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

CAIO CRISTOVÃO CARVALHO

**Efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio estão associados à nitrosação protéica e
redução da resposta vascular à fenilefrina**

Ribeirão Preto – SP

2019

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

CAIO CRISTOVÃO CARVALHO

**Efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio estão associados à nitrosação protéica e
redução da resposta vascular à fenilefrina**

Ribeirão Preto – SP

2019

CAIO CRISTOVÃO CARVALHO

Efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio estão associados à nitrosação protéica e redução da resposta vascular à fenilefrina

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Ribeirão Preto – SP

2019

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Caio Cristovão

Efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio estão associados à nitrosação proteica e redução da resposta vascular à fenilefrina. Ribeirão Preto, 2019. 72f.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos.

1. Nitrito. 2. S-nitrosotiol. 3. Hipertensão. 4. Receptor Adrenérgico. 5. Nitrosação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

CARVALHO, Caio Cristovão. **Efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio estão associados à nitrosação protéica e redução da resposta vascular à fenilefrina.** 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.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sidinei e Maria de Fátima e meu irmão Pedro por todo o suporte, formação e ensinamentos dados por toda a vida. À minha namorada Karina por todo amor e companheirismo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, que sempre me deu todo suporte que eu precisava, sempre muito paciente com as minhas dificuldades e me inspirando a buscar o maior nível de qualidade na ciência.

À todos meus colegas de laboratório, em especial ao Gustavo, que desde meu primeiro dia no laboratório sempre se esforçou para me dar suporte e compartilhar seus conhecimentos, e à Sandra, por toda atenção e apoio.

Aos funcionários e professores do Departamento de Farmacologia, em especial à Gislaine por ser atenciosa e eficiente com os alunos.

À todos meus amigos, em especial ao Raimundo, por compartilhar momentos de alegria e dificuldades da vida acadêmica.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

CARVALHO, C. C. **Efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio estão associados à nitrosação protéica e redução da resposta vascular à fenilefrina.** 2019. 72f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A hipertensão acomete aproximadamente 1 bilhão de pessoas em todo o mundo, no entanto, a sua etiologia exata é em muitos casos indefinida e o mecanismo de ação molecular não foi elucidado completamente. O óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) é liberado de forma contínua nos vasos de resistência, contribuindo para o controle fisiológico da pressão arterial, sendo que a redução em sua biodisponibilidade está correlacionada com o desenvolvimento da hipertensão. Durante muito tempo, acreditava-se que o nitrato e o nitrito eram apenas metabólitos inertes da via do $\text{NO}^\bullet$ e somente em 1994 foi demonstrado que o nitrito, derivado do nitrato, era um substrato para a produção do $\text{NO}^\bullet$ no estômago, de modo que a administração de nitrito de sódio exerce efeitos anti-hipertensivos. De fato, há diversas evidências demonstrando os efeitos do nitrito sobre a pressão arterial, porém, não há um consenso sobre o seu mecanismo de ação. Trabalhos recentes sugerem que os efeitos anti-hipertensivo do nitrito se baseiam na geração de S-nitrosotióis no estômago e na capacidade destas moléculas em nitrosar proteínas da parede vascular, alterando a sua função. Há diversas proteínas da parede vascular com função crítica no controle do tônus vascular que podem ser alvos para a nitrosação. Neste trabalho, optamos por avaliar o processo de nitrosação na sinalização do receptor α_1 -adrenérgico em ratos hipertensos e normotensos tratados com nitrito de sódio ou veículo pela via oral por 7 dias. Também foi realizada a incubação de anéis de aorta com nitrito de sódio ou S-nitrosoglutationa na presença ou ausência de ascorbato. O tratamento com nitrito de sódio oral por 7 dias foi responsável por reduzir a pressão arterial sistólica dos animais hipertensos e aumentar as quantidades de nitrito e espécies nitrosadas no plasma. Também foi observado uma redução na reatividade aórtica à fenilefrina em animais tratados com nitrito, sendo que este efeito é abolido na presença de ascorbato. A incubação de anéis de aorta com nitrito de sódio não demonstrou causar efeitos sobre a reatividade vascular, porém, o pré-tratamento com S-nitrosoglutationa seguido da sua remoção foi responsável por reduzir a reatividade aórtica à fenilefrina e aumentar a quantidade de proteínas nitrosadas na aorta. Estes efeitos também foram abolidos pela incubação com ascorbato. Estes resultados nos sugerem que os S-nitrosotióis, e não o nitrito, exercem efeito anti-hipertensivo através da redução da reatividade vascular na aorta, modulando a sinalização do receptor α_1 -adrenérgico.

Estes efeitos aparentam se basear na nitrosação de proteínas, visto que a incubação com ascorbato é responsável por abolir estes efeitos e há um aumento na quantidade de proteínas nitrosadas na aorta após a pré-incubação com S-nitrosoglutathione.

Palavras-chave: nitrito, S-nitrosotiol, hipertensão, receptor adrenérgico, nitrosação.

ABSTRACT

CARVALHO, C. C. **Antihypertensive effects of sodium nitrite are associated with protein nitrosation and reduced response to phenylephrine.** 2019. 72f. Dissertação (Mestrado) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Hypertension affects approximately 1 billion people worldwide, however, its exact etiology is in many cases indefinite and the mechanism of molecular action has not been elucidated completely. Nitric oxide (NO[•]) is released continuously in resistance vessels, contributing to the physiological control of blood pressure, and the reduction in its bioavailability is correlated with the development of hypertension. For a long time, it was believed that nitrate and nitrite were only inert metabolites of the NO[•] pathway, and it was only in 1994 that nitrite derived from nitrate was shown to be a substrate for the production of NO[•] in the stomach, so that administration of sodium nitrite exerts antihypertensive effects. In fact, there is a lot of evidence demonstrating the effects of nitrite on blood pressure, but there is no consensus on its mechanism of action. Recent work has suggested that the antihypertensive effects of nitrite are based on the generation of S-nitrosothiols in the stomach and on the ability of these molecules to nitrosate proteins in the vascular wall, altering their function. There are several vascular wall proteins with critical function in vascular tone control that may be targets for nitrosation. In this work, we chose to evaluate the process of nitrosation in α_1 -adrenergic receptor signaling in hypertensive and normotensive rats treated with sodium nitrite or vehicle orally for 7 days. Aortic rings were also incubated with sodium nitrite or S-nitrosoglutathione in the presence or absence of ascorbate. Treatment with oral sodium nitrite for 7 days was responsible for reducing the systolic blood pressure of hypertensive animals and increasing the amounts of nitrite and nitrosated species in the plasma. A reduction in aortic reactivity to phenylephrine has also been observed in nitrite treated animals, and this effect is abolished in the presence of ascorbate. The incubation of aortic rings with sodium nitrite was not shown to have an effect on vascular reactivity, however, pre-treatment with S-nitrosoglutathione followed by its removal was responsible for reducing aortic reactivity to phenylephrine and increasing the amount of nitrosated proteins in the aorta. These effects were also abolished by incubation with ascorbate. These results suggest that S-nitrosothiols, not nitrite, exert an antihypertensive effect by reducing vascular reactivity in the aorta, modulating α_1 -adrenergic receptor signaling. These effects appear to be based on protein nitrosation, since incubation with ascorbate is responsible for abolishing

these effects and there is an increase in the amount of nitrosated proteins in the aorta after preincubation with S-nitrosoglutathione.

Keywords: nitrite, S-nitrosothiol, hypertension, adrenergic receptor, nitrosation.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Resumo da síntese e função de NO nas células musculares lisas.....	25
Figura 2. Geração de RSNO no efeito anti-hipertensivo do nitrito oral.....	29
Figura 3. Medidas semanais da pressão sistólica e do peso corporal.....	43
Figura 4. Medidas de NO_2^- e RXNO plasmático.....	44
Figura 5. Reatividade vascular de animais após o tratamento de 7 dias.....	46
Figura 6. Influência do ascorbato na reatividade vascular de animais após o tratamento de 7 dias.....	48
Figura 7. Curva de concentração-efeito para fenilefrina de aortas incubadas na presença ou ausência de nitrito de sódio.....	49
Figura 8. Curva de concentração-efeito de anéis de aorta pré-incubados com S-nitrosoglutationa.....	50
Figura 9. Nitrosação vascular total da aorta pelo método de SNO-RAC.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E_{max} – efeito máximo

2R1C – 2 rins 1 clipe

ACh – acetilcolina

ANOVA – análise de variância

DAG – diacilglicerol

DOCA – desoxicorticosterona

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

EPM – erro padrão da média

ERN – espécies reativas de nitrogênio

ERO – espécies reativas de oxigênio

GMPc – guanosina monofosfato cíclica

GPCR – receptor acoplado à proteína G

GSNO – S-nitrosoglutathione

GSNOR – S-nitrosoglutathione reductase

GSSG – glutathione oxidada

iNOS – óxido nítrico sintase induzida

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

MMTS – metilmetanotiosulfonato

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

PK – proteína quinase

PL – fosfolipase

RAAS – sistema renina-angiotensina-aldosterona

RNA – ácido ribonucleico

RSNO – S-nitrosotiol

RVP – resistência vascular periférica

RXNO – espécies nitrosadas

SDS – dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Hipertensão, vasculatura e mediadores do tônus vascular.....	17
1.2. A descoberta dos efeitos fisiológicos do óxido nítrico	19
1.3. Biossíntese do óxido nítrico.....	20
1.4. Circulação entero-salivar do nitrato e conversão do nitrito em NO	21
1.5. Nitrito e nitrato como agentes terapêuticos	23
1.6. S-nitrosotióis como uma nova classe de doadores de NO	24
1.7. Efeitos do óxido nítrico dependentes de GMPc cíclico na vasculatura.....	25
1.8. Efeitos do óxido nítrico independentes de GMP cíclico na vasculatura.....	28
1.9. Via de sinalização dos receptores adrenérgicos e seus efeitos sobre o tônus vascular..	31
2. HIPÓTESE.....	35
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo Geral.....	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Animais.....	39
4.2. Abordagem experimental I	39
4.3. Indução da hipertensão 2R1C	39
4.4. Determinação das concentrações de nitrito e espécies nitrosadas	40
4.5. Estudo de reatividade aórtica	40
4.6. Abordagem experimental II	41
4.7. SNO-RAC.....	41
4.8. Análise estatística	42
5. RESULTADOS	44
5.1. Tratamento diário de nitrito de sódio sobre a pressão arterial	44
5.2. Tratamento diário de nitrito de sódio sobre a concentração de nitrito e espécies nitrosadas no plasma	45
5.3. Tratamento diário de nitrito de sódio sobre a reatividade da aorta à fenilefrina	46

