UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

CARLA FIAMA DE AZEVEDO MEDEIROS

**Avaliação do papel da xantina oxidoreductase
gastroentérica no efeito hipotensor do nitrito de sódio**

Ribeirão Preto-SP

2021

CARLA FIAMA DE AZEVEDO MEDEIROS

**Avaliação do papel da xantina oxidoreductase
gastroentérica no efeito hipotensor do nitrito de sódio**

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus Dos
Santos

Versão Corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações
da USP (BDTD).

**Ribeirão Preto-SP
2021**

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

Azevedo-Medeiros, Carla Fiama

Avaliação do papel da xantina oxidoreductase gastroentérica no efeito hipotensor do nitrito de sódio. Carla Fiama de Azevedo Medeiros; Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanusdos Santos. Ribeirão Preto, 2021. 65f.

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

1. Nitrito. 2. Xantina oxidoreductase 3. Nitrosotióis
4. Alopurinol

FOLHA DE APROVAÇÃO

AZEVEDO-MEDEIROS, C. F. **Avaliação do papel da xantina oxidoreductase gastroentérica no efeito hipotensor do nitrito de sódio.** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: José Eduardo Tanus dos Santos

Instituição: FMRP-USP

Assinatura:_____

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura:_____

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura:_____

*Á minha família, por todo
amor, dedicação e incentivo em
cada etapa e passo da minha
vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder coragem e boa vontade para vencer todos os desafios que apareceram ao longo dessa jornada. Pela minha saúde e da minha família, e principalmente por permitir ser rodeada de pessoas maravilhosas.

À minha amada mãe, Francesca Azevedo, por toda dedicação, amor e cuidado. Por todos os ensinamentos, pela amizade e confiança que conseguimos construir. Obrigada por nunca medir esforços para me ajudar e me fazer crescer. Todas as minhas conquistas também são suas, e eu espero poder retribuir tudo isso. Ao meu irmão, Jorge Tinoco, pelo amor, por acreditar em mim e me fazer querer melhorar sempre. À Francisco Oliveira, pelo pai que sempre foi. Ter a sua presença em sua vida fez toda a diferença e eu sou muito grata por sempre acreditar em meu potencial e não medir esforços para que eu pudesse estar aqui hoje e realizar cada sonho.

Aos meus tios, em especial minha tia e madrinha, Raimunda Azevedo por todo o carinho e cuidado de mãe. Você é um grande exemplo pra mim. E agradeço também a toda a minha família, pelo amor, união e cuidado que temos uns pelos outros.

Ao meu orientador, José Eduardo Tanus dos Santos, por todo o apoio para a realização desse trabalho, e por estar sempre estimulando o meu crescimento. Eu agradeço por confiar e acreditar sempre no meu potencial. Muito obrigada pela dedicação, atenção e ensinamentos.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Danielle Guimarães, Juliana Fernandes, Leevan Leite, Sandra Conde, Thaís Ribeiro, Tiago Dalcin, pelas trocas de conhecimento, pela convivência e ajuda durante todo esse período. Sou muito grata por todo o acolhimento. Muito obrigada aos membros que foram colaboradores desse trabalho pelo suporte e dedicação (Evandro, Indiara, Jéssica, Renato e Sandra).

Aos meus queridos e antigos amigos, Aran Carmo, Darlene Bezerra, Jaqueline Socorro e Mirelly Lima que sempre estiveram presentes em minha vida, tanto nos bons como nos momentos ruins. Obrigada por toda a amizade, paciência, amor e companheirismo. Acima de tudo muito obrigada por estarem sempre presentes apesar das distâncias e compartilharem a vida comigo. Aos amigos do ensino médio, Alana Cunha, Amanda Maciel, Katharine Hodel, Klinger Cruz, Leonardo Mattos, Maria Lemos, Mariana Nery, pelos momentos mais engraçados e felizes que passamos juntos.

À Samuel Camargo, por todo carinho, cuidado, atenção e pela linda amizade que conseguimos construir. Obrigada por estar ao meu lado nos melhores e nos momentos mais difíceis da minha vida. Que mesmo tão distante fisicamente se faz presente em minha vida todos os dias. Saudades de sua presença todas as manhãs, das nossas conversas, risadas e abraços.

Á Vanessa Borges, Eduardo Manzolli, Lilo e Lobinha, que foram por muito tempo a minha família em Ribeirão Preto. Especialmente á Vanessa pela amizade, cuidado e carinho, por todo o apoio que você me ofereceu em um momento tão difícil de transição. Acima de tudo pelo coração imenso que você tem, e por ser essa pessoa tão maravilhosa comigo. Saudades sempre da presença de vocês em meu dia a dia e dos nossos domingos em família.

Á Evandro Neves por toda a dedicação, cuidado e carinho durante todo esse período. Muito obrigada por ter me incentivado tanto, pelos ensinamentos e pelo grande apoio. Você foi essencial para desenvolvimento desse trabalho. Saudades das conversas e dos nossos cafés.

Aos meus queridos amigos, Jéssica Sanches, Renato Nogueira e Rose Batista pela linda amizade que cultivamos e por compartilharem comigo todas as alegrias, vitórias, angústias, frustrações desse período. Vocês foram essenciais para tornarem as coisas mais leves, especialmente nos dias mais difíceis. Não sei o que seria de mim sem vocês por perto. Obrigada por toda ajuda, incentivo, conselhos e especialmente pelas boas risadas. Gostaria de agradecer também a Indiara Vieira e a Grazielle Ferreira pelos bons momentos.

Aos colegas e profissionais do Departamento de Farmacologia. Especialmente a Gislaine Pedroso pela dedicação, orientação e por estar sempre disposta a nos ajudar. Agradeço também a Waldik Ramon por todo o suporte.

Sou muito grata por tudo e á todos que se fizeram presente nessa etapa da minha vida.

Á CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim, esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa, aquieta e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da alegria. E ainda mais no meio da tristeza. Todo o caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais, a gente levanta, a gente sobe, a gente volta”.

(João Guimarães Rosa em *“Grande Sertão Veredas”*, 1956).

RESUMO

AZEVEDO-MEDEIROS, C. F. **Avaliação do papel da xantina oxidoreductase gastroentérica no efeito hipotensor do nitrito de sódio**. 2021. 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

Os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio têm sido confirmados em vários estudos. Entretanto, os mecanismos bioquímicos responsáveis por esses efeitos benéficos ainda não estão completamente esclarecidos. Vias enzimáticas são apontadas como capazes de promover a redução do nitrito a NO. Por exemplo, durante situação de hipóxia e baixo pH a Xantina Oxidoreductase (XOR), converte nitrito a NO que pode e pode estar envolvida no efeito anti-hipertensivo exercido pelo nitrito. Diante disso, o objetivo do presente estudo é avaliar e comparar o efeito da administração de nitrito de sódio em diferentes porções do trato gastrointestinal, bem como investigar se esses efeitos seriam dependentes da distribuição da XOR nesses tecidos. Para isso, ratos wistar foram inicialmente pré-tratados com veículo ou alopurinol, e submetidos a um procedimento cirúrgico para avaliação da pressão arterial média e da participação da XOR. Hipertensão foi induzida pela administração de 60mg/kg do inibidor de NO sintases (L-NAME). Em seguida, foi realizada uma curva dose-resposta com as doses de 1, 5 e 15mg/kg de nitrito de sódio ou volume correspondente de veículo, para avaliar os efeitos do nitrito nas três porções do trato gastrointestinal (gástrica, entérica proximal e entérica distal). Ao final do protocolo, foram coletados os plasmas para análises bioquímicas. Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que o nitrito de sódio, surpreendentemente, produziu efeito hipotensor muito mais pronunciado na via entérica proximal do que nas vias entérica distal e gástrica. Possivelmente, esse efeito hipotensor mais pronunciado, se deva

aos níveis mais elevados de nitrito e S-nitrosotióis plasmáticos, em comparação aos outros grupos. O pré-tratamento com o alopurinol foi capaz de abolir o efeito hipotensor do nitrito na via gástrica, porém, na via entérica proximal e distal o alopurinol não foi capaz de reduzir significativamente o efeito do nitrito. Isto sugere que a XOR, embora esteja mais expressa no intestino delgado proximal, não seja relevante para desempenhar os efeitos do nitrito. Já os resultados após o pré-tratamento com o alopurinol, sugerem que a XOR seja fundamental para os efeitos do nitrito no estômago. Ao avaliar a atividade da XOR nos três tecidos, verificou-se que há uma atividade muito mais elevada dessa enzima na porção proximal do intestino delgado, seguida da porção distal, em comparação ao estômago; e que na presença do alopurinol essa atividade foi reduzida aproximadamente pela metade em todos os tecidos avaliados. Concluímos haver participação diferenciada entre os órgãos digestivos altos com relação aos efeitos do nitrito.

Palavras-chave: Nitrito, xantina oxidoreductase, nitrosotióis, alopurinol.

