>.
- HAYASHI, K.; NAIKI, T. Adaptation and remodeling of vascular wall; biomechanical response to hypertension. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, Netherlands, vol. 2, no. 1, p. 3–19, Jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2008.05.002>.
- HAYASHIDA, K.; BAGCHI, A.; MIYAZAKI, Y.; HIRAI, S.; SETH, D.; SILVERMAN, M. G.; REZOAGLI, E.; MARUTANI, E.; MORI, N.; MAGLIOCCA, A.; LIU, X.; BERRA, L.; HINDLE, A. G.; DONNINO, M. W.; MALHOTRA, R.; BRADLEY, M. O.; STAMLER, J. S.; ICHINOSE, F. Improvement in Outcomes After Cardiac Arrest and Resuscitation by Inhibition of S-Nitrosoglutathione Reductase. **Circulation**, United States, vol. 139, no. 6, p. 815–827, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032488>.
- HILL, B. G.; BHATNAGAR, A. Protein S-glutathiolation: redox-sensitive regulation of protein function. **Journal of molecular and cellular cardiology**, England, vol. 52, no. 3, p. 559–567, Mar. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.07.009>.
- IGNARRO, L. J. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. **Kidney international. Supplement**, United States, vol. 55, p. S2-5, Jun. 1996. .
- IIDA, H.; INAMORI, M.; OKUNO, K.; SEKINO, Y.; SAKAI, E.; OKUBO, H.; HIGURASHI, T.; ENDO, H.; HOSONO, K.; YONEDA, M.; KOIDE, T.; TAKAHASHI, H.; GOTO, A.; KUBOTA, K.; SAITO, S.; MAEDA, S.; NAKAJIMA, A.; GOTOH, E. Early effects of oral administration of esomeprazole and omeprazole on the intragastric pH. **Hepato-gastroenterology**, Greece, vol. 62, no. 138, p. 493–496, 2015. .
- INCALZA, M. A.; D'ORIA, R.; NATALICCHIO, A.; PERRINI, S.; LAVIOLA, L.; GIORGINO, F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular pharmacology**, United States, vol.

100, p. 1–19, Jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>.

JACKSON, J.; PATTERSON, A. J.; MACDONALD-WICKS, L.; MCEVOY, M. The role of inorganic nitrate and nitrite in CVD. **Nutrition Research Reviews**, vol. 30, no. 2, p. 247–264, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0954422417000105>.

JOHNSON, J. L. Metalloproteinases in atherosclerosis. **European Journal of Pharmacology**, vol. 816, no. August, p. 93–106, 2017. DOI 10.1016/j.ejphar.2017.09.007. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.007>.

KAPIL, V.; HAYDAR, S. M. A.; PEARL, V.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; AHLUWALIA, A. Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 55, p. 93–100, 2013. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.013>.

KIM, J.; QIAO, F.; SINGH, A. K.; WON, J.; SINGH, I. Efficacies of S-nitrosoglutathione (GSNO) and GSNO reductase inhibitor in SARS-CoV-2 spike protein induced acute lung disease in mice. **Frontiers in pharmacology**, Switzerland, vol. 14, p. 1304697, 2023. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1304697>.

KONG, J.; ZHANG, Y.; LIU, S.; LI, H.; LIU, S.; WANG, J.; QIN, X.; JIANG, X.; YANG, J.; ZHANG, C.; ZHANG, W. Melatonin attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm through the down-regulation of matrix metalloproteinases. **Oncotarget**, United States, vol. 8, no. 9, p. 14283–14293, Feb. 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15093>.

LAZARUS, B.; CHEN, Y.; WILSON, F. P.; SANG, Y.; CHANG, A. R.; CORESH, J.; GRAMS, M. E. Proton Pump Inhibitor Use and the Risk of Chronic Kidney Disease. **JAMA internal medicine**, United States, vol. 176, no. 2, p. 238–246, Feb. 2016. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.7193>.

LECLERC, P. C.; LANCTOT, P. M.; AUGER-MESSIER, M.; ESCHER, E.; LEDUC, R.; GUILLEMETTE, G. S -nitrosylation of cysteine 289 of the AT 1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. , p. 306–313, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706725>.