5.4. Avaliação do papel da nitrosação nos efeitos do tratamento com nitrito de sódio	47
5.5. Avaliação da capacidade do nitrito em alterar a reatividade vascular aórtica	50
5.6. Avaliação da capacidade da S-nitrosoglutathione em alterar a reatividade vascular aórtica.....	51
5.7. Avaliação da quantidade de proteínas S-nitrosadas nos vasos aórticos.....	52
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES.....	61
8. REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão, vasculatura e mediadores do tônus vascular

A hipertensão é um fator de risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares e doenças renais, sendo definida pela pressão arterial sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão arterial diastólica ≥ 90 mmHg, acometendo aproximadamente 1 bilhão de pessoas em todo o mundo (WILLIAMS et al., 2018). A elevada pressão arterial contribui para a ocorrência de morte prematura, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, acidente vascular encefálico e doença renal causando mais de 10 milhões de mortes por ano, sendo que esta alta prevalência se deve à sua característica assintomática e frequentemente associada à outros fatores de risco, dificultando o seu correto diagnóstico (WILLIAMS et al., 2018). O tratamento da hipertensão está associado com alterações no estilo de vida (restrição ao sódio, moderação no consumo de álcool, alimentação saudável e prática de atividades físicas) e terapia farmacológica. Porém, mesmo após 50 anos de investigação da doença, a etiologia exata da hipertensão é em muitos casos indefinida e o mecanismo de ação molecular não foi elucidado completamente, de modo que em apenas 5% dos pacientes hipertensos a causa da doença é conhecida (TOUYZ; BRIONES, 2011; BROZOVICH et al., 2016; WILLIAMS et al., 2018). Sabemos que o coração e os rins estão relacionados com o controle da pressão arterial mas o estado contrátil das células musculares lisas vasculares é um dos maiores contribuidores para o desenvolvimento da hipertensão através da regulação do raio dos vasos sanguíneos e da modulação da resistência vascular periférica (RVP) (HARRIS et al., 2008). O raio dos vasos sanguíneos é regulado fisiologicamente por um equilíbrio bem regulado entre agentes vasoconstritores e vasodilatadores e podemos esperar que agentes que possuem atividade sobre a RVP, são capazes de modular a pressão arterial (HARRIS et al., 2008; BROZOVICH et al., 2016).

A elevação da pressão arterial está associada com o desequilíbrio de agentes vasoconstritores e vasodilatadores através de fatores ambientais e de fatores biológicos dos sistemas cardiovasculares, renal e neural associados com a fisiopatologia da hipertensão como: *i) ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS)* – a angiotensina II é considerada o peptídeo efetor mais potente deste sistema, exercendo seus efeitos através da vasoconstrição do músculo liso vascular, estimulação da produção de aldosterona e estimulação a liberação de catecolaminas (KOBORI et al., 2007). A exposição crônica da

angiotensina II é responsável por induzir hipertensão e remodelamento vascular através da ativação dos receptores AT_1 de forma inapropriada (KOBORI et al., 2007; LING et al., 2018).

ii) estimulação excessiva do sistema simpático e redução da atividade do sistema parassimpático – o sistema simpático regula a vasculatura através de suas ações sobre os vasos sanguíneos, coração, rins e medula adrenal (liberação de catecolaminas) enquanto que o parassimpático atua apenas no coração, sendo estes mecanismos autonômico responsáveis pelas flutuações fisiológicas da pressão arterial ao longo do dia, porém, a ativação crônica do sistema nervoso simpático está intimamente correlacionada com a etiologia da hipertensão e isto pode ser evidenciado pelo efeito anti-hipertensivo de fármacos simpatolíticos, como antagonistas de receptores α e β adrenérgicos (GUYENET, 2006).

iii) interação anormal de agonistas com receptores acoplados à proteína G (GPCR) – há diversos agonistas que são capazes modular o estado contrátil da vasculatura através da ligação com GPCRs presente nas células musculares lisas vasculares e células endoteliais (HARRIS et al., 2008). Os GPCRs representam uma das maiores família de proteínas e um mesmo agonista pode causar tanto vasodilatação quanto vasoconstrição dependendo do receptor estimulado (HARRIS et al., 2008). Os GPCRs podem alterar o tônus vascular e a RVP pela regulação adrenérgica das catecolaminas como a noradrenalina e adrenalina, assim como pela ação de outros hormônios como angiotensina II, endotelina-1, histamina e adenosina, evidenciando uma grande variedade de GPCRs no controle da pressão arterial e que a desregulação da sinalização destes receptores estão envolvidas no desenvolvimento e agravamento da hipertensão (HARRIS et al., 2008).

iv) disfunção endotelial – o tônus vascular pode ser controlado por mediadores químicos derivados do endotélio vascular, sendo o óxido nítrico (NO^*) o mais relevante destes mediadores. Acreditava-se que o endotélio vascular servia apenas como barreira inerte entre o sangue e as camadas mais internas dos vasos sanguíneos e hoje ele é tido como um órgão funcional capaz de realizar o transporte de diversas moléculas, fornecer uma superfície antitrombogênica, limitar a aderência de plaquetas e trombos, atuar ativamente sobre o processo inflamatório e controlar o tônus vascular, sendo que a perda da função normal do endotélio, ou seja, a disfunção endotelial, faz com que os efeitos protetores no sistema vascular se percam, influenciando assim o desenvolvimento e progressão de doenças vasculares (PERTICONE et al., 2001).

O NO^* derivado do endotélio possui ação vasodilatadora e a redução em sua biodisponibilidade é responsável pelo aumento da RVP. O mecanismo pelo qual a biodisponibilidade de NO^* é reduzida na hipertensão é causada por mecanismos multifatoriais,

no entanto, a sua redução está frequentemente associada com o estresse oxidativo e pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), em particular pelo ânion superóxido (O_2^-), produzido por enzimas como a NADPH oxidase (PERTICONE et al., 2001; OLIVEIRA-PAULA; TANUS-SANTOS, 2018), juntamente com a perda da capacidade antioxidante vascular (TOUYZ; BRIONES, 2011). O $NO^\bullet$ reage muito rapidamente com o O_2^- para produzir espécies pró-oxidante como o peroxinitrito ($ONOO^-$), composto altamente reativo e capaz de interferir na ação do $NO^\bullet$ na vasculatura, levando à ocorrência de disfunção endotelial e aumento do risco de doenças cardiovasculares (LING et al., 2018). O estado redox do meio biológico regula a formação dos metabólitos de $NO^\bullet$ como o nitrito, nitrato e espécies nitrosadas (KUMAR et al., 2012) e estados patológicos, como a hipertensão, comprometem a biodisponibilidade do $NO^\bullet$ e de seus metabólitos através do aumento do estresse oxidativo (HARRISON; GONGORA, 2009).

1.2. A descoberta dos efeitos fisiológicos do óxido nítrico

Quimicamente, o $NO^\bullet$ é uma molécula gasosa extremamente complexa, muito reativa, lipofílica, capaz de exercer uma infinidade de processos no organismo, sendo um radical livre que carrega um elétron não pareado em sua camada mais externa, com uma meia-vida de alguns segundos e se apresenta como uma das três formas redox do monóxido de nitrogênio (ânion nitroxil [NO^-], radical livre [$NO^\bullet$] e nitrosônio [NO^+]) (IGNARRO, 1990; IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002). Os efeitos fisiológicos do $NO^\bullet$ foram descobertos pela observação de que o gás gerado pela solução acidificada de nitrito ativava preparações solúveis de guanilato ciclase, dando início à uma revolucionária história de estudos sobre as suas ações biológicas. O $NO^\bullet$ foi descrito pela primeira vez em 1979 como um potente relaxante do músculo liso vascular e, como muitas outras substâncias farmacologicamente ativas, a sua ocorrência endógena, presente naturalmente nas células dos mamíferos, foi descoberta posteriormente (IGNARRO et al., 1987). Em 1980, Furchgott e Zawadzki observaram que preparações de anéis de aorta de coelhos perdiam a capacidade de relaxamento induzida pela acetilcolina (ACh), quando a camada mais interna do vaso era lesada. Os autores sugeriram que as células endoteliais eram necessárias para o relaxamento da musculatura lisa vascular e que a ACh age nos receptores muscarínicos das células endoteliais, estimulando a liberação de uma ou mais substâncias que atuam nas células musculares lisas da vasculatura para ativar o relaxamento. O trabalho, porém, não identificou

a(s) substância(s) liberada(s) pelo endotélio, ficando conhecido apenas como fator de relaxamento derivado do endotélio (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Foi em 1987 que Ignarro e colaboradores deduziram que o NO• era o fator de relaxamento derivado do endotélio através da identificação de diversas similaridades químicas e biológicas com o NO• como causar relaxamento de artérias e veias, ativar a enzima guanilato ciclase solúvel, causar acúmulo de GMPc, serem compostos instáveis, ambas substâncias têm sua inativação acelerada pelo ânion superóxido e reagem com a hemoglobina (IGNARRO et al., 1987). Neste mesmo ano, foi demonstrado que células endoteliais de fato liberam NO• pela quimiluminescência da reação do NO• com o ozônio (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Os cientistas Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad receberam em 1998 o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina pelas suas descobertas envolvendo o NO•.

Após a descoberta de que o NO• derivado do endotélio atua sobre as células musculares lisas adjacentes em preparações *in vitro*, foi observado também que esta regulação é observada em vasos de resistência de humanos saudáveis (VALLANCE; COLLIER; MONCADA, 1989). A dependência da L-arginina para a síntese de NO foi demonstrada por Palmer, Ashton e Moncada em 1988 em um experimento que utilizou culturas de células endoteliais e mostrou que a liberação induzida de NO era aumentada por infusões de L-arginina mas não por outras moléculas com estruturas análogas. Os autores, utilizando espectrometria de massa, marcaram o nitrogênio da L-arginina para demonstrar que a L-arginina é o precursor da síntese de NO nas células endoteliais vasculares (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988).