ABSTRACT

AZEVEDO-MEDEIROS, C. F. Evaluation of the role of gastroenteric xanthine oxidoreductase in the hypotensive effect of sodium nitrite. 2021. 65f. Dissertação (Mestrado) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, 2021.

The antihypertensive effects of sodium nitrite have been confirmed in several studies. However, the biochemical mechanisms responsible for these beneficial effects are still not completely understood. Enzymatic pathways are identified as capable of promoting the reduction of nitrite to NO. For example, during hypoxia and low pH, Xanthine Oxidoreductase (XOR) converts nitrite to NO which can and may be involved in the antihypertensive effect exerted by nitrite. Therefore, the aim of the present study is to evaluate and compare the effect of the administration of sodium nitrite in different portions of the gastrointestinal tract, as well as to investigate whether these effects would be dependent on the distribution of XOR in these tissues. For this, Wistar rats were initially pretreated with a vehicle or allopurinol, and underwent a surgical procedure to assess mean arterial pressure and XOR participation. Hypertension was induced by the administration of 60mg/kg of NO synthases inhibitor (L-NAME). Then, a dose-response curve was performed with the doses of 1, 5 and 15mg/kg of sodium nitrite or corresponding volume of vehicle, to evaluate the effects of nitrite in the three portions of the gastrointestinal tract (gastric, enteric proximal and enteric distal). At the end of the protocol, plasma samples were collected for biochemical analysis. The results obtained in this work show that sodium nitrite surprisingly produced an antihypertensive effect much more pronounced in the proximal enteric route than in the distal and gastric enteric routes. Possibly, this more pronounced hypotensive effect is due to the higher levels of nitrite and plasma S-nitrosothiols concentrations as compared to the other groups.

Pretreatment with allopurinol was able to abolish the hypotensive effect of nitrite in the gastric route. However, in the proximal and distal enteric route, allopurinol was not able to significantly reduce the effect of nitrite. These results suggest that XOR, although more expressed in the proximal small intestine, is not relevant to the effects of nitrite. The results after pre-treatment with allopurinol, on the other hand, suggest that XOR is fundamental for the effects of nitrite in the stomach. When evaluating the activity of XOR in the three tissues, it was found that there is a much higher activity of this enzyme in the proximal portion of the small intestine, followed by the distal portion, compared to the stomach; and that in the presence of allopurinol, this activity was reduced by approximately half in all evaluated tissues. We conclude that there is a differentiated participation between the upper digestive organs in relation to the effects of nitrite.

Keywords: Nitrite, xanthine oxidoreductase, nitrosothiols, allopurinol.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 O ciclo entero-salivar do nitrato. Adaptado de Lundberg et al. 2008.....	22
Figura 2 Estrutura e atividade nitrito redutase da XOR. Adaptado de Cantu-Medellin; Kelley. 2013.	27
Figura 3 Ilustração (A) dos grupos experimentais e (B) do protocolo experimental. .	35
Figura 4 Efeito da administração aguda do veículo (◇) ou nitrito de sódio no estômago (▲), intestino delgado proximal (●) e intestino delgado distal (■) de ratos anestesiados.	41
Figura 5 Comparação do efeito da administração aguda do veículo (◇) ou nitrito de sódio no estômago (▲), intestino delgado proximal (●) e intestino delgado distal (■) de ratos pré-tratados com veículo ou com alopurinol (△○□).	43
Figura 6 Atividade e expressão da xantina oxidoreductase no estômago, intestino delgado proximal e intestino delgado distal de ratos controle.....	44
Figura 7 Atividade da XOR em diferentes porções do trato gastrointestinal de ratos tratado com nitrito.	45
Figura 8 Avaliação do pH do estômago de ratos pré-tratados com veículo ou alopurinol.	46
Figura 9 Alteração das concentrações de nitrito e nitrato plasmático após o tratamento agudo com nitrito de sódio ou veículo..	47
Figura 10 Concentrações de espécies nitrosiladas totais (RXNO), nitrosotióis (RSNO) e nitrosaminas (RNNO) no plasma de ratos submetidos ao tratamento agudo com nitrito de sódio ou veículo.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – análise de variância

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EPM – erro padrão da média

EROS – espécies reativas de oxigênio

GCs – guanilil ciclase solúvel

GMPc – guanosina monofosfato cíclica

GMPc – monofosfato de guanosina cíclico

GTP – guanosina trifosfato

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

HNO₂ – ácido nitroso

IBPs – inibidores da bomba de prótons

iNOS – óxido nítrico sintase induzida

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

NEM – N-etilmaleimida

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

O₂⁻ – superóxido

ONOO⁻ – peroxinitrito

PAM – pressão arterial média

PBS – tampão fosfato salino

PKG – proteína quinase depende de GMPc

RPM – rotações por minutos

RSNO – resíduos S-nitrosilados

RXNO – espécies nitros(il)adas

XDH – xantina desidrogenase

XO – xantina oxidase

XOR – xantina oxidoreductase

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Hipertensão arterial sistêmica: Epidemiologia e fatores de risco	19
1.2. Óxido Nítrico: Síntese e papel na homeostase vascular	20
1.3. Síntese de NO por uma via independente da NOS: Via nitrato-nitrito-NO	21
1.4. Efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio	23
1.5. Conversão enzimáticas de nitrito a NO	Erro! Indicador não definido.
1.6. Xantina oxidoretutase e sua atividade nitrito-redutase	24
1. HIPÓTESE	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Geral	31
2.2. Específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Animais	33
3.2. Avaliação da pressão arterial invasiva	33
3.3. Hipertensão Arterial Aguda Induzida por L-NAME	33
3.4. Protocolo experimental: Avaliação dos efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio durante hipertensão arterial induzida por L-NAME	34
3.5. Aferição do pH gástrico	35
3.6. Determinação das concentrações plasmáticas de nitrato	36
3.7. Determinação das concentrações plasmáticas de nitrito e espécies nitrosiladas	36
3.8. Western-blotting	37
3.9. Ensaio de Atividade Enzimática da XOR	37
3.10. ANÁLISE DOS RESULTADOS	38
4. RESULTADOS	40
4.1. Efeito da administração aguda de nitrito de sódio sobre a pressão arterial média	40
4.2. Comparação do efeito da administração aguda de nitrito de sódio sobre a pressão arterial média em ratos pré-tratados com alopurinol	42
4.3. Atividade e expressão da XOR em diferentes porções do trato gastrointestinal	43
4.4. Avaliação do pH do estômago de ratos pré-tratados com veículo ou alopurinol	46
4.5. Aumento das concentrações de nitrito e nitrato plasmático após o tratamento agudo com nitrito de sódio	46

4.6. Aumento de espécies nitrosiladas totais (RXNO), nitrosotióis (RSNO) e nitrosaminas (RNNO) no plasma de ratos submetidos ao tratamento agudo com nitrito de sódio	47
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão arterial sistêmica: Epidemiologia e fatores de risco

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica, de alta prevalência no mundo, sendo um dos principais fatores associados ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV) (World Health Organization 2017). De origem e caráter multifatorial, a HAS é caracterizada por valores elevados e sustentados de pressão arterial (Malachias *et al.* 2016) e clinicamente definida pela apresentação de valores da pressão arterial sistólica igual ou acima de 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica igual ou acima 90 mmHg (Williams *et al.* 2018).

A HAS pode ser classificada como primária ou essencial e secundária. A hipertensão secundária acomete entre 5-10% dos casos e há uma causa definida, como uma doença renal ou endócrina, e ainda uso de medicamentos como agentes imunossupressores, anti-inflamatórios não esteroidais, dentre outros (Mulvany 2012). Já a hipertensão do tipo essencial, acomete cerca de 90-95% dos casos, e suas causas não são bem definidas (MULVANY, 2011).

Estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram de DCV em 2016 e que mais de 1,13 bilhões de pessoas no mundo sofrem com pressão arterial elevada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No Brasil, cerca de 32,5% da população adulta possui hipertensão arterial, e mais de 60% dos idosos. Diversos fatores de riscos estão associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a HAS, dentre eles: idade, sexo, etnia, obesidade, sedentarismo, excesso do consumo de álcool e ingestão de sal, além de fatores genéticos e socioeconômicos (Malachias *et al.* 2016).

A HAS está associada a diversos fatores, dentre eles podemos destacar a redução da produção e da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). Dessa, forma, o

NO exerce um papel fundamental no controle da função vascular e da pressão arterial (Ignarro *et al.* 1987; Lundberg *et al.* 2015).