LEE, J. W.; LEE, D.-H.; PARK, J. K.; HAN, J. S. Sodium nitrite-derived nitric oxide protects rat testes against ischemia/reperfusion injury. **Asian journal of andrology**, China, Oct. 2018. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_76\\_18](https://doi.org/10.4103/aja.aja_76_18).

LEMARIE, C. A.; THARAUX, P.-L.; LEHOUX, S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. **Journal of molecular and cellular cardiology**, England, vol. 48, no. 3, p. 433–439, Mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.09.018>.

LIM, C. S.; SHALHOUB, J.; GOHEL, M. S.; SHEPHERD, A. C.; DAVIES, A. H. Matrix metalloproteinases in vascular disease--a potential therapeutic target? **Current vascular pharmacology**, United Arab Emirates, vol. 8, no. 1, p. 75–85, Jan. 2010. <https://doi.org/10.2174/157016110790226697>.

- LIPOPROTEIN, L.; CLAVREUL, N.; BACHSCHMID, M. M.; HOU, X.; SHI, C.; IDRIZOVIC, A.; IDO, Y.; PIMENTEL, D.; COHEN, R. A. S-Glutathiolation of p21ras by Peroxynitrite Mediates Endothelial Insulin Resistance Caused by Oxidized. , p. 2454–2461, 2006. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000242791.28953.4c>.
- LIU, L.; HAUSLADEN, A.; ZENG, M.; QUE, L.; HEITMAN, J.; STAMLER, J. S. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. **Nature**, England, vol. 410, no. 6827, p. 490–494, Mar. 2001. <https://doi.org/10.1038/35068596>.
- LIU, Limin; YAN, Y.; ZENG, M.; ZHANG, J.; HANES, M. A.; AHEARN, G.; MCMAHON, T. J.; DICKFELD, T.; MARSHALL, H. E.; QUE, L. G.; STAMLER, J. S. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. **Cell**, United States, vol. 116, no. 4, p. 617–628, Feb. 2004. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00131-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00131-x).
- LÓPEZ-SÁNCHEZ, L. M.; CORRALES, F. J.; GONZÁLEZ, R.; FERRÍN, G.; MUÑOZ-CASTAÑEDA, J. R.; RANCHAL, I.; HIDALGO, A. B.; BRICEÑO, J.; LÓPEZ-CILLERO, P.; GÓMEZ, M. A.; DE LA MATA, M.; MUNTANÉ, J.; RODRÍGUEZ-ARIZA, A. Alteration of S-nitrosothiol homeostasis and targets for protein S-nitrosation in human hepatocytes. **Proteomics**, Germany, vol. 8, no. 22, p. 4709–4720, Nov. 2008. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700313>.
- LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, England, vol. 7, no. 2, p. 156–167, Feb. 2008. <https://doi.org/10.1038/nrd2466>.
- MACARTHUR, P. H.; SHIVA, S.; GLADWIN, M. T. Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, Netherlands, vol. 851, no. 1–2, p. 93–105, May 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.012>.
- MAROZKINA, N. V.; WANG, X.-Q.; STSIAPURA, V.; FITZPATRICK, A.; CARRARO, S.; HAWKINS, G. A.; BLEECKER, E.; MEYERS, D.; JARJOUR, N.; FAIN, S. B.; WENZEL, S.; BUSSE, W.; CASTRO, M.; PANETTIERI, R. A. J.; MOORE, W.; LEWIS, S. J.; PALMER, L. A.; ALTES, T.; DE LANGE, E. E.; ... GASTON, B. Phenotype of asthmatics with increased airway S-nitrosoglutathione reductase activity. **The European respiratory journal**, England, vol. 45, no. 1, p. 87–97, Jan. 2015. <https://doi.org/10.1183/09031936.00042414>.
- MARTÍNEZ-RUIZ, A.; LAMAS, S. Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: Convergences and divergences. vol. 75, p. 220–228, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.016>.
- MESCHIARI, C. A.; PINHEIRO, L. C.; GUIMARAES, D. A.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Sodium nitrite attenuates MMP-9 production by endothelial cells and may explain similar effects of atorvastatin. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, Germany, vol. 389, no. 2, p. 223–231, Feb. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00210-015-1192-4>.
- METZGER, I. F.; SANDRIM, V. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Endogenous nitric oxide formation correlates negatively with circulating matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9

levels in black subjects. **Molecular and cellular biochemistry**, Netherlands, vol. 360, no. 1–2, p. 393–399, Jan. 2012. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1079-8>.