1.3. Biossíntese do óxido nítrico

A via L-arginina/NO é um mecanismo presente em diversas vias metabólicas em nosso organismo e durante a década de 80, surgiram evidências de diversas células no organismo que sintetizam NO• por esta via. Como dito anteriormente, foi demonstrado que o NO• era sintetizado nas células endoteliais vasculares (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980) com atividade sobre o relaxamento vascular, atividade plaquetária e adesão plaquetária. Foi também demonstrado que o NO• é sintetizado em macrófagos e neutrófilos (MCCALL et al., 1989) envolvido na atividade citotóxica destas células, e também é sintetizado no sistema nervoso central (KNOWLES et al., 1989) atuando na neurotransmissão. Nesta época, acreditava-se que a formação do NO• dependia necessariamente de enzimas para ser

produzido no meio biológico, mesmo havendo evidências que o $\text{NO}^\bullet$ poderia ser formado por reações não enzimáticas, como a reação do nitrito com o Fe_2^+ ou a reação do nitrito com o iodo, porém, acreditava-se ser improvável que reações não enzimáticas pudessem gerar $\text{NO}^\bullet$ no meio biológico (IGNARRO, 1990). A enzima óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a formação do $\text{NO}^\bullet$, L-citrulina e NADP^+ a partir da L-arginina, NADPH e oxigênio molecular, havendo três isoformas da NOS, sendo elas: a enzima neuronal (nNOS ou NOS1), a enzima induzida (iNOS ou NOS2) e a enzima endotelial (eNOS ou NOS3), que apesar do nome, não está restrita apenas ao endotélio (MONCADA; HIGGS, 1993). A nNOS e a eNOS são enzimas constitutivas e produzem $\text{NO}^\bullet$ em pequenas quantidades, na ordem de picomoles, e é dependente da interação do cálcio com a calmodulina, enquanto a iNOS produz grandes quantidades de $\text{NO}^\bullet$, na ordem de nanomoles, em razão de sua abundância em específicos casos patológicos e é independente do cálcio (LÜSCHER; TANNER, 1993). A maior parte do $\text{NO}^\bullet$ que promove o relaxamento vascular provém da enzima constitutiva eNOS, que produz NO continuamente. Foi demonstrado que células endoteliais em cultura produzem menos $\text{NO}^\bullet$ que as células endoteliais da vasculatura, demonstrando que as células endoteliais da vasculatura estão constantemente estimuladas, provavelmente pela tensão física de cisalhamento do sangue, considerada como o maior estímulo para produção de NO , independente de receptores (TOUSOULIS et al., 2012).

1.4. Circulação entero-salivar do nitrato e conversão do nitrito em NO

Como já dito, acreditava-se que a única via de geração de $\text{NO}^\bullet$ *in vivo* era através da enzima NOS e o nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) eram vistos apenas como um metabólito inerte da via do $\text{NO}^\bullet$. Somente em 1994 foi demonstrado que o nitrito, derivado do nitrato, era um substrato para a produção do $\text{NO}^\bullet$ independente da enzima NOS. Isso era possível pela conversão não enzimática do NO_2^- em $\text{NO}^\bullet$ no meio ácido do estômago (LUNDBERG et al., 1994).

Em humanos, a grande maioria do nitrato gerado pelo metabolismo do $\text{NO}^\bullet$ ou ingerido na dieta é absorvido e excretado pela urina, porém, 25% do nitrato plasmático é absorvido no trato gastrointestinal e entra na circulação entero-salivar, sendo concentrado na saliva (SPIEGELHALDER; EISENBRAND; PREUSSMANN, 1976). O nitrato da saliva é reduzido em nitrito por bactérias comensais presentes na boca, com atividade nitrato redutase (LUNDBERG et al., 2004). O nitrito é então deglutido e transportado até o estômago, onde a

acidificação do nitrito irá resultar na sua protonação, formando ácido nitroso (HNO_2) que em seguida se decompõe em óxidos de nitrogênio, dependendo do estado redox e do conteúdo do lúmen gástrico (equações 1-4) (PINHEIRO et al., 2015).

O $\text{NO}^\bullet$ e o NO_2^- se difundem para a circulação portal e o $\text{NO}^\bullet$ se oxida em NO_2^- , que é transportado pelos vasos sanguíneos. Nos vasos de resistência, o NO_2^- é reduzido para $\text{NO}^\bullet$ preferencialmente em regiões com baixo pH e baixa pressão de oxigênio, causando vasodilatação e consequentemente uma redução na pressão arterial (WEBB et al., 2008). Desta forma, a hipóxia e a acidose tornam regiões afetadas por estas condições mais sensíveis à conversão do nitrito e outros doadores de óxido nítrico em $\text{NO}^\bullet$, produzindo vasodilatação. O nitrito pode ser convertido para $\text{NO}^\bullet$ também pelas reações com deoxi-hemoglobina, mioglobina, xantina oxidase, citocromo P450 e enzimas contendo grupos tióis ou heme (GLADWIN et al., 2005; MONTENEGRO et al., 2011). O $\text{NO}^\bullet$ e o NO_2^- têm suas ações finalizadas pela oxidação em NO_3^- , que poderá ser excretado ou integrar novamente o ciclo êntero-salivar. Através das equações 1-4, podemos observar que o $\text{NO}^\bullet$ produzido pelo NO_2^- no estômago apresenta o N_2O_3 e o NO^+ como intermediários, ambos potentes agentes nitrosantes (GOW et al., 2002). Um agente nitrosante é uma molécula capaz de doar um grupo nitroso à outra molécula. A nitrosação pode ocorrer em um grupo tiol ($\text{R} - \text{S} - \text{H}$), formando S-nitrosotióis ($\text{R} - \text{S} - \text{N} = \text{O}$), e através das equações 5 e 6, podemos observar que os RSNOs são formados em grandes quantidades em condições ácidas (FOSTER; MCMAHON; STAMLER, 2003).

Já foi demonstrado que o nitrato absorvido pela dieta rica em vegetais reduz agudamente a pressão arterial, aumenta a concentração plasmática de nitrito e melhora a função plaquetária e endotelial, sendo que estes efeitos são abolidos com a interrupção da conversão êntero-salivar do nitrato em nitrito. Desta forma, o nitrato e o nitrito podem contribuir para a suplementação da biodisponibilidade de $\text{NO}^\bullet$ e outras espécies nitrosantes, evidenciando um potencial tratamento “natural” e de baixo custo para prevenção de doenças cardiovasculares (WEBB et al., 2008).

1.5. Nitrito e nitrato como agentes terapêuticos

Ainda que documentos do século VIII demonstrassem que o nitrito e o nitrato fossem utilizados pelos chineses para aliviar dores no peito, o entendimento de que estas moléculas possuem efeitos terapêuticos em humanos demoraram para ser evidenciados, sendo utilizados terapeuticamente apenas no século XIX em doenças cardíacas isquêmicas, insuficiência cardíaca e hipertensão (IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002; GLADWIN et al., 2005). Acredita-se que a suplementação com nitrito e nitrato é responsável por aumentar a biodisponibilidade de $\text{NO}^\bullet$, causando relaxamento da musculatura lisa vascular, independentemente do endotélio, representando uma classe de doadores de $\text{NO}^\bullet$ (IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002). Uma importante via de redução do nitrito se dá através da deoxi-hemoglobina, produzindo $\text{NO}^\bullet$ e RSNOs (COSBY et al., 2003). Esta transformação é tida como a responsável pela ação vasodilatadora do nitrito visto que, em condições fisiológicas, o nitrito apresenta uma baixa potência vasodilatadora em preparações de anéis de aorta (FURCHGOTT; BHADRAKOM, 1953) e não atua como um reservatório intravascular de $\text{NO}^\bullet$, não sendo considerado um vasodilatador intrínseco (LAUER et al., 2001).

Diversos estudos demonstraram os efeitos terapêuticos benéficos do nitrito sobre a lesão de isquemia e reperfusão, o relaxamento da vasculatura, os efeitos vasodilatadores pulmonares e efeitos anti-hipertensivos em estudos clínicos e experimentais (MONTENEGRO et al., 2011). O tratamento com nitrito de sódio é responsável por amenizar o quadro de hipertensão em ratos em modelos L-NAME (MONTENEGRO et al., 2014), 2R1C (MONTENEGRO et al., 2012), DOCA sal (AMARAL et al., 2015) e infusão de

angiotensina-II (LING et al., 2018). Os efeitos anti-hipertensivos do nitrito poderiam ser explicados simplesmente pela sua capacidade de doar o NO[•] na vasculatura, porém, diversos estudos recentes têm demonstrado outras propriedades do tratamento com nitrito que poderiam também explicar seu efeito anti-hipertensivo. Já foi demonstrado que o nitrito de sódio exerce efeito antioxidante em artérias, reduzindo a quantidade de EROs e consequentemente aumentando a biodisponibilidade de NO[•] (LING et al., 2018). Outro fator importante nos efeitos anti-hipertensivos do nitrito é o ambiente ácido estomacal, já que o aumento do pH estomacal atenua seus efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio administrado pela via oral (PINHEIRO et al., 2015). O aumento de pH gástrico não reduz a quantidade de nitrito circulante, mas reduz a quantidade de RSNO, sugerindo que os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio se baseiam na formação de RSNOs no estômago (PINHEIRO et al., 2015).

1.6. S-nitrosotióis como uma nova classe de doadores de NO

Várias estratégias já foram empregadas para aumentar a quantidade de NO[•] circulante ou diminuir sua degradação em situações patológicas. Devida baixa estabilidade do NO[•], não é possível a sua utilização como fármaco por não conseguir causar um efeito sistêmico constante e pela falta de seletividade em tecidos alvos (GAUCHER et al., 2012). Descobertas recentes têm expandido muito nosso conhecimento sobre moléculas que são capazes de carregar o NO[•] pela circulação e regular o tônus vascular *in vivo*, conservando e estabilizando a sua biodisponibilidade. Terapeuticamente isso é de suma importância, já que o NO[•] é uma molécula muito instável e de meia-vida plasmática de alguns segundos, sendo totalmente dependente de ferramentas farmacológicas específicas para exercer um efeito terapêutico no organismo. Doadores de NO[•] como a nitroglicerina e o nitroprussiato foram utilizados por décadas na prática clínica, no entanto, com o aumento dos estudos da fisiologia do NO[•] a partir do meio da década de 80, uma variedade de novos doadores foram desenvolvidos com diversas vantagens sobre os doadores convencionais (IGNARRO; NAPOLI; LOSCALZO, 2002).

Os RSNOs representam uma nova classe de doadores de NO[•], oferecendo diversas vantagens sobre os doadores clássicos de NO[•] como não induzir estresse oxidativo ou tolerância vascular, servirem de reservatório endógeno de NO[•] no sangue e até atingir o meio intracelular podendo estes serem utilizados de forma benéfica em diversas doenças

cardiovasculares (BAUER; FUNG, 1991). Acredita-se que os RSNOs não são formados simplesmente pela reação direta do $\text{NO}^\bullet$ com um grupo tiol, visto que o $\text{NO}^\bullet$ é um agente nitrosante fraco em pH fisiológico, sendo mais provável que os RSNOs se formem por espécies nitrosantes geradas pela reação do $\text{NO}^\bullet$ com o oxigênio na presença de agentes redutores como metais de transição, atuando como aceptores de elétrons (GLADWIN et al., 2000; FOSTER; MCMAHON; STAMLER, 2003). Entretanto, ainda é muito discutido se os RSNOs são produzidos pelo $\text{NO}^\bullet$ ou por algum outro agente nitrosante alternativo já que a localização da enzima NOS nos tecidos é associada com um maior número de reações de nitrosação no local (GOW et al., 2002).