1.2. Óxido Nítrico: Síntese e papel na homeostase vascular

O NO é considerado um importante mediador endógeno vasoativo, porém seu papel e importância biológica permaneceram por muito tempo desconhecidos. Foi então na década de 1980 que essa molécula foi descoberta como fator relaxante do endotélio e demonstrado seu papel fundamental no controle do tônus vascular e regulação da pressão arterial (Cooke, MD & Dzau, MD 1997; Furchgott & Zawadski 1980; Ignarro *et al.* 1987; Palmer *et al.* 1987). Na via clássica de formação, o NO é sintetizado a partir da L-arginina pela ação de uma família de enzimas, as NO sintases (NOS) (Epstein *et al.* 1993; van Faassen *et al.* 2009). As NOS são encontradas em três isoformas diferentes: a neuronal (nNOS), induzida (iNOS) e a endotelial (eNOS) (Epstein *et al.* 1993)

Em um vaso sanguíneo saudável, em resposta ao aumento das concentrações intracelulares de Ca^{2+} decorrente do estresse de cisalhamento ou fluxo sanguíneo, há a ativação da eNOS levando a formação de NO e L- citrulina a partir de L- arginina, no endotélio. Para que essa síntese ocorra, além de utilizar a L-arginina como substrato, a eNOS precisa da presença de O_2 , e dos cofatores NADPH e tetrahidrobiopterina reduzida (BH_4). O NO se difunde para as células musculares lisas vasculares e se ligar ao heme reduzido (Fe^{2+}) da guanilil ciclase solúvel (GCs), ativando essa enzima. Um vez ativada, cataliza a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), que por sua vez vai ativar a proteína quinase dependente de GMPc (PKG). A PKG, por sua vez, por diferentes

mecanismos, diminui a concentração de cálcio intracelular levando a vasodilatação (Farah *et al.* 2018; Lundberg *et al.* 2015).

Diversos estudos relatam a deficiência de NO no quadro clínico da hipertensão arterial devido a redução da sua síntese e biodisponibilidade (Gkaliagkousi *et al.* 2009). A disfunção endotelial é encontrada em diversas doenças cardiovasculares. Nesse processo ocorre a redução da formação e biodisponibilidade de NO, causada pelo estresse oxidativo, desacoplamento da eNOS, e também pelo aumento do dimetilarginina assimétrica (ADMA) que é um inibidor endógeno da NOS, dentre outros fatores. Quando o cofator BH₄ é oxidado a dihidrobiopterina (BH₂), a eNOS se desacopla e ao em vez de produzir NO, ela gera superóxido (O₂⁻), que por sua vez reage com NO gerando peroxinitrito (ONOO⁻), limitando ainda mais a biodisponibilidade de NO. Além disso, as espécies reativas de oxigênio formadas podem oxidar o grupo heme em GCs (Fe²⁺→Fe³⁺), tornando-o insensível à ativação por NO (Farah *et al.* 2018; Lundberg *et al.* 2015).

Dessa forma, cada vez mais têm sido buscadas estratégias farmacológicas capazes de restabelecer as vias de síntese do NO.

1.3. Síntese de NO por uma via independente da NOS: Via nitrato-nitrito-NO

Durante algum tempo, os metabólitos formados a partir da oxidação do NO eram considerados inertes, porém, evidências mostram que os ânions nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) podem ser endogenamente reciclados a NO por meio de uma via alternativa, denominada de nitrato-nitrito-NO (Gladwin *et al.* 2005; Lundberg *et al.* 1994). Nessa via, esquematizada na Figura 1, o nitrato que advém da dieta é rapidamente absorvido no trato gastrointestinal, e uma vez na circulação, parte desse nitrato circulante é excretado na urina e em torno de 25% é reabsorvido e

concentrado nas glândulas salivares (Lundberg & Govoni 2004). O nitrato é então secretado na cavidade oral e reduzido a nitrito por meio da ação de enzimas nitrato redutases, de bactérias comensais. Em seguida, esse nitrito é deglutido e ao entrar em contato com o meio ácido do estômago sofre uma redução e são formados NO e outras espécies nitrosantes (Lundberg *et al.* 1994). No intestino, o nitrato e nitrito restante são absorvidos, chegam a circulação e por meio da ação de redutases são convertidos a NO no sangue e nos tecidos (Gladwin *et al.* 2005; Lundberg *et al.* 2008b).

Figura 1 O ciclo entero-salivar do nitrato. O nitrato é absorvido no intestino delgado, e uma vez na circulação, parte desse nitrato circulante é reabsorvido e concentrado nas glândulas salivares. Na cavidade oral é reduzido a nitrito por meio da ação de enzimas nitrato redutases, de bactérias comensais. No estômago, ao entrar em contato com o meio ácido do estômago sofre uma redução e são formados NO e outras espécies nitrosantes. O nitrito, por meio da ação de nitrito redutases, pode ser convertidos a NO no sangue e nos tecidos. Adaptado de Lundberg *et al.* 2008.

Diversos estudos demonstraram a importância do ambiente ácido do estômago para a formação de NO e espécies nitrosantes a partir do nitrito. Como abordado

anteriormente, na cavidade oral o nitrato é convertido a nitrito, e ao ser deglutido e entrar em contato com o ambiente ácido do estômago, ocorre a formação de ácido nitroso (HNO_2). O HNO_2 , por sua vez se decompõe e são formadas espécies bioativas de nitrogênio, especialmente o NO^+ e N_2O_3 (Richardson *et al.* 2002). Estas espécies nitrosantes, estão envolvidas na formação de nitrosotióis por serem potentes agentes nitrosantes, com capacidade de reagir com grupos tiólicos de cisteínas, atacando o ânion tiolato reduzido (RS^-) formando o produto S-nitrosilado e nitrito (Björne *et al.* 2005; Broniowska & Hogg 2012; Wink *et al.* 1994).

1.4. Efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio

Ao longo dos últimos anos, estudos sugerem que o nitrito de sódio tem potencial terapêutico para o tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo a HAS (Lundberg & Weitzberg 2010). O efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio tem sido descrito em diferentes modelos experimentais, entre eles, modelos de hipertensão induzidos em ratos (Amaral *et al.* 2013; Kanematsu *et al.* 2008; Montenegro *et al.* 2011; Pinheiro *et al.* 2012a). Podemos destacar o modelo de hipertensão induzida por L-NAME (L-nitro-arginina-metil-éster), que ao inibir de forma não seletiva as NO sintases (NOS), induz a hipertensão por inibir a síntese de óxido nítrico. Nesse modelo, alguns trabalhos demonstraram que a administração de doses crescentes de nitrito de sódio foi capaz de promover uma redução da pressão arterial dos ratos hipertensos (Amaral *et al.* 2013; Montenegro *et al.* 2014; Pinheiro *et al.* 2012a).

Adicionalmente, os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio têm sido associados à produção endógena de nitrosotióis. No seguinte estudo, observou-se que o tratamento oral com nitrito de sódio pode formar NO e espécies nitrosiladas, principalmente S-nitrosotióis, que podem explicar em parte os efeitos anti-

hipertensivo do nitrito de sódio (Pinheiro *et al.* 2015; Sanches-Lopes *et al.* 2020). Ademais, também foi demonstrado uma melhora na função cardíaca de ratos hipertensos, após o tratamento com nitrito, associado ao aumento de nitrosotiois (Neto-Neves *et al.* 2019)

Entretanto, os mecanismos por meio dos quais o nitrito produz esse efeito benéfico durante a hipertensão ainda não estão completamente esclarecidos. Tem sido demonstrado o papel do pH ácido do estômago na conversão do nitrito a NO e formação de espécies nitrosiladas, principalmente S-nitrosotiois, que podem atuar diretamente como doadores de NO ou exercer seus efeitos pela S-nitrosilação. Essa sugestão é fundamentada em estudo mostrando que o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio foi consideravelmente reduzido, devido ao aumento do pH gástrico induzido por inibidor de bomba de prótons (IBP), o omeprazol (Benjamin *et al.* 1994; Lundberg *et al.* 1994).

1.5. Xantina oxidoreductase e sua atividade nitrito-redutase

O nitrito que é gerado a partir da redução do nitrato no ciclo entero-salivar e também pela oxidação do NO endógeno, no sangue e nos tecidos, contribui, por meio da conversão em NO, para a regulação do fluxo sanguíneo e da pressão arterial (Lundberg *et al.* 2008a). Diversos trabalhos apontam o papel de vias enzimáticas na bioativação do nitrito. Estudos sugerem que enzimas são capazes de promover a redução do nitrito a NO, a exemplo da deoxihemoglobina, mioglobina, xantina oxidoreductase, aldeído oxidase, e que estas por sua vez estão envolvidas no efeito anti-hipertensivo e vasodilatador promovido pelo nitrito (Lundberg *et al.* 2009; van Faassen *et al.* 2009; Weitzberg *et al.* 2010).

Um dos primeiros trabalhos que aborda a atividade nitrito redutase da XOR, mostrou, por meio de um protocolo por quimioluminescência de ozônio em um analisador de NO, que em um ambiente em hipóxia havia a produção de NO na presença da XOR e de NADH (Millar *et al.* 1998). E a partir dessa descoberta foram realizados diversos estudos com o intuito de elucidar os mecanismos por trás dessa atividade.