MO, L.; WANG, Y.; GEARY, L.; COREY, C.; ALEF, M. J.; BEER-STOLZ, D.; ZUCKERBRAUN, B. S.; SHIVA, S. Nitrite activates AMP kinase to stimulate mitochondrial biogenesis independent of soluble guanylate cyclase. **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 53, no. 7, p. 1440–1450, Oct. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.080>.

MONCADA, S. Nitric oxide. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, England, vol. 12, no. 10, p. S35-9, Dec. 1994.

MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; PINHEIRO, L. C.; SAKAMOTO, E. K.; FERREIRA, G. C.; REIS, R. I.; MARCAL, D. M. O.; PEREIRA, R. P.; TANUS-SANTOS, J. E. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 51, no. 1, p. 144–152, Jul. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.005>.

MONTENEGRO, M. F.; PINHEIRO, L. C.; AMARAL, J. H.; MARCAL, D. M. O.; PALEI, A. C. T.; COSTA-FILHO, A. J.; TANUS-SANTOS, J. E. Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, Germany, vol. 385, no. 5, p. 509–517, May 2012. <https://doi.org/10.1007/s00210-011-0712-0>.

MONTENEGRO, M. F.; SUNDQVIST, M. L.; LARSEN, F. J.; ZHUGE, Z.; CARLSTRÖM, M.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. Blood Pressure-Lowering Effect of Orally Ingested Nitrite Is Abolished by a Proton Pump Inhibitor. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, United States, vol. 69, no. 1, p. 23–31, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08081>.

MÜNZEL, T.; CAMICI, G. G.; MAACK, C.; BONETTI, N. R.; FUSTER, V.; KOVACIC, J. C. Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. **Journal of the American College of Cardiology**, United States, vol. 70, no. 2, p. 212–229, Jul. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.05.035>.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. vol. 69, p. 562–573, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>.

NIU, Y.-J.; ZHOU, D.; CUI, X.-S. S-nitrosoglutathione reductase maintains mitochondrial homeostasis by promoting clearance of damaged mitochondria in porcine preimplantation embryos. **Cell proliferation**, England, vol. 54, no. 3, p. e12990, Mar. 2021. <https://doi.org/10.1111/cpr.12990>.

NOGUEIRA, R. C.; PINHEIRO, L. C.; SANCHES-LOPES, J. M.; PARENTE, J. M.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; CONDE, S. O.; CASTRO, M. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Omeprazole induces vascular remodeling by mechanisms involving xanthine oxidoreductase and matrix metalloproteinase activation. **Biochemical pharmacology**, England, vol. 190, p. 114633, Aug. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114633>.