A ocorrência dos RSNOs *in vivo* foi descrita durante a década de 90, observado na reação dos grupos tióis da glutathione (GOW; STAMLER, 1998), da cisteína (STAMLER et al., 1997), da albumina (STAMLER et al., 1992a) e da hemoglobina (JIA et al., 1996). A GSNO é considerada o composto mais promissor como agente terapêutico dentre os RSNOs, podendo atuar como um doador de $\text{NO}^\bullet$ através da quebra da ligação entre o enxofre e o nitrogênio, gerando $\text{NO}^\bullet$ e glutathione oxidada (GS – SG), considerada um importante reservatório intracelular de $\text{NO}^\bullet$ (FOSTER; HESS; STAMLER, 2009; CHEN et al., 2013).

1.7. Efeitos do óxido nítrico dependentes de GMPc cíclico na vasculatura

O $\text{NO}^\bullet$ é liberado de forma contínua nos vasos de resistência, dando origem ao tônus vasodilatador e contribuindo para o controle fisiológico da pressão arterial e, por ser muito lipofílico, penetra rapidamente nas células adjacentes onde age como o ativador endógeno da guanilato ciclase solúvel, que leva à formação de GMP cíclico, um importante segundo mensageiro em muitas células, inclusive na musculatura lisa vascular, onde o $\text{NO}^\bullet$ aumenta a produção de GMPc através da sua ligação com o metal de transição do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (IGNARRO et al., 1987). O aumento de GMPc no músculo liso vascular ativa proteínas quinases dependentes de GMPc que por sua vez fosforilam proteínas celulares que causam redução do cálcio intracelular (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; OLIVEIRA-PAULA; TANUS-SANTOS, 2018).

A proteína quinase G (PKG) é responsável pela diminuição das concentrações intracelulares de cálcio através da: i) fosforilação dos canais de cálcio tipo L inibindo sua função (YANG et al., 2007), ii) fosforilação dos canais de potássio dependentes de cálcio, resultando na hiperpolarização da membrana e redução do influxo de cálcio através dos canais

do tipo L (FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010), iii) fosforilação de diversas proteínas no retículo sarcoplasmático promovendo o sequestro de cálcio para o retículo, reduzindo o cálcio intracelular (WALFORD; LOSCALZO, 2003). O cálcio é responsável pela ativação da quinase de cadeia leve de miosina que é responsável por fosforilar a miosina de cadeia leve e promover a interação com filamentos de actina, produzindo força de contração. Portanto, a redução do cálcio causa relaxamento da vasculatura.

A síntese de NO^{*} nas células endoteliais e a sua função nas células musculares lisas vasculares dependentes de GMPc estão resumidas na figura 1.

Figura 1. Resumo da síntese e função de NO nas células musculares lisas. O estímulo externo nas células endoteliais através da estimulação de receptores por moléculas como acetilcolina, norepinefrina e bradicinina, produzem um aumento na concentração de cálcio intracelular. A eNOS é uma enzima que depende do cálcio e da L-arginina para produzir o NO, que irá se difundir para o meio extracelular e para as células musculares lisas vasculares. No meio extracelular, o NO reage rapidamente com o ânion superóxido (O_2^-) para formar o peroxinitrito ($ONOO^-$). Nas células musculares lisas vasculares, o NO ativa a enzima guanilato ciclase que irá promover a formação de GMPc. O GMPc, dentro da célula muscular lisa irá promover relaxamento da musculatura e consequente vasodilatação. O GMPc também pode atuar fora do endotélio e promover redução na adesão de plaquetas e consumir radicais livres. **Fonte:** Adaptado de TOUSOULIS et al., 2012.

Para atuar nas células musculares lisas, o NO^{*} deve agir rapidamente sobre a enzima guanilato ciclase imediatamente após sua síntese nas células endoteliais pela eNOS devida sua alta reatividade com outras moléculas e consequente inativação. Além de se difundir para as

células musculares lisas vasculares adjacentes, o $\text{NO}^\bullet$ também se difunde relativamente distante do local de onde foi produzido, reagindo com moléculas como a hemoglobina das hemácias e o ânion superóxido, ambas capazes de inativar o $\text{NO}^\bullet$. A combinação com o ferro do grupo heme da oxiemoglobina rapidamente converte o $\text{NO}^\bullet$, produzindo metemoglobina e íons nitrato (equação 7) (LANCASTER, 1994). Apesar da imensa quantidade de hemácias na corrente sanguínea para remover moléculas de $\text{NO}^\bullet$ livres no sangue, resta ainda uma quantidade suficiente de bioatividade do $\text{NO}^\bullet$ para exercer controle sobre o tônus vascular. Acredita-se que a remoção do $\text{NO}^\bullet$ pela hemoglobina previna sua ação endócrina na regulação do tônus vascular, mas não impede sua ação parácrina (SCHECHTER; GLADWIN, 2003). O $\text{NO}^\bullet$ também reage muito rapidamente, mesmo com baixas concentrações, com ânion superóxido para produzir o ânion peroxinitrito (equações 8 e 9), que é responsável por alguns de seus efeitos tóxicos. Como dito anteriormente, a meia-vida do $\text{NO}^\bullet$ é de apenas alguns segundos no sangue, porém, ela pode ser estendida significativamente pela enzima superóxido dismutase, evidenciando a importância da reação do $\text{NO}^\bullet$ com o O_2^- para a sua inativação (GRYGLEWSKI; PALMER; MONCADA, 1986). Podemos observar que o nitrato é um produto comum das reações de inativação do $\text{NO}^\bullet$, sendo que a via metabólica do $\text{NO}^\bullet$ derivado do endotélio é a principal fonte de nitrato endógeno no organismo (LUNDBERG et al., 2004), havendo experimentos que demonstram que o $\text{NO}^\bullet$, quando administrado diretamente na circulação, é convertido quase totalmente em nitrato (RASSAF et al., 2002).

Os efeitos do $\text{NO}^\bullet$ no organismo podem mudar drasticamente de uma molécula benéfica para uma molécula citotóxica, dependendo de fatores como estresse oxidativo e sistemas antioxidantes. Os efeitos citotóxicos observados em concentrações mais elevadas de $\text{NO}^\bullet$ relacionam-se com sua química como radical livre diretamente ou através de ânions peroxinitrito, contribuindo para a defesa do hospedeiro, mas também para a destruição de células normais, podendo ser observado após a expressão da iNOS induzida por agentes

estressores, gerando NO• em altas concentrações e comprometendo a função celular pelo estresse nitrosativo (FOSTER; HESS; STAMLER, 2009).

1.8. Efeitos do óxido nítrico independentes de GMP cíclico na vasculatura

Um mecanismo pelo qual o NO• pode ser transportado pelo sangue e realizar seus efeitos em locais distantes de onde é produzido pode ser explicado pela sua reação com peptídeos e proteínas (STAMLER et al., 1992b; JIA et al., 1996; GAUCHER et al., 2012). Os elementos pertencentes ao grupo das espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como o NO•, NO₂, NO⁺ e o ONOO⁻ são importantes moléculas sinalizadoras pela capacidade de reagir e modificar proteínas e outras estruturas celulares, alterando sua função (HARRISON; GONGORA, 2009). De fato, o NO• pode reagir com tióis de peptídeos para formar RSNOs de baixo peso molecular que irão transportar e doar o NO• para outros tióis de proteínas (ALENCAR et al., 2003). Este mecanismo é conhecido como transnitroação e está envolvido na geração e no destino dos RSNOs, sendo o principal mecanismo na transdução de sinal do NO• através da troca reversível do grupo NO• entre um um resíduo de cisteína para outro (equação 10), representando um mecanismo pós-traducional de modificação da função de proteínas, inclusive sobre as proteínas responsáveis pelo tônus vascular (ALENCAR et al., 2003; GAUCHER et al., 2012). Esta reação depende das condições do NO•, os níveis de oxigênio, hidrofobicidade, nucleofilicidade e o estado redox do meio em que o tiol alvo está inserido (SUN; MURPHY, 2010).

A cisteína, um aminoácido presente em diversas proteínas, é particularmente importante nas reações de nitroação por apresentar um grupo tiol em sua cadeia, sendo este grupo responsável pela maioria das reações envolvendo transferência de elétrons e consequente alteração do estado oxidativo, afetando a estrutura e função de proteínas (FOSTER; HESS; STAMLER, 2009). A sinalização causada pela modificação de proteínas *in vivo* pela nitroação é controlada por um equilíbrio bem regulado entre as vias de nitroação e denitroação, que quando desregulado, pode contribuir para a ocorrência de diversos estados patológicos, principalmente as desordens cardiovascular (FOSTER; HESS; STAMLER,

2009). Acredita-se que a S-nitrosoalbumina seja a forma mais abundante de proteína nitrosada circulante no sangue e que ela é responsável por transportar e liberar $\text{NO}^\bullet$ nos leitos vasculares através da transnitrosação com a glutathione reduzida, levando à formação de GSNO que atuará como um segundo mensageiro na propagação da sinalização do $\text{NO}^\bullet$ (GAUCHER et al., 2012). A inibição da eNOS está associada com um aumento compensatório dos RSNOs de baixo peso molecular como a GSNO e queda na albumina nitrosada, evidenciando o equilíbrio da transnitrosação para a produção de RSNOs de baixo peso molecular que são agentes vasodilatadores mais potentes (STAMLER et al., 1992b; GOW et al., 2002). A GSNO é rapidamente degradada em meio biológico, principalmente pela enzima GSNO redutase (GSNOR), que pode ser vista como uma denitrosase por remover o grupo $\text{NO}^\bullet$ da glutathione, gerando GSSG. Apesar da GSNOR não atuar diretamente sobre proteínas nitrosadas, ela influencia intensamente a nitrosação de proteínas por interferir no equilíbrio entre proteínas nitrosadas e a GSNO através da transnitrosação (CHEN et al., 2013). A inibição da GSNOR causa aumento na vasodilatação, aumento de proteínas nitrosadas, atenua a insuficiência cardíaca experimental mas também aumenta a severidade do choque endotóxico, evidenciando o importante papel da GSNO no equilíbrio da nitrosação de proteínas e a importância da GSNO na biodisponibilidade do $\text{NO}^\bullet$ e na preservação de seus efeitos sobre a vasculatura (FOSTER; HESS; STAMLER, 2009). Já foi demonstrado que a depleção de GSNO afeta negativamente os efeitos anti-hipertensivo do tratamento com nitrito de sódio pela via oral, sugerindo que a glutathione e a GSNO podem ser importantes alvos e/ou intermediários para que agentes nitrosantes exerçam seus efeitos anti-hipertensivos (PINHEIRO et al., 2015).