Alguns estudos vêm mostrando a participação da XOR nos efeitos promovidos pelo nitrito de sódio. Foi avaliado o efeito agudo do nitrito na presença de oxypurinol (inibidor da XOR) em ratos não anestesiados com hipertensão induzida por L-NAME. Nesse trabalho realizaram a infusão de nitrito em diferentes doses e observou-se que na presença do oxypurinol esse efeito é reduzido significativamente em todas as doses testadas (Montenegro *et al.* 2014). Já em anéis de aorta de ratos hipertensos, verificou-se que o relaxamento vascular induzido pelo nitrito foi significativamente atenuado, quando os anéis foram pré-incubados com o oxypurinol (Oliveira-Paula *et al.* 2016).

A XOR é uma molibdoflavina, responsável por catalisar as reações de degradação de purinas, oxidando a hipoxantina a xantina e em seqüência, a xantina em ácido úrico. Essa enzima possui duas isoformas intermutáveis: a xantina desidrogenase (XDH), que é expressa primariamente, e usa como substrato anicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada (NAD⁺), e a xantina oxidase (XO) que usa o oxigênio (O₂) como substrato (Cantu-Medellin & Kelley 2013; Hille *et al.* 2011).

Como mostrado na Figura 2, em sua estrutura são encontrados quatro centros redox: um cofator molibdênio (Mo-co), onde ocorre a redução das purinas; um cofatorflavina adenina dinucleotídeo (FAD), no qual ocorre a redução do NAD⁺ e do O₂; e um domínio com dois grupos ferredoxina 2Fe-2S, onde ocorre o fluxo dos

elétrons entre o Mo-co e o FAD (Cantu-Medellin & Kelley 2013). Em condições de normóxia, pH elevado e baixas concentrações de NADH, a XDH converte a xantina em ácido úrico, no cofator molibdênio em estado oxidado, utilizando o O_2 como doador de elétrons. Além disso, como subprodutos desta reação são formados espécies reativas de oxigênio (EROs): superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Cantu-Medellin & Kelley 2013). No entanto, a XDH pode ser convertida a XO de forma irreversível por proteólise, devido a condições inflamatórias, hipóxia, ou de forma reversível pela oxidação dos grupos tiois nos resíduos de cisteína no Mo-co e FAD (Battelli *et al.* 2016a). Portanto, em condições de pH elevado, hipóxia e níveis elevados de NADPH o fator molibidênio em estado reduzido tem sua afinidade por nitrito aumentada e passa a reduzir o nitrito em NO utilizando o NADPH como doador de elétrons, reduzindo as quantidades de EROs formadas (Cantu-Medellin & Kelley 2013).

Estudos realizados em roedores mostram evidências de que a XOR está mais expressa na porção proximal, o duodeno, em comparação a porção distal do que no jejuno, do intestino delgado (Kurosaki *et al.* 1995; Mohamedali *et al.* 1993; Yun *et al.* 2017).

Figura 2 Estrutura e atividade nitrito redutase da XOR. Em condições específicas de queda de pH, hipóxia e elevação dos níveis celulares de NADH, a XOR tem sua afinidade por nitrito aumentada. A medida em que essas alterações ocorrem, é criando um ambiente onde o Mo-co assume um estado mais reduzido. Nessas condições o NO_2^- passa a competir efetivamente por elétrons no Mo-co e ser reduzido a NO. Adaptado de Cantu-Medellin; Kelley. 2013.

HIPÓTESE

1. HIPÓTESE

Baseado no exposto acima, a hipótese do estudo é que o nitrito de sódio exerce diferentes níveis de efeito anti-hipertensivo quando administrado em diferentes porções do trato gastrointestinal, e que estes efeitos são dependentes da distribuição da XOR nesses tecidos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar e comparar o efeito hipotensor do nitrito de sódio nas três diferentes porções do trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado proximal e intestino delgado distal) e a possível participação da XOR nesses efeitos.

2.2. Específicos

2.2.1. Comparar o efeito hipotensor do nitrito de sódio administrado no estômago ou entericamente na porção proximal ou distal do intestino delgado de ratos hipertensos anestesiados.

2.2.2. Comparar o efeito hipotensor do nitrito de sódio administrado no estômago ou entericamente na porção proximal ou distal do intestino delgado, de ratos hipertensos anestesiados, pré-tratados com o inibidor da XOR, alopurinol.

2.2.3. Avaliar o pH do estômago de ratos pré-tratados com veículo ou alopurinol.

2.2.4. Avaliar a expressão e a atividade da XOR em amostras de tecido de estômago, intestino delgado proximal e distal de ratos controles e hipertensos, tratados veículo e pré-tratados com alopurinol.

2.2.5. Avaliar as concentrações de nitrato, nitrito e S-nitrosotióis em amostras de plasma de ratos hipertensos, tratados com nitrito de sódio ou veículo e pré-tratados com alopurinol.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade Estadual de São Paulo, sob número de protocolo 0213/2019. Para a realização dos protocolos experimentais foram utilizados ratos Wistar machos (280–350 gramas), provenientes da ANILAB Animais de Laboratório- Paulínea – SP, os quais foram mantidos em caixas sob condições controladas de temperatura (22 a 25 °C), em ciclo claro/escuro de 12 horas com acesso livre a ração e água.

3.2. Avaliação da pressão arterial invasiva

Os animais foram anestesiados com uretana (1,2-g/kg, i.p.) (Guimarães *et al.* 2019; Underwood *et al.* 2019), e submetidos a um procedimento cirúrgico e para canulação da artéria carótida esquerda e aquisição dos registros de pressão arterial de forma invasiva. Um catéter de polietileno (PE-50) foi implantado e fixado na artéria, e conectado a um transdutor de pressão arterial (ADInstruments), cujo sinal foi amplificado e registrado através de um sistema de aquisição de dados (PowerLab 8/35), possibilitando a monitoração da pressão arterial continuamente.

3.3. Hipertensão Arterial Aguda Induzida por L-NAME

O efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio foi avaliado em um modelo experimental de hipertensão aguda induzida pelo L-NAME. O L-NAME induz a hipertensão por inibir as NOS e reduzir a síntese de NO (Cooke, MD & Dzau, MD 1997). Um catéter de polietileno (PE-60) foi implantado e fixado na veia jugular interna esquerda para administração do L-NAME (60mg/kg, i.v.). A dose de L-NAME

foi escolhida de acordo com ensaios previamente realizados no laboratório, que mostraram que essa dose é efetiva na indução e manutenção dos níveis pressóricos elevados ao longo do protocolo experimental.

3.4. Protocolo experimental: Avaliação dos efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio durante hipertensão arterial induzida por L-NAME

Nesse protocolo avaliamos se o tratamento agudo com nitrito de sódio poderia atenuar o aumento da pressão arterial de ratos induzida por L-NAME. O tratamento com o nitrito foi administrado via cateter, posicionado em três diferentes segmentos do trato gastrointestinal (estômago, duodeno e jejuno). Os ratos foram divididos randomicamente nos grupos apresentados na Figura 3, painel A. Após a realização do procedimento cirúrgico, os ratos foram submetidos a um período de estabilização (10min) para a obtenção dos valores pressóricos basais. Após 15 minutos a hipertensão foi induzida pelo L-NAME. Logo após, foi realizada uma curva dose-resposta nas doses de 1, 5 e 15 mg/kg de nitrito de sódio ou veículo com intervalos de 10 minutos entre as doses (Fig. 3B). Além disso, para avaliar a participação da XOR no efeito hipotensor do nitrito de sódio, realizamos os mesmos protocolos em animais que foram pré-tratados com um inibidor da XOR, o alopurinol. Os animais receberam duas doses de alopurinol (100mg/kg, por gavagem). A primeira administração foi realizada 18h antes da realização do protocolo experimental, e a segunda, 2h antes do início do experimento. Em seguida, os mesmos protocolos foram realizados de acordo com o grupo de tratamento. No fim da administração das três doses de nitrito de sódio, os animais foram eutanasiados, e realizada a coleta do sangue venoso e amostras de tecido (estômago, intestino delgado proximal e distal) para a realização das análises bioquímicas. As doses de nitrito de sódio foram

escolhidas conforme ensaios previamente realizados em nosso laboratório, que mostraram que a maior dose administrada de nitrito de sódio (15mg/kg) produz expressivo efeito hipotensor (Montenegro *et al.* 2012; Pinheiro *et al.* 2015).

Figura 3 Ilustração (A) dos grupos experimentais e (B) do protocolo experimental.

3.5. Aferição do pH gástrico

Com o objetivo de avaliar se o pré-tratamento com alopurinol é capaz de alterar o pH estomacal dos ratos submetidos, foi realizada a aferição do pH de ratos pré-tratados com com veículo ou alopurinol. Foi utilizado um medidor de pH (Jenway,

3510) previamente calibrado e seu eletrodo foi inserido diretamente no lúmen do estômago dos ratos enquanto anestesiados.