- OCHOA, D.; ROMÁN, M.; CABALEIRO, T.; SAIZ-RODRÍGUEZ, M.; MEJÍA, G.; ABAD-SANTOS, F. Effect of food on the pharmacokinetics of omeprazole, pantoprazole and rabeprazole. **BMC pharmacology & toxicology**, England, vol. 21, no. 1, p. 54, Jul. 2020. <https://doi.org/10.1186/s40360-020-00433-2>.
- OKAMOTO, T.; VALACCHI, G.; GOHIL, K.; AKAIKE, T.; VAN DER VLIET, A. S-nitrosothiols inhibit cytokine-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 in airway epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, vol. 27, no. 4, p. 463–473, 2002. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0039OC>.
- OLIVEIRA-PAULA, G. H.; TANUS-SANTOS, J. E. Nitrite-stimulated Gastric Formation of S-nitrosothiols As An Antihypertensive Therapeutic Strategy. **Current Drug Targets**, vol. 20, no. 4, p. 431–443, 2018. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180816120816>.
- PALMER, L. A.; DERONDE, K.; BROWN-STEINKE, K.; GUNTER, S.; JYOTHIKUMAR, V.; FORBES, M. S.; LEWIS, S. J. Hypoxia-induced changes in protein s-nitrosylation in female mouse brainstem. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, United States, vol. 52, no. 1, p. 37–45, Jan. 2015. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0359OC>.
- PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, England, vol. 333, no. 6174, p. 664–666, Jun. 1988. <https://doi.org/10.1038/333664a0>.
- PAPERS, J. B. C.; DOI, M.; OKAMOTO, T.; AKAIKE, T.; SAWA, T.; MIYAMOTO, Y.; VLIET, A. Van Der; MAEDA, H. Activation of Matrix Metalloproteinases by Peroxynitrite-induced Protein S -Glutathiolation via Disulfide S -Oxide Formation \*. vol. 276, no. 31, p. 29596–29602, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102417200>.
- PARK, M.; SANDNER, P.; KRIEG, T. cGMP at the centre of attention: emerging strategies for activating the cardioprotective PKG pathway. **Basic research in cardiology**, vol. 113, no. 4, p. 24, May 2018. <https://doi.org/10.1007/s00395-018-0679-9>.
- PINHEIRO, L. C.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; PORTELLA, R. L.; CERON, C. S.; MONTENEGRO, M. F.; TOLEDO, J. C. J.; TANUS-SANTOS, J. E. Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 87, p. 252–262, Oct. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.038>.
- PINHEIRO, L. C.; MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; OLIVEIRA, A. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Free Radical Biology and Medicine Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 53, no. 4, p. 701–709, 2012. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.001>.
- PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; FERREIRA, G. C.; DAL-CIN DE PAULA, T.; DUARTE, D. A.; COSTA-NETO, C. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II. **Redox biology**, Netherlands, vol. 38, p. 101769, Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101769>.

- PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; PORTELLA, R. L.; GUIMARÃES, D. A.; DE ANGELIS, C. D.; TANUS-SANTOS, J. E. Omeprazole impairs vascular redox biology and causes xanthine oxidoreductase-mediated endothelial dysfunction. **Redox Biology**, vol. 9, p. 134–143, 2016a. DOI 10.1016/j.redox.2016.08.001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.001>.
- PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; PORTELLA, R. L.; GUIMARÃES, D. A.; DE ANGELIS, C. D.; TANUS-SANTOS, J. E. Omeprazole impairs vascular redox biology and causes xanthine oxidoreductase-mediated endothelial dysfunction. **Redox Biology**, vol. 9, p. 134–143, 2016b. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.001>.
- PRADO, A. F.; BATISTA, R. I. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Matrix Metalloproteinases and Arterial Hypertension: Role of Oxidative Stress and Nitric Oxide in Vascular Functional and Structural Alterations. **Biomolecules**, Switzerland, vol. 11, no. 4, Apr. 2021. <https://doi.org/10.3390/biom11040585>.
- PRADO, A. F.; PERNOMIAN, L.; AZEVEDO, A.; COSTA, R. A. P.; RIZZI, E.; RAMOS, J.; PAES LEME, A. F.; BENDHACK, L. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Matrix metalloproteinase-2-induced epidermal growth factor receptor transactivation impairs redox balance in vascular smooth muscle cells and facilitates vascular contraction. **Redox biology**, Netherlands, vol. 18, p. 181–190, Sep. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.07.005>.
- RA, H.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. vol. 26, p. 587–596, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2007.07.001>.
- RAMSTE, M.; RITVOS, M.; HÄYRYNEN, S.; KIISKI, J. I.; NIEMI, M.; SINISALO, J. CYP2C19 loss-of-function alleles and use of omeprazole or esomeprazole increase the risk of cardiovascular outcomes in patients using clopidogrel. **Clinical and translational science**, United States, vol. 16, no. 10, p. 2010–2020, Oct. 2023. <https://doi.org/10.1111/cts.13608>.
- RIZZI, E.; AMARAL, J. H.; GUIMARÃES, D. A.; CONDE-TELLA, S. O.; PINHEIRO, L. C.; GERLACH, R. F.; CASTRO, M. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Nitrite treatment downregulates vascular MMP-2 activity and inhibits vascular remodeling in hypertension independently of its antihypertensive effects. **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 130, p. 234–243, Jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.002>.
- SANCHES-LOPES, J. M.; FERREIRA, G. C.; PINHEIRO, L. C.; KEMP, R.; TANUS-SANTOS, J. E. Consistent gastric pH-dependent effects of suppressors of gastric acid secretion on the antihypertensive responses to oral nitrite. **Biochemical pharmacology**, England, vol. 177, p. 113940, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113940>.
- SCHIFFRIN, E. L. Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, United States, vol. 59, no. 2, p. 367–374, Feb. 2012. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187021>.
- SELEMIDIS, S.; DUSTING, G. J.; PESHAVARIYA, H.; KEMP-HARPER, B. K.; DRUMMOND, G. R. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. **Cardiovascular research**, England, vol. 75,

no. 2, p. 349–358, Jul. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.030>.