Como já vimos, o ambiente ácido estomacal é um local de grande formação de espécies nitrosantes. Estas espécies podem nitrosar moléculas no lúmen estomacal ou podem se difundir para a corrente sanguínea e nitrosar moléculas alvo na vasculatura (PINHEIRO et al., 2015). Os RSNOs são moléculas extremamente instáveis e se decompõem em $\text{NO}^\bullet$ e seu dissulfeto correspondente em função da temperatura, luz, pH, pressão de oxigênio, concentração de íons metálicos, presença de quelantes e presença de agentes redutores como a vitamina C (L-ascorbato) (GAUCHER et al., 2012). Metais de transição como ferro ou cobre aceleram a degradação dos RSNOs, sendo que o uso do quelantes tornam os RSNOs estáveis por horas e inibem a sua ação vasodilatadora, evidenciando a importância desses agentes redutores nos efeitos biológicos dos RSNOs (GLADWIN et al., 2000). Desta forma, os RSNOs podem atuar sobre a vasculatura através da transnitrosação com resíduos de cisteínas

de proteínas importantes no controle do tônus vascular ou através de sua decomposição, liberando $\text{NO}^\bullet$ diretamente na vasculatura (figura 2).

Figura 2. Geração de RSNO no efeito anti-hipertensivo do nitrito oral. A protonação do nitrito no meio ácido estomacal leva à formação de grandes quantidades de RSNO que pode atuar através da transnitrosação de proteínas que regulam a pressão sanguínea, levando à queda da pressão sanguínea. **Fonte:** Adaptado de OLIVEIRA-PAULA; TANUS-SANTOS, 2018.

Nas últimas décadas, diversos substratos para a nitrosação foram identificados, (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001) assim como uma ampla quantidade de proteínas em que a alteração dos níveis normais de nitrosação estão envolvidos com desordens patológicas, incluindo doenças cardiovasculares (FOSTER; HESS; STAMLER, 2009) evidenciando a ubiquidade da ação regulatória do $\text{NO}^\bullet$ sobre os grupos tíóis de diversas classes de proteínas. Apesar de encontrarmos uma grande quantidade de resíduos de cisteína na maioria das proteínas, a reação de nitrosação depende de uma série de fatores do substrato como a interação eletrostática que controla a nucleofilicidade do grupo tiol, compartimentalização hidrofobicidade, reguladores alostéricos (Ca^{2+} , Mg^{2+} e O_2/redox) que modulam a reatividade

do grupo tiol (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001; FOSTER; MCMAHON; STAMLER, 2003). Estes fatores fazem com que a reação de nitrosação seja bastante seletiva, sendo que as proteínas que já foram identificadas com um ou mais sítios de nitrosação são reguladas pela modificação de apenas um ou alguns poucos resíduos de cisteína. O relaxamento da aorta torácica está correlacionada temporalmente com modificações covalentes de diversos grupos tióis em proteínas presentes em toda parede vascular (GOW et al., 2002) e os componentes da via de sinalização dos GPCRs são excelentes candidatos como alvos da sinalização do NO[•], havendo evidências da regulação da atividade de receptores de serotonina (5-HT₂) (NOZIK-GRAYCK et al., 2002), receptores adrenérgicos (ADAM; BOUVIER; JONES, 1999; NOZIK-GRAYCK et al., 2006), receptores muscarínicos M₂ (ARONSTAM et al., 1995) e receptores de angiotensina (AT₁) (CAHILL et al., 1995). Portanto, o estudo dos mecanismos enzimáticos e não enzimáticos pelo qual o NO[•] regula o sistema cardiovascular possui extrema importância na descoberta de novas formas de tratamento de diversas doenças, incluindo a hipertensão.

1.9. Via de sinalização dos receptores adrenérgicos e seus efeitos sobre o tônus vascular

Os receptores adrenérgicos pertencem à superfamília de GPCR de proteínas que medeiam as ações das catecolaminas endógenas como a noradrenalina e a adrenalina (PIASCIK; PEREZ, 2001). Estas catecolaminas atuam como neurotransmissores e hormônios através de suas ações sobre os receptores adrenérgicos, sendo considerados importantes alvos terapêuticos de fármacos no tratamento da hipertensão arterial (ZHONG; MINNEMAN, 1999). Os receptores adrenérgicos consistem em uma cadeia polipeptídica, apresentando um domínio extracelular N-terminal, sete domínios transmembrana ligados por três alças intra e três extracelulares e uma cauda intracelular C-terminal. (ZHONG; MINNEMAN, 1999; PIASCIK; PEREZ, 2001). Eles se dividem em três subfamílias: α_1 , α_2 e β , baseado em suas propriedades farmacológicas, estrutura e mecanismos de sinalização (ZHONG; MINNEMAN, 1999).

Os receptores adrenérgicos atuam através da ativação de proteínas G, que podem estimular a enzima adenilato ciclase (proteína G_s), inibir a enzima adenilato ciclase (proteína G_i) ou ativar a fosfolipase C (proteína G_q). Todos os receptores α_1 -adrenérgicos se ligam à proteína G_q, sendo particularmente importante terapeuticamente no controle da pressão sanguínea arterial, visto que estão intimamente ligados à regulação da RVP, função cardíaca e

crescimento de células vasculares e miocárdicas (ZHONG; MINNEMAN, 1999; CHALOTHORN et al., 2003; JENSEN; O'CONNELL; SIMPSON, 2011). A via de sinalização padrão dos receptores α_1 -adrenérgico envolve a sua ligação com um agonista, causando ativação da proteína G da família $G_{q/11}$. Esta ativação faz com que as subunidades α e β/γ da proteína G se dissociam para ativar a fosfolipase C β (PLC β). Esta enzima catalisa a formação de diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP $_3$) através da hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP $_2$). O IP $_3$ se liga à receptores do retículo endoplasmático, causando a liberação de Ca $^{2+}$ dos reservatórios intracelulares enquanto o DAG, através de sua ação sinérgica com o Ca $^{2+}$, causa ativação da proteína quinase C (PKC), responsável pela fosforilação de proteínas específicas na célula, mudando suas funções (ZHONG; MINNEMAN, 1999; NOZIK-GRAYCK et al., 2006; HEIN; MICHEL, 2007; JENSEN; O'CONNELL; SIMPSON, 2011). Além desta via padrão, os receptores α_1 -adrenérgicos também são responsáveis por ativar uma variedade de outras moléculas sinalizadoras através de eventos envolvendo canais iônicos, transportadores, proteínas quinases, fatores de transcrição e proteínas relacionadas com o controle do ciclo celular (HEIN; MICHEL, 2007).

A resposta celular causada pela estimulação de um receptor α_1 -adrenérgico é regulada de forma dinâmica por diversos mecanismos que alteram a quantidade de receptores aptos para interagirem com os agonistas nas células. Esta alteração pode ocorrer pela internalização de receptores presentes na membrana plasmática, em um rápido processo induzido por uma alta concentração de agonistas, ou pela regulação negativa (down regulation) da densidade de receptores, em um processo longo de exposição ao agonista (HEIN; MICHEL, 2007). A sinalização dos GPCRs pode ser rigidamente controlada por uma família de proteínas quinases (GRKs) através da fosforilação destes receptores, aumentando sua afinidade pela β -arrestina que então desacopla o receptor fosforilado da proteína G e induz o receptor para a internalização (PIASCIK; PEREZ, 2001). Como já citado neste trabalho, a atividade e expressão dos GPCRs também podem ser reguladas através da sinalização do NO * independente do GMPc. Já foi demonstrado que a indução da vasoconstrição mediada pela fenilefrina em anéis de artérias pulmonares foi inibida pelo pré-tratamento com GSNO e que os mecanismos de ação independem da via GMPc/PKG, sugerindo que a GSNO inibe a vasoconstrição induzida pela fenilefrina através de um mecanismo reversível, independente do GMPc que diminui a quantidade de sítios de ligação do receptor α_1 -adrenérgico (NOZIK-GRAYCK et al., 2006). Desta forma, há diversas evidências que sugerem que a nitrosação de GPCRs envolvidos no controle da pressão arterial reduzem a sinalização vasoconstritora em

vasos sanguíneos, representando um possível mecanismo de ação do nitrito de sódio que poderia explicar os seus efeitos anti-hipertensivos pela via oral.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

Diante do exposto, a hipótese do presente estudo é que o tratamento com nitrito de sódio por via oral, ao favorecer a formação de nitrosotióis no estômago, é capaz de promover a nitrosação do receptor α_1 -adrenérgico vascular ou de proteínas relacionadas à cascata de sinalização mediada por este receptor, resultando na redução da vasoconstrição e da pressão arterial, o que explicaria, ao menos em parte, os efeitos anti-hipertensivos do nitrito.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar se o tratamento com nitrito de sódio por via oral é capaz de produzir resposta anti-hipertensiva através da formação de S-nitrosotióis associados ao aumento da nitrosação proteica vascular e redução da resposta aórtica à fenilefrina.

3.2. Objetivos específicos

- (A) Avaliar se o tratamento com nitrito de sódio em ratos normotensos e hipertensos é capaz de alterar as concentrações de nitrito e espécies nitrosadas no plasma.
- (B) Avaliar se o tratamento com nitrito de sódio por via oral afeta a reatividade da aorta ao agonista do receptor α_1 -adrenérgico fenilefrina.
- (C) Avaliar se a incubação de anéis de aorta com nitrito de sódio afeta a reatividade vascular ao agonista do receptor α_1 -adrenérgico fenilefrina.
- (D) Avaliar se a pré-incubação com ascorbato afeta a reatividade da aorta ao agonista do receptor α_1 -adrenérgico fenilefrina em ratos tratados com nitrito de sódio por via oral.
- (E) Avaliar os efeitos da incubação de anéis de aorta com o nitrosotiol S-nitrosoglutathione sobre a reatividade vascular à fenilefrina.
- (F) Avaliar se a pré-incubação com ascorbato afeta a reatividade da aorta ao agonista do receptor α_1 -adrenérgico fenilefrina em anéis incubados com o nitrosotiol S-nitrosoglutathione.
- (G) Avaliar os efeitos da incubação de anéis de aorta com o nitrosotiol S-nitrosoglutathione sobre a nitrosação de proteínas na vasculatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Ratos Wistar machos com peso entre 180g e 250 g foram obtidos da colônia da USP e mantidos em períodos de 12 h de luz a 25°C, com acesso livre a comida e água. O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (Processo 068/2017).

4.2. Abordagem experimental I

Nesta abordagem experimental foram utilizados ratos normotensos (sham) e hipertensos dois rins, um clipe (2R1C), divididos em quatro grupos experimentais: a) sham tratado com veículo; b) sham tratado com nitrito de sódio por gavagem (15 mg/kg); c) 2R1C tratado com veículo; d) 2R1C tratado com nitrito de sódio por gavagem (15 mg/kg). O tratamento foi realizado uma vez ao dia, por um período de 7 dias. No sétimo dia de tratamento, os animais foram eutanasiados 2 horas após o último tratamento e tiveram plasma e aorta coletados.