3.6. Determinação das concentrações plasmáticas de nitrato

Para quantificação de nitrato, as amostras foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio (Laver *et al.* 2008). 20 µl de amostra do plasma foram injetadas, em duplicatas em sistema fechado contendo solução ácida de cloreto de vanádio (63mM) a 95°C. O nitrato presente na amostra sofre uma redução a NO que é conduzido pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (Sievers 280i). O NO formado reage com o ozônio resultando em quimiluminescência, ou seja, quanto mais é formado NO, maior a intensidade da quimiluminescência. Os dados obtidos foram analisados pelo programa OriginPro 8.5.

3.7. Determinação das concentrações plasmáticas de nitrito e espécies nitrosiladas

Para realizar a quantificação de nitrito e espécies nitrosiladas, as amostras também foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio (MacArthur *et al.* 2007; Pelletier *et al.* 2006). 20 µl de amostra do plasma foram injetadas, em duplicatas, em solução redutora de triiodeto (67mM Iodeto de potássio e 30mM Iodo em ácido acético glacial). O nitrito da amostra é reduzido a NO que é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (EcoMedics CLD 88sp). Já para as dosagens de espécies nitrosiladas, os plasmas foram aliquotados (450 µl) em 2 microtubos âmbar. No primeiro tubo a solução de sulfanilamida (5% em HCl 1M) foi adicionada à amostra na proporção de 10% do volume final da solução. Após 3 minutos de reação 400 µl da amostra foi injetada em um sistema

fechado contendo solução de triiodeto acidificado (PELLETIER et al., 2006). No segundo tubo âmbar contendo a amostra foi adicionado a solução de HgCl_2 (2%), aguardando 2 min seguido da adição de sulfanilamida ácida (5% em HCl 1M). Após mais 3 min, 400 μl da amostra foi injetada como descrito anteriormente. As espécies nitrosadas da amostra são reduzidas a NO que é carreado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (EcoMedics CLD 88sp). A aquisição dos dados, bem como as análises, foram realizadas através do software eDAQ Chart.

3.8. Western-blotting

Para avaliação dos níveis de expressão da XOR no intestino e no estômago, as amostras desses tecidos foram lisadas em tampão RIPA na presença de inibidor de proteases. O método de Bradford foi utilizado para a dosagem da concentração de proteínas. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% e após a corrida, os géis passaram por transferência úmida durante 1h e 30 minutos. Após a transferência, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-XOR (Abcam, ab231316; 1:500) e anti- β -actina (Sigma, MAB1501; 1:4000). A incubação foi realizada overnight (aproximadamente 16h) em agitação vertical e sob refrigeração (4° C). Após o período de incubação, as membranas foram lavadas com TBST e em seguida incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit (XOR) e anti-mouse (β actina). Após a segunda incubação, as membranas foram lavadas para então serem reveladas por quimiluminescência. A densitometria das bandas foi quantificada com auxílio do programa ImageJ.

3.9. Ensaio de Atividade Enzimática da XOR

A atividade da XOR, no estômago e nos intestinos proximal e distal dos ratos hipertensos e controle, foi avaliada por fluorimetria utilizando o kit de ensaio Amplex® RedXanthine/Xanthine Oxidase. No ensaio, a xantina oxidase catalisa a oxidação da xantina, em ácido úrico e superóxido (O_2^-). O superóxido degrada-se espontaneamente em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez reage com HRP para gerar o produto de oxidação vermelho-fluorescente, resorufin. A fluorescência produzida pelo resorufin é proporcional à atividade da XOR na amostra (Meijer *et al.* 2018).

3.10. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados foram representados em Média $\pm$ EPM. Os resultados da PAM e FC foram analisados pela análise de variância de duas vias (TWO WAY-ANOVA), seguida da análise de múltiplas comparações de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPadPrim8. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes o valor de probabilidade menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da administração aguda de nitrito de sódio sobre a pressão arterial média

A fim de observar os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio, em diferentes porções do trato gastrointestinal, foi induzida uma hipertensão arterial aguda com o agente L-NAME. Os valores médios da pressão arterial média (PAM) são semelhantes, em todos os grupos experimentais, no período basal (BL) de avaliação da pressão ($p > 0,05$; Fig 4A). A administração de L-NAME, produziu um aumento dos níveis pressóricos, sem diferenças entre os grupos, e esse aumento foi mantido durante todo o protocolo nos ratos que receberam veículo ($p < 0,05$; Fig 4A). O nitrito de sódio na dose de 1mg/kg, foi capaz de promover uma redução significativa da PAM apenas ao ser administrado no intestino delgado proximal ($p < 0,05$; Fig 4A). Já nas doses de 5 e 15 mg/kg de nitrito de sódio é possível observar que houve uma redução significativa em todas as vias de administração, porém na via entérica proximal essa redução da PAM foi maior em comparação com as vias entérica distal e gástrica. Os deltas calculados da PAM (diferença entre a pressão obtida após cada dose de nitrito e a pressão obtida após o tratamento com o L-NAME) nas doses de 1, 5 e 15mg/kg foram respectivamente de -0.44 ± 0.45 , -0.68 ± 0.82 e -2.48 ± 1.01 no grupo veículo, -8.78 ± 2.32 , -21.25 ± 5.90 , -39.05 ± 5.59 no grupo gástrico, -34.21 ± 5.38 , -65.25 ± 1.75 -74.73 ± 1.38 no grupo entérico proximal, e por fim -7.12 ± 0.94 , -26.61 ± 3.15 , -57.70 ± 6.49 no grupo entérico distal. A partir desses dados observamos que o efeito hipotensor do nitrito de sódio foi mais robusto no grupo entérico proximal ($p < 0,05$; Fig 4B).

Figura 4 Efeito da administração aguda do veículo (◇) ou nitrito de sódio no estômago (▲), intestino delgado proximal (●) e intestino delgado distal (■) de ratos anestesiados. (A) Pressão arterial média em resposta a doses crescentes de nitrito de sódio. (B) Delta da pressão arterial média após administração das três doses de nitrito de sódio. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM (n=6 por grupo). *P < 0.05 vs o grupo veículo. # P < 0.05 proximal vs distal. \$ P < 0.05 proximal vs gástrico.

4.2. Comparação do efeito da administração aguda de nitrito de sódio sobre a pressão arterial média em ratos pré-tratados com alopurinol

O mesmo protocolo de avaliação do efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio, nas três vias de administração, foi realizado em animais pré-tratados com alopurinol, para avaliar a participação da XOR nesses efeitos. É possível observar que os ratos pré-tratados com o alopurinol, e que receberam o nitrito de sódio pela via gástrica, tiveram os efeitos hipotensores do nitrito abolidos ($p < 0,05$; Fig 5A). No grupo pré-tratado com alopurinol e que recebeu o nitrito de sódio pela via entérica proximal, nota-se que o inibidor da XOR não foi capaz de alterar significativamente o efeito hipotensor do nitrito ($p < 0,05$; Fig 5C), bem como, apenas atenuou parcialmente a resposta anti-hipertensiva do nitrito no grupo tratado pela via entérica distal ($p < 0,05$; Fig 3E). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na frequência cardíaca entre os grupos de ratos tratados ($p < 0,05$; Fig 5B,D,F).

Figura 5 Comparação do efeito da administração aguda do veículo (◇) ou nitrito de sódio no estômago (▲), intestino delgado proximal (●) e intestino delgado distal (■) de ratos pré-tratados com veículo ou com alopurinol (△○□). (A, C e E) Pressão arterial média e (B, D e F) frequência cardíaca em resposta a doses crescentes de nitrito de sódio. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM (n=6 por grupo). *P < 0.05 vs o grupo veículo. #P < 0.05 gástrico versus alopurinol + gástrico.

4.3. Atividade e expressão da XOR em diferentes porções do trato gastrointestinal.

A fim de investigar a participação da XOR no efeito anti-hipertensivo do nitrito, foi avaliada a atividade da XOR no estômago, intestino delgado proximal e distal de ratos controle e tratados. Inicialmente avaliamos a atividade e a expressão da XOR nos tecidos de ratos controle. Curiosamente observamos que há uma atividade mais elevada no intestino delgado, em comparação ao estômago, sendo muito maior no intestino delgado proximal ($p < 0,05$; Fig 6A). Nos resultados de expressão, é possível observar que a XOR está mais expressa na porção proximal do intestino delgado em comparação a porção distal, e ao estômago, o que pode explicar uma maior atividade dessa enzima nesse tecido ($p < 0,05$; Fig 6C).

Figura 6 (A) Atividade da xantina oxidoredutase no estômago, intestino delgado proximal e intestino delgado distal de ratos controle ($n=5$ por grupo). (B) Gel de Western blotting representativo mostrando a expressão da xantina oxidoredutase no (s) estômago (s), intestino delgado proximal (p) e intestino delgado distal (d) de ratos. (C) Gráfico de barras mostrando a quantificação densitométrica dos dados. A B-actina foi usada como proteína de normalização. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM ($n = 1$ por grupo). [#] $p < 0,05$ em relação ao estômago. ^{\$} $p < 0,05$ proximal versus distal.