SHI, X.; QIU, H. Post-Translational S-Nitrosylation of Proteins in Regulating Cardiac Oxidative Stress. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, Switzerland, vol. 9, no. 11, Oct. 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9111051>.

SHIH, Y.-W.; CHIEN, S.-T.; CHEN, P.-S.; LEE, J.-H.; WU, S.-H.; YIN, L.-T. Alpha-mangostin suppresses phorbol 12-myristate 13-acetate-induced MMP-2/MMP-9 expressions via alphavbeta3 integrin/FAK/ERK and NF-kappaB signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells. **Cell biochemistry and biophysics**, United States, vol. 58, no. 1, p. 31–44, Sep. 2010. <https://doi.org/10.1007/s12013-010-9091-2>.

SHIN, J. M.; KIM, N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. **Journal of neurogastroenterology and motility**, Korea (South), vol. 19, no. 1, p. 25–35, Jan. 2013. <https://doi.org/10.5056/jnm.2013.19.1.25>.

SPRNGMAN, E. B.; ANGLETON, E. L.; BIRKEDAL-HANSENT, H.; WART, H. E. V. A. N. Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase : Evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a " cysteine switch " mechanism for activation. vol. 87, no. January, p. 364–368, 1990. .

STOMBERSKI, C. T.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. **Antioxidants & redox signaling**, United States, vol. 30, no. 10, p. 1331–1351, Apr. 2019. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7403>.

TENOPOULOU, M.; DOULIAS, P.-T. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. **F1000Research**, vol. 9, 2020. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19998.1>.

VEH, J.; MANGOLD, C.; FELSEN, A.; LUDWIG, C.; GERSTNER, L.; REINHARDT, P.; SCHREZENMEIER, H.; FABRICIUS, D.; JAHRSDÖRFER, B. Phorbol-12-myristate-13-acetate is a potent enhancer of B cells with a granzyme B(+) regulatory phenotype. **Frontiers in immunology**, Switzerland, vol. 14, p. 1194880, 2023. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1194880>.

WINK, D. A.; NIMS, R. W.; DARBYSHIRE, J. F.; CHRISTODOULOU, D.; HANBAUER, I.; COX, G. W.; LAVAL, F.; LAVAL, J.; COOK, J. A.; KRISHNA, M. C. 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/O<sub>2</sub> reaction. **Chemical research in toxicology**, United States, vol. 7, no. 4, p. 519–525, 1994. .

WOO, J.-H.; LIM, J. H.; KIM, Y.-H.; SUH, S.-I.; MIN, D. S.; CHANG, J.-S.; LEE, Y. H.; PARK, J.-W.; KWON, T. K. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. **Oncogene**, England, vol. 23, no. 10, p. 1845–1853, Mar. 2004. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207307>.

- WU, X.; DU, L.; XU, X.; TAN, L.; LI, R. Increased nitrosogluthione reductase activity in hypoxic pulmonary hypertension in mice. **Journal of pharmacological sciences**, Japan, vol. 113, no. 1, p. 32–40, 2010. <https://doi.org/10.1254/jphs.09279fp>.
- YAMASHITA, A. M. S.; ANCILLOTTI, M. T. C.; RANGEL, L. P.; FONTENELE, M.; FIGUEIREDO-FREITAS, C.; POSSIDONIO, A. C.; SOARES, C. P.; SORENSON, M. M.; MERMELSTEIN, C.; NOGUEIRA, L. Balance between S-nitrosylation and denitrosylation modulates myoblast proliferation independently of soluble guanylyl cyclase activation. **American journal of physiology. Cell physiology**, United States, vol. 313, no. 1, p. C11–C26, Jul. 2017. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00140.2016>.