4.3. Indução da hipertensão 2R1C

A hipertensão arterial foi induzida pela inserção de um clipe de prata (abertura de 0,2 milímetros) na artéria renal esquerda de ratos wistar (180-200g). Os animais controle (sham) foram submetidos apenas à laparotomia abdominal, sem introdução do clipe. O anestésico e o relaxante muscular utilizados foram ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), respectivamente, via intraperitoneal. Os animais tiveram a pressão sistólica e o peso corporal aferidos semanalmente. O monitoramento da pressão sanguínea foi feito semanalmente em um aparelho de pletismografia de cauda usando o Pletismógrafo EFF306 (Insight, Brasil) e foram considerados hipertensos aqueles que tiveram aumento na pressão arterial superior a 30 mmHg ao final da segunda semana após a cirurgia, quando tiveram início os tratamentos descritos acima.

4.4. Determinação das concentrações de nitrito e espécies nitrosadas

As concentrações de nitrito nas amostras de plasma foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio, conforme descrito previamente (FEELISCH et al., 2002). Resumidamente, amostras do plasma dos animais foram injetadas em duplicata no aparelho contendo solução de 5 ml de tri-iodeto acidificada (2g iodeto de potássio e 1,3g de iodo dissolvidos em 40 ml de água com 140 ml de ácido acético). A solução de tri-iodeto acidificada reduz o nitrito e as espécies nitrosadas em NO^* que é então carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO^* (Sievers Modelo 280 NO analyzer, Boulder, CO). Os dados obtidos foram analisado pelo programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) através da medida da área sobre a curva. Para a quantificação de espécies nitrosadas, foi adicionada à amostra sulfanilamida ácida (5% em HCl 1 mol/l) na proporção de 10% do volume da amostra para eliminar o sinal do nitrito. Após 5 minutos de reação 500 μl de amostra foram injetados no analisador como descrito acima.

4.5. Estudo de reatividade aórtica

A reatividade vascular foi estudada a partir de curvas concentração-resposta para fenilefrina (10^{-10} a 10^{-5} M). Foram retirados anéis de 4 mm de comprimento e inseridos entre dois fios de aço, posteriormente conectados a um transdutor de força para medir a tensão dos vasos. Os anéis foram então colocados em câmara para órgão isolado contendo solução fisiológica de Krebs (NaCl 130 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, NaHCO_3 14,9 mM, glicose 5,5 mM, e CaCl_2 1,6 mM), pH 7,4, sob aeração com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2), a 37°C. As preparações permaneceram em repouso por 60 min, sob tensão basal de 1,5 g, para estabilização. Na sequência, os anéis foram pré-contráídos com fenilefrina 10^{-7} M, para a avaliação da integridade do endotélio. Os anéis foram considerados íntegros quando estes apresentaram relaxamento à acetilcolina (10^{-6} M) de no mínimo 80%. Por fim, as aortas foram submetidas à curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-10} a 10^{-5} M) na presença e ausência de ascorbato 10 mM. Dois parâmetros foram avaliados através da curva concentração-efeito, o pD_2 , que representa o logaritmo negativo da concentração de uma substância que produz metade da resposta máxima que essa substância é capaz de causar e o E_{max} que representa o efeito máximo que a fenilefrina foi capaz de causar na contração dos vasos.

4.6. Abordagem experimental II

Buscando confirmação adicional dos possíveis impactos funcionais da nitrosação vascular, avaliamos se a nitrosação induzida agudamente pela incubação da aorta com RSNOs reduz as respostas contráteis às concentrações crescentes de fenilefrina. Após cinco minutos de incubação com GSNO 250 μ M, as preparações foram lavadas com solução de Krebs inúmeras vezes para a retirada de toda GSNO presente na solução. Em seguida, os vasos foram submetidos às curvas concentração-efeito para fenilefrina (10^{-10} a 10^{-5} M) na presença e ausência de ascorbato 10 mM. Além disso, para avaliar se o nitrito por si só seria capaz de afetar a vasoconstrição adrenérgica, curvas concentração-efeito para fenilefrina nas mesmas concentrações foram construídas na presença e ausência de nitrito de sódio (10^{-4} M).

4.7. SNO-RAC

Amostras dos grupos experimentais pré-incubados com GSNO descritos acima foram avaliadas quanto à nitrosação vascular total por meio da técnica SNO-RAC. A técnica baseia-se na captura de resíduos S-nitrosados (RS-NO) através da resina tiopropilsefaroze e foi realizada conforme descrito previamente (FORRESTER et al., 2009). Os homogenatos de tecido, que possuem ou não proteínas S-nitrosadas, sofreram processo de desnaturação e bloqueio dos tióis livres por SDS 2,5% e metilmetanotiosulfonato (MMTS) 20 mM, respectivamente, seguido de remoção do MMTS excedente por precipitação com acetona. Em seguida, a amostra foi incubada com ascorbato 20 mM para promover decomposição dos nitrosotióis, que ocorre por meio do ataque do ascorbato (que atua como nucleófilo) ao átomo de nitrogênio do grupo nitroso dos RSNOs, resultando na formação de tiol e O-nitrosoascorbato, que se decompõe e forma dehidroascorbato e NO^* . Concomitante à adição de ascorbato, adicionou-se também 40 μ L de resina tiopropilsefaroze, cuja função é marcar os tióis livres provenientes da decomposição dos nitrosotióis. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. A amostra foi incubada com tampão de eluição, o qual contém o agente redutor 2-mercaptoetanol 2%. A amostra foi então centrifugada, de modo que a resina tiopropilsefaroze precipita e as proteínas nitrosiladas ficam no sobrenadante, o qual é coletado e armazenado. O sobrenadante foi utilizado para identificação das proteínas nitrosadas totais por SDS-PAGE utilizando Coomassie Blue 0,05%, com posterior quantificação pelo programa ImageJ.

4.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados com teste t de student ou ANOVA (análise de variância) de duas vias e foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas com valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Tratamento diário de nitrito de sódio sobre a pressão arterial

Através da abordagem experimental I, podemos observar na figura 3A as medidas de pressão arterial semanal nos animais Sham e 2R1C durante 3 semanas, tratados com nitrito de sódio ou veículo após duas semanas da indução de hipertensão, para garantir que todos animais estavam realmente hipertensos. Todos os grupos experimentais apresentaram semelhante pressão sistólica basal. Nos ratos 2R1C, a pressão aumentou após uma semana da cirurgia e continuou aumentando após duas semanas de cirurgia. Ao final da terceira semana, ou seja, após 7 dias de tratamento com nitrito ou veículo, podemos observar uma significativa diferença entre os animais 2R1C, havendo uma queda na pressão arterial sistólica dos animais tratados com nitrito quando comparados com os animais 2R1C tratados com veículo (Fig. 3A; $P < 0,05$), que não demonstraram esta queda na pressão sistólica. Os animais que foram submetidos apenas à laparotomia abdominal, sem introdução do clipe (sham) não tiveram alterações expressivas sobre a pressão arterial sistólica. Também podemos observar na figura 3B que os tratamentos com veículo ou nitrito não alteram o peso corporal, tanto em animais do grupo 2R1C quanto em animais do grupo Sham.

Figura 3. Medidas semanais da pressão sistólica e do peso corporal. (A) medida da pressão arterial sistólica (mmHg) através da pletismografia de cauda e (B) peso corporal em ratos 2R1C e Sham tratados com nitrito de sódio ou veículo por 7 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. $n = 8 - 9$ por grupo. * $P < 0,05$ versus Sham. # $P < 0,05$ versus 2R1C Veículo.

5.2. Tratamento diário de nitrato de sódio sobre a concentração de nitrato e espécies nitrosadas no plasma

Ainda na abordagem experimental I, podemos observar na figura 4A e 4B as quantidades de nitrato e espécies nitrosadas (RXNO) no plasma dos quatro grupos experimentais. O nitrato é um produto da via L-arginina e portanto, sua medida é um importante indicativo das condições vasculares fisiológicas e/ou patológicas, capaz de refletir a biodisponibilidade do NO[•] (KLEINBONGARD et al., 2003). Na figura 4, podemos observar que os níveis de nitrato plasmático e espécies nitrosadas são significativamente maiores nos grupos tratados com nitrato de sódio comparados com os grupos tratados com veículo. Nos grupos sham, a concentração de nitrato no plasma foi de $0,32 \pm 0,05 \mu\text{mol/l}$ para o tratamento com veículo e $4,64 \pm 0,92 \mu\text{mol/l}$ para o tratamento com nitrato (figura 4A; $P < 0,05$) enquanto que nos grupos 2R1C, a concentração de nitrato no plasma foi de $0,44 \pm 0,04 \mu\text{mol/l}$ para o tratamento com veículo e $4,97 \pm 1,51 \mu\text{mol/l}$ para o tratamento com nitrato (figura 4A; $P < 0,05$). O mesmo perfil ocorre para os níveis de espécies nitrosadas no plasma dos grupos sham, onde a concentração de espécies nitrosadas no plasma foi de $6,57 \pm 1,30 \mu\text{mol/l}$ para o tratamento com veículo e $17,63 \pm 5,23 \mu\text{mol/l}$ para o tratamento com nitrato (figura 4B; $P < 0,05$) e dos grupos 2R1C, onde a concentração de espécies nitrosadas no plasma foi de $4,46 \pm 0,58 \mu\text{mol/l}$ para o tratamento com veículo e $21,69 \pm 7,32 \mu\text{mol/l}$ para o tratamento com nitrato (figura 4B; $P < 0,05$). Estes resultados nos sugerem que o tratamento com nitrato de sódio pela via oral é capaz de aumentar tanto as quantidades de nitrato quanto a quantidade de espécies nitrosadas no plasma.

Figura 4. Medidas de NO₂⁻ e RXNO plasmático. Foi utilizado o método de quimiluminescência através de ozônio demonstrando a concentração plasmática de (A) nitrato e (B) espécies nitrosadas (RXNO) em ratos sham e 2R1C que receberam nitrato (15 mg/kg) ou veículo durante 7 dias. Os dados são apresentados como média ± EPM. n = 8 – 9 por grupo. * P < 0,05 versus veículo.