Nos animais pré-tratados com o veículo, a atividade da XOR é estatisticamente significante maior na porção proximal ($442,56 \pm 18,83$ mU/mg) e distal ($175,29 \pm$

8.44 mU/mg) do intestino delgado, em comparação ao estômago (42.04 ± 6.43 mU/mg) ($p < 0.05$; Fig7A). Além disso, na presença do alopurinol, é observada uma redução, estatisticamente significativa da atividade da XOR, no estômago (11.59 ± 2.63 mU/mg), intestino delgado proximal (191.77 ± 16.57 mU/mg) e distal (100.36 ± 21.62 mU/mg), em comparação aos tecidos pré-tratados com veículo ($p < 0.05$; Fig5A). Com a finalidade de comprovar que houve de fato a inibição da XOR, o mesmo ensaio foi realizado utilizando um inibidor mais novo e seletivo da XOR, Febuxostate *in vitro* (50nM). As amostras foram incubadas *in vitro* com o Febuxostate e como resultado, foi constatado o mesmo perfil de resposta observado nas amostras de animais pré-tratados com alopurinol ($p < 0.05$; Fig7B). Houve uma redução, estatisticamente significativa, da atividade da XOR no estômago (6.61 ± 0.94 mU/mg), intestino delgado proximal (61.00 ± 13.56 mU/mg) e distal (31.26 ± 12.99 mU/mg) de amostras incubadas com o febuxostate, em comparação as respectivas amostras de ratos veículos ($p < 0.05$; Fig7B).

Figura 7 Atividade da XOR em diferentes porções do trato gastrointestinal de ratos tratado com nitrito. (A) Atividade de XOR no estômago, intestino delgado proximal e intestino delgado distal de ratos pré-tratados com veículo ou alopurinol, e em (B) amostras de tecidos de ratos incubadas com veículo ou febuxostate. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM (n=6 por grupo). *P < 0,05 versus o grupo de veículo. #P < 0.05 Estômago versus proximal. \$P < 0.05 Proximal versus distal.

4.4. Avaliação do pH do estômago de ratos pré-tratados com veículo ou alopurinol

Para avaliar se o pré-tratamento com o alopurinol seria capaz de alterar o pH do estômago dos animais, foi aferido o pH estomacal dos animais submetidos ao pré-tratamento com veículo ou com alopurinol. Podemos observar na Figura 6 que não há diferença entre os grupos veículo ($3,09 \pm 0,21$, $n=8$) em comparação ao grupo pré-tratados com alopurinol ($2,89 \pm 0,21$), ($p<0,05$; Fig 8).

Figura 8 Avaliação do pH do estômago de ratos pré-tratados com veículo ou alopurinol. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM ($n=7$ por grupo).

4.5. Aumento das concentrações de nitrito e nitrato plasmático após o tratamento agudo com nitrito de sódio

Avaliamos as concentrações de nitrito e nitrato plasmáticos, para comparar se os tratamentos promoveriam alterações dos níveis circulantes desses metabólitos do NO, conforme o local de administração do nitrito. Após o tratamento agudo com nitrito no estômago ou intestino proximal e distal, houve um aumento estatisticamente significativo dos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato nos grupos tratados via:

gástrica, entérica proximal e entérica distal, em comparação aos animais que receberam o veículo ($p < 0,05$; Fig. 9A,B,C). Porém, não foram encontradas diferenças, estatisticamente significantes, nos níveis de nitrito e nitrato no plasma dos três grupos de ratos pré-tratados com o alopurinol, em comparação os que receberam nitrito de sódio.

Figura 9 Alteração das concentrações de nitrito e nitrato plasmático após o tratamento agudo com nitrito de sódio ou veículo. Concentrações de nitrito e nitrato no plasma de ratos submetidos ao tratamento agudo com veículo ou nitrito de sódio via estômago (A e D), intestino delgado proximal (B e E) e intestino delgado distal (C e F), pré-tratados com veículo ou alopurinol. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM ($n = 5-6$ por grupo). * $P < 0.05$ vs o grupo veículo.

4.6. Aumento de espécies nitrosiladas totais (RXNO), nitrosotióis (RSNO) e nitrosaminas (RNNO) no plasma de ratos submetidos ao tratamento agudo com nitrito de sódio

Também foram determinadas as concentrações plasmáticas de RXNO, RSNO e RNNO dos ratos submetidos ao tratamento. Após o tratamento nos diferentes locais houve um aumento significativo, dos níveis plasmáticos de RXNO e RNNO, nos grupos tratados com nitrito sozinho, em comparação aos animais tratados com veículo ($p < 0,05$; Fig.10). Porém, houve um menor aumento em relação aos controles nos grupos em que o nitrito foi usado junto com o alopurinol. No que se refere às concentrações plasmáticas de RSNO, houve um aumento significativo nos ratos que receberam o tratamento via entérico proximal ($p < 0,05$; Fig. 10E).

Figura 10 Concentrações de espécies nitrosiladas totais (RXNO), nitrosotios (RSNO) e nitrosaminas (RNNO) no plasma de ratos submetidos ao tratamento agudo com nitrito de sódio ou veículo via

estômago (A, D e G), intestino delgado proximal (B, E e H) e intestino delgado distal (C, F e I), pré-tratados com veículo ou alopurinol. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM (n= 5-6 por grupo). *P < 0.05 vs o grupo veículo.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Consideramos muito interessantes os resultados obtidos nesse trabalho, os quais mostram que o nitrito de sódio foi capaz de promover um efeito hipotensor mais proeminente quando administrado pela via entérica proximal, especialmente em comparação quando administrado no estômago. Muitos estudos prévios já haviam demonstrado os efeitos anti-hipertensivos do nitrito por via oral (Kanematsu *et al.* 2008; Montenegro *et al.* 2011; Oliveira-Paula *et al.* 2016; Pinheiro *et al.* 2012a), porém em nenhum outro estudo havia sido testada a capacidade dessa substância em promover seus efeitos anti-hipertensivos também em diferentes porções do intestino delgado. Notamos que o nitrito, na dose de 1mg/kg, no grupo entérico proximal, já foi capaz de reduzir significativamente os níveis pressóricos dos ratos hipertensos, o que não aconteceu nas outras vias (Pinheiro *et al.* 2012b).

Para investigar o possível mecanismo envolvido no efeito hipotensor mais pronunciado quando administrado na via entérica proximal, avaliamos a atividade e expressão da XOR nos três tecidos (estômago, intestino delgado proximal e distal). O resultado da atividade da XOR e os resultados da expressão protéica da XOR demonstraram que há uma maior atividade e expressão dessa enzima na porção proximal do intestino delgado em comparação com a porção distal e com o estômago. Isto sugere que o efeito hipotensor no grupo entérico proximal poderia ter sido mais pronunciado devido à possível atividade desta enzima, que está mais expressa e ativa nesse tecido.

Esses resultados estão de acordo com os dados já disponíveis na literatura, os quais mostram que a XOR está muito mais expressa na parte superior do intestino de ratos em comparação a parte inferior e ao estômago (Yun *et al.* 2017). Além disso, ao avaliar a atividade dessa enzima em diferentes tecidos de

camundongos, observou-se que essa enzima estava muito mais ativa no duodeno em comparação ao jejuno, e nestas duas porções do intestino em comparação ao estômago desses animais (Kurosaki *et al.* 1995).

A fim de confirmar a participação da XOR no efeito hipotensor do nitrito de sódio, os ratos foram pré-tratados com o alopurinol, que é uma droga reconhecidamente inibidora da XOR (Battelli *et al.* 2016b). No que se refere às alterações na PAM, o pré-tratamento com o alopurinol foi capaz de abolir o efeito hipotensor do nitrito na via gástrica, porém na via entérica proximal e distal o alopurinol não foi capaz de reduzir significativamente o efeito do nitrito. Esses resultados sugerem que embora a XOR esteja mais expressa no intestino delgado, especialmente na porção proximal, esta não parece desempenhar um papel relevante nas respostas ao nitrito nesse tecido, já que a inibição com o alopurinol não foi capaz de alterar a resposta ao nitrito. Tudo isto aconteceu apesar de ter sido observada uma redução de mais de 50% da atividade nos diferentes tecidos após o pré-tratamento com o alopurinol.

Em contrapartida, a XOR parece ser fundamental para os efeitos do nitrito no estômago, já que a inibição dessa enzima aboliu os efeitos do nitrito na via gástrica. Esses dados são consistentes com outros estudos da literatura que mostram que a XOR tem propriedade nitrito redutase que é eficaz em condições de pH ácido ou de hipóxia, porém muito pouco em condições de normoxia ou hiperoxia) (Cantu-Medellin and Kelley 2013; Battelli *et al.* 2016). No nosso caso, o ambiente ácido do estômago pode ter facilitado a redução do nitrito a NO pela XOR gástrica, muito mais do que no intestino proximal, pois o ambiente é ácido no primeiro, enquanto que tende a ser alcalino no último. Isto poderia explicar como o tratamento com alopurinol bloqueou os efeitos do nitrito sobre a pressão arterial quando

administrado no estômago, e muito pouco quando administrado no intestino proximal.

Observamos que inibir a XOR com o alopurinol atenuou os aumentos de concentrações de nitrito e de RXNO no plasma após administração de nitrito por via oral, pois esta (XOR), ao ser inibida, reduziria menos o nitrito a NO, conseqüentemente gerando menores quantidades de espécies nitrosantes e levando a menores aumentos de RXNO no plasma. Outros fatores podem ter contribuído para menores aumentos das concentrações de nitrito e RXNO no plasma quando o nitrito é administrado no estômago. Temos que também considerar que o nitrito administrado no estômago pode levar a uma rápida formação de NO (um gás) que pode ser eliminado por eructação (Gladwin *et al.* 2005), e nós não controlamos as quantidades de NO eventualmente eliminadas desta maneira neste estudo. Entretanto, espera-se uma perda maior de NO quando o nitrito é administrado diretamente neste órgão digestivo.

Após o tratamento com o nitrito observamos maiores aumentos das concentrações plasmáticas de nitrito e RXNO quando o mesmo foi administrado na porção proximal do intestino em comparação as demais vias, e o alopurinol não foi capaz de afetar esses aumentos. Isto poderia explicar o efeito hipotensor mais pronunciado do nitrito quando administrado no intestino proximal em comparação com os outros dois locais anatômicos comparados. Quando o nitrito foi administrado diretamente no estômago, observamos que há um aumento das concentrações de nitrito e RXNO que estão de acordo as entradas na literatura (Pinheiro *et al.* 2015; Sanches-Lopes *et al.* 2020), porém após o pré-tratamento com o alopurinol, há uma atenuação dos aumentos das concentrações circulantes dessas espécies, o que

está de acordo com o efeito pressórico abolido quando o nitrito foi administrado por esta via.

Diante dos resultados observados, podemos supor que a porção proximal do intestino delgado ofereça melhores condições para absorver o nitrito e RXNO do que o estômago. Isto poderia explicar ao menos em parte a maior diminuição da PAM no grupo em que no nitrito foi administrado no intestino proximal em comparação ao grupo no qual o nitrito foi administrado diretamente no estômago. Ou seja, os maiores aumentos de concentrações plasmáticas de nitrito e RXNO no grupo proximal em comparação aos demais grupos explicaria como a administração de nitrito produz efeito hipotensor mais intenso neste grupo em relação aos outros grupos, pois, obviamente, quanto maiores os aumentos das concentrações circulantes de nitrito e de RXNO, maiores as quedas de pressão arterial induzidas pela administração de nitrito.

Outro aspecto importante desse estudo é que observamos que, nos animais pré-tratados com alopurinol e que receberam nitrito no estômago, houve menores aumentos também das concentrações de nitrito no plasma. Em estudo realizado por Amaral e colaboradores, foi observado que o TEMPOL facilitaria os efeitos anti-hipertensivos do nitrito administrado por via oral, provavelmente devido ao aumento das concentrações de nitrito no plasma facilitados pelo TEMPOL. Isso provavelmente ocorreu porque o TEMPOL pode propiciar um ambiente mais redutor no estômago, levando a maiores aumentos da formação de NO a partir do nitrito quando comparado a uma condição controle (sem TEMPOL). Em ambientes ácidos, o nitrito é protonado e isto leva a formação de HNO₂ (Benjamin *et al.* 1994), o qual é encontrado em sua forma não-dissociada em condições de pH baixo, sendo portanto mais lipossolúvel, tendo assim maior facilidade para atravessar a parede gástrica e

adentrar a circulação sanguínea do que o próprio nitrito (Amaral *et al.* 2013). Podemos sugerir, portanto, que o nitrito pode ser mais rapidamente absorvido sob a forma de HNO_2 , sendo então rapidamente convertido a nitrito ao chegar na corrente sanguínea, cujo pH não é mais ácido (sendo fisiologicamente normal entre 7,35 e 7,45) (Samouilov *et al.* 2007). Resumidamente, podemos imaginar que, durante o processo de formação de NO a partir do nitrito, por meio da atividade da XOR, ocorre a formação intermediária de ácido nitroso no ambiente ácido, que é mais rapidamente absorvido do que o nitrito. Portanto, o alopurinol, ao inibir a XOR, inibe a formação de HNO_2 e conseqüentemente, o aumento das concentrações de nitrito no plasma, já que não vai ocorrer a absorção facilitada do nitrito sob a forma de HNO_2 . Isso poderia justificar os menores aumentos do nitrito nos animais pré-tratados com alopurinol do grupo gástrico.

Com relação aos efeitos do nitrito administrado nas porções distais do intestino, podemos observar que houve um comportamento intermediário com relação aos efeitos observados ao se administrar nitrito no estômago versus no intestino proximal. A interpretação destes resultados é um pouco mais complexa, mas sugere que o nitrito também pode ter seus efeitos quando administrado por esta via, por meio do aumento de nitrito e RXNO.

Os achados relatados neste estudo podem ter muitas implicações fisiológicas e farmacológicas. Primeiramente, usualmente se pensa que o nitrito administrado por via oral vai produzir seus efeitos por ser absorvido para a circulação, aumentando a formação de NO nos tecidos (Lundberg *et al.* 1994). Isto não parece ser totalmente verdadeiro, pois observamos sérias interferências, tanto do pH gástrico quanto da atividade XOR, facilitada em ambiente ácido, para a redução do nitrito a NO. Nossos resultados ajudam a entender melhor a relevância destes dois

fatores muito importantes para a formação de NO a partir do nitrito que chega até o estômago e outras porções do aparelho digestivo. Estes achados seguramente devem ser relevantes também para a análise dos efeitos da administração de nitrato, uma vez que o nitrato é reduzido a nitrito na cavidade oral, aumentando a quantidade de nitrito que chega até o estômago.

Enfim, nossos achados ressaltam a importância não só do pH gástrico ácido para a formação de NO e de outras espécies nitrosantes no estômago (aumentado as concentrações circulantes de RXNO e de nitrosotióis) (Lundberg *et al.* 1994; McKnight *et al.* 1997), mas também da atividade de XOR, favorecida pelo pH ácido, culminando nos efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio. Assim, se a formação de NO e outras espécies nitrosantes no estômago depende de ambos, pH ácido e atividade XOR, poderíamos suspeitar que pacientes que fazem uso crônico de alopurinol (um inibidor da XOR amplamente utilizado por pacientes com hiperuricemia) teriam prejuízo deste mecanismo fisiológico gástrico, talvez com consequências negativas para sua saúde cardiovascular. Isto poderia ser especialmente relevante para pacientes com doenças cardiovasculares.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Diante do exposto e dos resultados obtidos, podemos concluir que a XOR parece ser fundamental para os efeitos do nitrito no estômago, onde a acidez pode facilitar sua atividade nitrito redutase. A redução da PAM é muito mais pronunciada na porção proximal, já que oferece melhores condições de absorção do nitrito e dos nitrosotióis, do que o estômago. Isso explica pelo menos em parte a maior diminuição da pressão arterial no grupo entérico proximal, em comparação aos demais. Além disso, inibir a XOR com o alopurinol atenuou a redução de nitrito a NO, levando a menores aumentos de nitrosotióis no plasma, e conseqüentemente menor redução da PAM no grupo gástrico, em comparação ao grupo entérico proximal e distal.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral, J. H., Montenegro, M. F., Pinheiro, L. C., ... Tanus-Santos, J. E. (2013). TEMPOL enhances the antihypertensive effects of sodium nitrite by mechanisms facilitating nitrite-derived gastric nitric oxide formation. *Free Radical Biology and Medicine*, **65**, 446–455.
- Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. (2016a). Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species : Physiological and Pathological Effects, **2016**. Retrieved from <https://doi.org/10.1155/2016/3527579>
- Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. (2016b). Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species : Physiological and Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species : Physiological and Pathological Effects, (January). doi:10.1155/2016/3527579
- Benjamin, N., O'Driscoll, F., Dougall, H., ... McKenzie, H. (1994). Stomach NO synthesis. *Nature*, **368**(6471), 502–502.
- Björne, H., Govoni, M., Törnberg, D. C., Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2005). Intragastric nitric oxide is abolished in intubated patients and restored by nitrite. *Critical Care Medicine*, **33**(8), 1722–1727.
- Broniowska, K. A., & Hogg, N. (2012). The Chemical Biology of S-Nitrosothiols. *Antioxidants & Redox Signaling*, **17**(7), 969–980.
- Cantu-Medellin, N., & Kelley, E. E. (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*, **1**(1), 353–358.
- Cooke, MD, J. P., & Dzau, MD, V. J. (1997). NITRIC OXIDE SYNTHASE: Role in the Genesis of Vascular Disease. *Annual Review of Medicine*, **48**(1), 489–509.
- Epstein, F. H., Moncada, S., & Higgs, A. (1993). The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New England Journal of Medicine*, **329**(27), 2002–2012.
- Farah, C., Michel, L. Y. M., & Balligand, J.-L. (2018). Nitric oxide signalling in cardiovascular