5.3. Tratamento diário de nitrito de sódio sobre a reatividade da aorta à fenilefrina

Para avaliar se há alteração na reatividade vascular de ratos tratados com nitrito, a aorta dos animais, ao final da abordagem experimental I, foi incubada com concentrações crescentes de fenilefrina. Podemos traçar uma curva concentração-efeito (figura 5A) e observarmos dois parâmetros desta curva: o pD2 (figura 5B) e o efeito máximo (E_{max}) (figura 5C). Observando os ratos tratados com veículo na figura 5C, notamos que nos ratos hipertensos (2R1C) há um aumento do efeito máximo ($2,12 \pm 0,07$ g) comparado com os ratos normotensos ($1,51 \pm 0,07$ g) (figura 5C; $P < 0,05$), sugerindo que a hipertensão altera a maquinaria contrátil dos vasos sanguíneos. No entanto, os ratos hipertensos tratados com nitrito demonstram uma redução no efeito máximo ($1,39 \pm 0,05$ g) quando comparado com os grupos 2R1C tratados com veículo (figura 5C; $P < 0,05$), apresentando um efeito muito semelhante ao efeito máximo dos ratos normotensos. Isto nos sugere que o tratamento com nitrito é capaz de restaurar as alterações causadas pela hipertensão sobre a sinalização do receptor α_1 -adrenérgico, reduzindo a resposta aórtica à fenilefrina. Os grupos experimentais não apresentaram diferenças quanto ao pD2.

Figura 5. Reatividade vascular de animais após o tratamento de 7 dias. (A) Curva concentração efeito da contração da aorta estimulada com fenilefrina em doses crescentes. (B) pD2. (C) Efeito Máximo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. $n = 4 - 7$ por grupo. * $P < 0,05$ versus nitrito 2R1C ou veículo sham.

5.4. Avaliação do papel da nitrosação nos efeitos do tratamento com nitrito de sódio

A nitrosação de proteínas na parede dos vasos sanguíneos pode estar relacionada com a ação do tratamento com nitrito em reduzir a pressão arterial e diminuir a reatividade vascular da aorta. Para buscar evidências dos possíveis impactos funcionais da nitrosação vascular, avaliamos a aorta dos ratos tratados com doses diárias de nitrito ou veículo, submetidas à curvas concentração-efeito para fenilefrina na presença ou ausência de ascorbato. Altas doses de ascorbato estão associados com a destruição de RSNOs derivados do nitrito e diminuição dos efeitos anti-hipertensivos do nitrito administrado pela via oral (SMITH; DASGUPTA, 2000; PINHEIRO et al., 2018). Como já observado, há uma diferença no E_{max} dos ratos 2R1C tratados com veículo e dos ratos tratados com nitrito. Porém, esta diferença é abolida quando as aortas dos animais são contraídas na presença de ascorbato. Os

ratos 2R1C tratados com nitrito apresentam um E_{max} de $1,39 \pm 0,05$ g, porém, na presença de ascorbato o E_{max} dos ratos 2R1C tratados com nitrito aumenta para $2,06 \pm 0,08$ g (figura 6C; $P < 0,05$). Este resultado nos sugere uma participação importante da nitrosação na redução da resposta aórtica à fenilefrina. Nos ratos Sham, não houve alteração no E_{max} na presença ou ausência de ascorbato. Também não houve diferença entre o pD_2 em nenhum dos grupos de tratamento.

Figura 6. Influência do ascorbato na reatividade vascular de animais após o tratamento de 7 dias. (A e D) Curva concentração efeito da contração da aorta estimulada com fenilefrina em doses crescentes para animais 2R1C e sham respectivamente. (B e E) pD2 para animais 2R1C e sham respectivamente. (C e F) Efeito Máximo para

animais 2R1C e sham respectivamente. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. $n = 4 - 7$ por grupo.
 * $P < 0,05$ versus 2R1C Nitrito + ascorbato.

5.5. Avaliação da capacidade do nitrito em alterar a reatividade vascular aórtica

Através da abordagem experimental II, a figura 7 nos mostra que a incubação de anéis de aorta na presença de nitrito não causa nenhum efeito sobre o E_{max} nem sobre o pD_2 (figura 7B e 7C; $P > 0,05$). Este resultado nos sugere que o nitrito não é o responsável direto pela ação sobre a sinalização da fenilefrina, mas que talvez haja a ação de um composto intermediário, derivado do nitrito, capaz de nitrosar proteínas dos vasos sanguíneos.

Figura 7. Curva de concentração-efeito para fenilefrina de aortas incubadas na presença ou ausência de nitrito de sódio. (A) Curva concentração-efeito da contração da aorta estimulada com fenilefrina em doses crescentes. (B) pD_2 . (C) Efeito Máximo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. $n = 4 - 5$ por grupo.

5.6. Avaliação da capacidade da S-nitrosoglutationa em alterar a reatividade vascular aórtica

A figura 8 nos mostra a curva concentração-efeito da incubação de anéis de aorta incubados com GSNO 250 μ M por cinco minutos e lavados para sua total remoção. Posteriormente, os anéis foram submetidos às curvas para fenilefrina na presença ou ausência de ascorbato. Podemos observar na figura 8C que a GSNO foi capaz de reduzir o E_{max} , sendo que o E_{max} do grupo veículo foi de $1,85 \pm 0,10$ g enquanto que o do grupo tratado com GSNO foi de $0,75 \pm 0,07$ g (figura 8C; $P < 0,05$), sugerindo que a GSNO é capaz de agir sobre a vasculatura, alterando a resposta dos vasos à estimulação com fenilefrina. Mais do que isso, os resultados nos mostra que o E_{max} do grupo pré-incubado com GSNO são inibidos na presença do ascorbato ($1,77 \pm 0,10$ g), sugerindo que possivelmente, as ações da GSNO na vasculatura se baseiam na nitroação de alvos responsáveis pela contração das células musculares lisas vasculares. Não houve diferença entre o pD2 dos diferentes grupos.

Figura 8. Curva de concentração-efeito de anéis de aorta pré-incubados com S-nitrosoglutationa. A GSNO foi pré-incubada por cinco minutos, lavadas com solução de Krebs para sua total remoção e posteriormente

submetidos a curvas para fenilefrina na presença ou ausência de ascorbato (10 mM). Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. $n = 4 - 7$ por grupo. * $P < 0,05$ versus Veículo ou GSNO + Ascorbato.

5.7. Avaliação da quantidade de proteínas S-nitrosadas nos vasos aórticos

Através da abordagem experimental II, foram avaliadas a nitrosação vascular total por meio da técnica SNO-RAC. Podemos observar pela figura 9 que a incubação com GSNO aumenta significativamente a porcentagem de proteínas nitrosadas ($32,24 \pm 5,96$) comparada com o grupo veículo ($13,56 \pm 1,19$) (figura 9B; $P < 0,05$). Observamos também que o ascorbato é responsável por inibir o efeito da GSNO, restaurando a quantidade de proteínas nitrosadas aos níveis basais ($17,32 \pm 3,74$) (figura 9B; $P < 0,05$). Estes resultados se correlacionam com os efeitos da GSNO sobre a reatividade vascular e nos sugerem que a GSNO é capaz de nitrosar diversas proteínas da vasculatura e este efeito pode estar correlacionado com a queda da resposta vascular à fenilefrina.

Figura 9. Nitrosação vascular total da aorta pelo método de SNO-RAC. (A) Imagem representativa da técnica de SNO-RAC das aortas tratadas com GSNO ou veículo na presença ou não de ascorbato, em que “i” = input (homogenato de tecido total) e “o” = output (proteínas nitrosadas extraídas). (B) Porcentagem de proteínas nitrosadas. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. $n = 4 - 7$ por grupo. * $P < 0,05$ versus Veículo ou GSNO + Ascorbato.

6. DISCUSSÃO

As principais observações deste trabalho foram: i) a administração de nitrito de sódio durante 7 dias em ratos hipertensos é responsável pela queda de pressão arterial, aumento das concentrações plasmáticas de nitrito e espécies nitrosadas e redução da reatividade vascular à fenilefrina, sendo que a redução da reatividade vascular é abolida na presença de ascorbato. ii) a reatividade vascular aórtica não é afetada pela presença de nitrito de sódio, porém, a pré-incubação com GSNO foi responsável por reduzir a resposta da aorta à fenilefrina, sendo que este efeito também é abolido na presença de ascorbato. iii) a pré-incubação de anéis de aorta com GSNO causa um aumento na quantidade de proteínas nitrosadas e este efeito é abolido na presença de ascorbato.

Como já citado, a etiologia exata da hipertensão ainda é em muitos casos indefinida, de modo que mais de 90% dos pacientes são diagnosticados com hipertensão essencial, ou seja, hipertensão sem etiologia conhecida (TOUYZ; BRIONES, 2011; BROZOVICH et al., 2016). O tratamento com nitrito de sódio é capaz de reduzir a pressão arterial em casos de hipertensão, porém, o mecanismo de ação para seus efeitos anti-hipertensivos não são totalmente esclarecidos. Há um grande número de estudos que conseguiram demonstrar diversos efeitos do tratamento com nitrito correlacionados com seus efeitos anti-hipertensivos, evidenciando mecanismos multifatoriais de queda de pressão. Mesmo com tantas evidências, ainda há muitas questões sobre o mecanismo de ação do nitrito de sódio, principalmente com novas descobertas envolvendo a fisiopatologia das alterações do controle da pressão arterial. Sendo assim, é essencial que haja estudos que nos forneçam uma maior compreensão sobre os mecanismos fisiológicos do controle da pressão arterial e como podemos modular estes mecanismos em situações patológicas.

Os efeitos anti-hipertensivos do tratamento oral com nitrito de sódio duram aproximadamente 24h após sua administração, sugerindo um mecanismo de ação de longa duração (MONTENEGRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2015). Embora o mecanismo de ação anti-hipertensivo mais provável do nitrito seja o aumento da quantidade de nitrito circulante, capaz de gerar NO^* pela sua redução através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (COSBY et al., 2003), estudos recentes demonstraram que a infusão intravenosa de nitrito, mesmo proporcionando uma alta quantidade de nitrito circulante, não é capaz de causar uma queda na pressão arterial de forma expressiva (MONTENEGRO et al., 2014). Isto

nos sugere que a administração oral de nitrito de sódio favorece a formação de outras espécies nitrosantes e o N_2O_3 e o NO^+ , formados pela reação do nitrito no ambiente ácido estomacal, são prováveis candidatos. Uma evidência que corrobora esta afirmação é a de que o aumento do pH estomacal é responsável por inibir os efeitos anti-hipertensivos da administração oral de nitrito de sódio, ainda que haja um aumento nas concentrações de nitrito circulante (PINHEIRO et al., 2015). Já vimos que os RSNOs são formados em grandes quantidades em condições ácidas (FOSTER; MCMAHON; STAMLER, 2003) através de agentes nitrosantes e que estas moléculas são capazes de transportar e doar o NO^* (ALENCAR et al., 2003) em regiões relativamente distantes do local onde são produzidos. Portanto, podemos inferir que o nitrito de sódio pode possuir ação vasodilatadora intrínseca, mas provavelmente não muito intensa, e que seus efeitos anti-hipertensivos se baseiam mais na geração de RSNOs no ambiente ácido estomacal do que na formação de NO^* nos tecidos. Consistentemente com esta sugestão, nós demonstramos neste trabalho que o tratamento com nitrito de sódio oral é capaz de provocar um aumento nos níveis de nitrito e espécies nitrosadas no plasma, porém, a incubação com nitrito de sódio com anéis de aorta não exercem nenhum efeito sobre a reatividade vascular, enquanto que a GSNO é capaz de provocar uma queda na reatividade da vasculatura.