- health and disease. *Nature Reviews Cardiology*, **15**(5), 292–316.
- Furchgott, R., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of atrial smooth muscle. *Nature*, **288**(November), 373–376.
- Gkaliagkousi, E., Douma, S., Zamboulis, C., & Ferro, A. (2009). Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: role in essential hypertension. *Journal of Hypertension*, **27**(12), 2310–2320.
- Gladwin, M. T., Schechter, A. N., Kim-shapiro, D. B., ... Graham, M. (2005). The emerging biology of the nitrite anion, **1**(6), 308–315.
- Guimarães, D. D., Cruz, J. C., Carvalho-Galvão, A., ... Carlström, M. (2019). Dietary Nitrate Reduces Blood Pressure in Rats With Angiotensin II–Induced Hypertension via Mechanisms That Involve Reduction of Sympathetic Hyperactivity. *Hypertension*, **73**(4), 839–848.
- Hille, R., Nishino, T., & Bittner, F. (2011). Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coordination Chemistry Reviews*, **255**(9–10), 1179–1205.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**(24), 9265–9269.
- Kanematsu, Y., Yamaguchi, K., Ohnishi, H., ... Tamaki, T. (2008). Dietary doses of nitrite restore circulating nitric oxide level and improve renal injury in *l*-NAME-induced hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **295**(5), F1457–F1462.
- Kurosaki, M., Li Calzi, M., Scanziani, E., Garattini, E., & Terao, M. (1995). Tissue- and cell-specific expression of mouse xanthine oxidoreductase gene in vivo: regulation by bacterial lipopolysaccharide. *Biochemical Journal*, **306**(1), 225–234.
- Laver, J. R., Stevanin, T. M., & Read, R. C. (2008). Chemiluminescence Quantification of NO and Its Derivatives in Liquid Samples. *Methods in Enzymology*, **436**(08), 113–127.
- Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., Ahluwalia, A., ... Weitzberg, E. (2009). Nitrate and nitrite in

- biology, nutrition and therapeutics. *Nature Chemical Biology*, **5**(12), 865–869.
- Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., & Weitzberg, E. (2015). Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, **14**(9), 623–641.
- Lundberg, J. O., & Govoni, M. (2004). Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, **37**(3), 395–400.
- Lundberg, J. O. N., Weitzberg, E., Lundberg, J. M., & Alving, K. (1994). Intragastric nitric oxide production in humans: Measurements in expelled air. *Gut*, **35**(11), 1543–1546.
- Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2010). NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **396**(1), 39–45.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Gladwin, M. T. (2008a). A via do nitrato-nitrito-óxido nítrico na fisiologia e terapêutica Abstrato.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Gladwin, M. T. (2008b). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7**(2), 156–167.
- MacArthur, P. H., Shiva, S., & Gladwin, M. T. (2007). Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **851**(1–2), 93–105.
- Malachias, M., Souza, W., Plavnik, F., ... Moreno Júnior, H. (2016). 7th Brazilian Guideline Of Arterial Hypertension. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, **107**(3).
doi:10.5935/abc.20160164
- McKnight, G. M., Smith, L. M., Drummond, R. S., Duncan, C. W., Golden, M., & Benjamin, N. (1997). Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut*, **40**(2), 211–214.
- Meijer, B., Seinen, M. L., Hosman, T., ... de Boer, N. K. H. (2018). High inter-individual variability of serum xanthine oxidoreductase activity in IBD patients. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **37**(6), 317–323.
- Millar, T. M., Stevens, C. R., Benjamin, N., Eisenthal, R., Harrison, R., & Blake, D. R. (1998).

- Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Letters*, **427**(2), 225–228.
- Mohamedali, K. A., Guicherit, O. M., Kellems, R. E., & Rudolph, F. B. (1993). The highest levels of purine catabolic enzymes in mice are present in the proximal small intestine. *Journal of Biological Chemistry*, **268**(31), 23728–23733.
- Montenegro, M. F., Amaral, J. H., Pinheiro, L. C., ... Tanus-Santos, J. E. (2011). Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*, **51**(1), 144–152.
- Montenegro, M. F., Pinheiro, L. C., Amaral, J. H., Ferreira, G. C., Portella, R. L., & Tanus-Santos, J. E. (2014). Vascular xanthine oxidoreductase contributes to the antihypertensive effects of sodium nitrite in L-NAME hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **387**(6), 591–598.
- Montenegro, M. F., Pinheiro, L. C., Amaral, J. H., ... Tanus-Santos, J. E. (2012). Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **385**(5), 509–517.
- Mulvany, M. J. (2012). Small Artery Remodelling in Hypertension. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **110**(1), 49–55.
- Neto-Neves, E. M., Pinheiro, L. C., Nogueira, R. C., Portella, R. L., Batista, R. I., & Tanus-Santos, J. E. (2019). Sodium nitrite improves hypertension-induced myocardial dysfunction by mechanisms involving cardiac S-nitrosylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **134**(January), 40–50.
- Oliveira-Paula, G. H., Pinheiro, L. C., Guimaraes, D. A., ... Tanus-Santos, J. E. (2016). Tempol improves xanthine oxidoreductase-mediated vascular responses to nitrite in experimental renovascular hypertension. *Redox Biology*, **8**, 398–406.
- Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**(6122), 524–526.

- Pelletier, M. M., Kleinbongard, P., Ringwood, L., ... Dejam, A. (2006). The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: Pitfalls and solutions. *Free Radical Biology and Medicine*, **41**(4), 541–548.
- Pinheiro, L. C., Amaral, J. H., Ferreira, G. C., ... Tanus-Santos, J. E. (2015). Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 252–262.
- Pinheiro, L. C., Montenegro, M. F., Amaral, J. H., Ferreira, G. C., Oliveira, A. M., & Tanus-Santos, J. E. (2012a). Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, **53**(4), 701–709.
- Pinheiro, L. C., Montenegro, M. F., Amaral, J. H., Ferreira, G. C., Oliveira, A. M., & Tanus-Santos, J. E. (2012b). Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, **53**(4), 701–709.
- Richardson, G., Hicks, S. L., O'Byrne, S., ... McKnight, G. M. (2002). The ingestion of inorganic nitrate increases gastric S-nitrosothiol levels and inhibits platelet function in humans. *Nitric Oxide*, **7**(1), 24–29.
- Samouilov, A., Woldman, Y. Y., Zweier, J. L., & Khramtsov, V. V. (2007). Magnetic resonance study of the transmembrane nitrite diffusion. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, **16**(3), 362–370.
- Sanches-Lopes, J. M., Ferreira, G. C., Pinheiro, L. C., Kemp, R., & Tanus-Santos, J. E. (2020). Consistent gastric pH-dependent effects of suppressors of gastric acid secretion on the antihypertensive responses to oral nitrite. *Biochemical Pharmacology*, **177**(March), 113940.
- Underwood, C. F., Boyd, R., Phillips, J. K., & Hildreth, C. M. (2019). Increased excitatory regulation of the hypothalamic paraventricular nucleus and circulating vasopressin results in the hypertension observed in polycystic kidney disease. *Journal of Hypertension*, **37**(1), 109–115.

- van Faassen, E. E., Bahrami, S., Feelisch, M., ... Gladwin, M. T. (2009). Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Medicinal Research Reviews*, **29**(5), 683–741.
- Weitzberg, E., Hezel, M., Lundberg, J. O., & Warner, D. S. (2010). Nitrate-Nitrite-Nitric Oxide Pathway. *Anesthesiology*, **113**(6), 1460–1475.
- Williams, B., Mancia, G., Spiering, W., ... Brady, A. (2018). 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *European Heart Journal*, **39**(33), 3021–3104.
- Wink, D. A., Nims, R. W., Darbyshire, J. F., ... Cook, J. A. (1994). Reaction Kinetics for Nitrosation of Cysteine and Glutathione in Aerobic Nitric Oxide Solutions at Neutral pH. Insights into the Fate and Physiological Effects of Intermediates Generated in the NO/O₂ Reaction. *Chemical Research in Toxicology*, **7**(4), 519–525.
- World Health Organization. (2017). Cardiovascular diseases (CVDs). Retrieved October 13, 2020, from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Yun, Y., Yin, H., Gao, Z., ... Duan, W. (2017). Intestinal tract is an important organ for lowering serum uric acid in rats. *PLOS ONE*, **12**(12), e0190194.