Ainda assim, é improvável que o pequeno aumento de RSNOs circulantes gerado pelo tratamento com nitrito seja capaz de gerar NO^* suficiente para exercer seus efeitos anti-hipertensivos por um longo período de tempo. Alguns doadores de NO^* como os RSNOs de baixo peso molecular são capazes de causar um efeito vasodilatador de longa duração *in vitro* e *in vivo*, mesmo após a remoção do doador de NO^* , sendo improvável que estes efeitos de longa duração ocorram pela via do GMP cíclico, visto que o NO^* possui uma meia-vida em meio biológico extremamente curta e a reação do NO^* com o grupo heme da guanilato ciclase é um processo reversível (ALENCAR et al., 2003). A nitrosação de resíduos de cisteínas em proteínas através da transferência de NO^+ (forma oxidada do NO^*) para um grupo tiol ($-SH$) da cisteína representa um importante mecanismo de sinalização pelo NO^* com efeitos de longa duração devida modificação pós-traducional de proteínas (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001). Já foi demonstrado que a exposição de vários tipos de artérias ao GSNO produz um aumento nas quantidades de NO^* e GMPc assim como um aumento na nitrosação em resíduos de cisteínas (ALENCAR et al., 2003). No entanto, é mais provável que os efeitos anti-hipertensivos duradouros dos RSNOs se baseiam no aumento da nitrosação de alvos proteicos com função crítica no controle do tônus vascular (PINHEIRO et al., 2015). Este

trabalho corrobora esta afirmação visto que foi demonstrado que a GSNO é capaz de reduzir a reatividade vascular da aorta, mesmo quando removida da cuba. Além disso, a incubação com ascorbato foi responsável por abolir este efeito sobre a reatividade vascular da aorta promovido pela GSNO, evidenciando o papel crítico da nitrosação de proteínas nos efeitos anti-hipertensivos dos RSNOs.

A hipertensão renovascular é causada pela redução na perfusão renal, fazendo com que o rim aumente a produção de renina, ativando o RAAS e aumentando a concentração de angiotensina II circulante, sendo que esta disfunção pode ser reproduzida em modelos animais através do método 2R1C (DOGGRELL; BROWN, 1998). Vários efeitos fisiopatológicos da angiotensina II se dão pela sua capacidade de ativar a enzima NADPH oxidase, uma importante enzima na geração de EROs nos vasos sanguíneos, promovendo o desequilíbrio na presença de moléculas oxidantes e antioxidantes, conhecido como estresse oxidativo, e aumentando a reatividade vascular (HARRISON; GONGORA, 2009). Considerando que a hipertensão induzida pelo método 2R1C está associada com um aumento do estresse oxidativo, o tratamento com nitrito através do seu efeito de doar moléculas de NO^* poderia ser limitado (MONTENEGRO et al., 2011), evidenciando mais uma vez a maior probabilidade dos efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio estarem relacionados com a nitrosação de proteínas da vasculatura. O desequilíbrio no estado redox provocado na hipertensão pode fazer com que haja maior consumo do NO^* e consequentemente menores quantidades de RXNO. Desta forma, é possível que o modelo de indução de hipertensão 2R1C reduza a biodisponibilidade de RXNO na vasculatura, sendo que já foi observado um aumento nos níveis de EROs em aortas de ratos 2R1C em comparação com ratos sham (OLIVEIRA-PAULA et al., 2016), podendo haver redução da ocorrência de reações de nitrosação. Além disso, efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio podem estar correlacionados com seu efeito antioxidante em artérias, provavelmente pela sua ação de diminuição da atividade da enzima NADPH oxidase (MONTENEGRO et al., 2011), reduzindo a quantidade de EROs, reduzindo o estresse oxidativo e consequentemente aumentando a biodisponibilidade de NO^* (LING et al., 2018) e aumentando a ocorrência de reações de nitrosação.

A relação entre as EROs e a hipertensão provavelmente ocorre no nível molecular, onde o estresse oxidativo causa disfunção endotelial, diminuição da reatividade vascular à agonistas vasodilatadores e remodelamento vascular, levando ao aumento da RVP e elevação da pressão arterial (HARRISON; GONGORA, 2009). Pode ser sugerido que o estresse oxidativo diminua a biodisponibilidade de agentes nitrosantes na vasculatura, reduzindo a ocorrência de

reações de nitrosação de proteínas, alterando a estrutura e função de proteínas com potencial ação reguladora sobre o tônus vascular. A nitrosação do receptor α_1 -adrenérgico de artérias pulmonares parece inibir a vasoconstrição e a sua ligação com agonistas através da diminuição dos sítios de ligação, sem interferir de forma significativa na afinidade (NOZIK-GRAYCK et al., 2006). O efeito de diminuir a interação entre o receptor e o agonista pela nitrosação já foi demonstrado também para o receptor AT_1 (LECLERC et al., 2006), evidenciando um efeito consolidado da nitrosação de alterar a reatividade entre o receptor e seu agonista, possivelmente através de alterações pós-traducionais do receptor. Este fenômeno poderia explicar os resultados encontrados neste trabalho quanto à redução da vasoconstrição estimulada pela fenilefrina sobre receptores α_1 -adrenérgicos presentes na aorta de ratos tratados com nitrito de sódio durante 7 dias e em anéis de aortas pré-incubados com GSNO, visto que o receptor α_1 -adrenérgico em ratos possui 14 resíduos de cisteína que são alvos potenciais de nitrosação (NOZIK-GRAYCK et al., 2006). Diversos agentes terapêuticos que afetam a nitrosação estão sendo investigados pelo seu potencial em restaurar a deficiente nitrosação de proteínas para níveis fisiológicos ou influenciar a sinalização celular que é modulada pela S-nitrosação (FOSTER; HESS; STAMLER, 2009) e o nitrito de sódio poderia se enquadrar nesta classificação por restaurar a nitrosação no tecido vascular promovendo assim seus efeitos anti-hipertensivos.

Neste trabalho, identificamos que há um aumento na quantidade de proteínas nitrosadas no tecido aórtico com a pré-incubação com GSNO e que este efeito é abolido com a incubação de ascorbato. Estes efeitos se relacionam com a reatividade vascular da aorta, no qual o pré-tratamento com GSNO é capaz de reduzir a capacidade de contração da aorta e este efeito também é abolido pelo ascorbato. Baseado nestes resultados, não há como afirmar qual alvo molecular específico da nitrosação é responsável pelos efeitos anti-hipertensivos. Apesar de sugerir que o receptor α_1 -adrenérgico seja um possível alvo para a nitrosação e redução da reatividade vascular na aorta, há diversos subtipos do receptor que poderiam estar envolvidos. A subfamília de receptores α_1 consistem nos três subtipos homólogos α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} . Os três subtipos de receptores são ativados pela noradrenalina e adrenalina e bloqueados pelo antagonista prazosina, mas apresentam significativas diferenças em relação à sequência de aminoácidos, gene codificante, sinalização, distribuição tecidual e localização celular (PIASCIK; PEREZ, 2001; NOZIK-GRAYCK et al., 2006; HEIN; MICHEL, 2007; JENSEN; O'CONNELL; SIMPSON, 2011). Dados gerados de diferentes vasos sanguíneos isolados demonstram uma diversidade na modulação da contração da vasculatura pelos receptores α_1 -

adrenérgicos. Apesar de encontrarmos RNA mensageiro e proteína de receptor de todos subtipos de receptores α_1 -adrenérgico em artérias periféricas de ratos e humanos, acredita-se que haja um subtipo do receptor α_1 -adrenérgico dominante na resposta da contração dos vasos sanguíneos e que cada leito vascular apresente um subtipo dominante (PIASCIK; PEREZ, 2001). Esta hipótese é sustentada pela evidência de que os receptores α_{1A} são dominantes na regulação da contração das artérias renais e caudais enquanto que receptores α_{1D} são dominantes na contração da artéria femoral, ilíaca, mesentérica superior e aorta (PIASCIK et al., 1997; HROMETZ et al., 1999). Há poucas evidências da ação dos receptores α_{1B} como um mediador da contração de vasos sanguíneos, sugerindo que os receptores α_{1B} possuem atividade mínima na regulação da função vascular (CHALOTHORN et al., 2003). Estes estudos não são capazes de elucidar qual a contribuição de cada subtipo do receptor no controle integrado da pressão arterial sistêmica. Em camundongos, o knockout do receptor α_{1A} -adrenérgico causa uma redução na pressão arterial e uma redução na resposta à fenilefrina (ROKOSH; SIMPSON, 2002). Estas mesmas respostas são encontradas em knockout do receptor α_{1D} -adrenérgico (CHALOTHORN et al., 2003). A hipertensão causa um aumento na expressão dos receptores α_{1A} e α_{1D} em aorta de ratos e já foi proposto que o aumento na função do receptor α_{1D} -adrenérgico está envolvido com o aumento da RVP em artérias de ratos hipertensos (RODRÍGUEZ et al., 2017). Portanto, é provável que a sinalização do receptor α_{1D} -adrenérgicos seja responsável pelos resultados encontrados neste trabalho.

Em resumo, sabemos que os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio já foram demonstrados em modelos animais de hipertensão (MONTENEGRO et al., 2011) mas os seus mecanismos de ação não foram completamente elucidados. Há evidências de que os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio se baseiam na geração de RSNO no estômago, havendo uma correlação muito maior entre a pressão sanguínea e a quantidade de RSNO plasmático do que com nitrito plasmático (PINHEIRO et al., 2015). Os objetivos deste trabalho se basearam no fato de que a administração de nitrito por via oral é capaz de produzir resposta anti-hipertensiva através da formação de RSNOs associados ao aumento da nitrosação proteica. Assim, diferentemente do que foi sugerido na literatura, é a inibição das vias de vasoconstrição e não a ativação de vias vasodilatadoras que muito provavelmente explicam os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio pela via oral (PINHEIRO et al., 2015). Apesar de identificarmos uma importante modulação pela nitrosação da via de sinalização induzida pelos receptores α_1 -adrenérgicos, não podemos afirmar qual o alvo molecular desta via de

sinalização. O candidato mais provável poderia ser o próprio receptor α_1 -adrenérgico, mas é possível também que mediadores estimulados pela ligação de um agonista aos receptores α_1 -adrenérgicos possam ser nitrosados e alterar a reatividade vascular aórtica, como por exemplo a PKC. É evidente que há diversas vias sinalizadoras nas células lisas musculares vasculares, geridas por uma vasta quantidade de proteínas (BROZOVICH et al., 2016). Futuros experimentos são necessários para elucidar qual é de fato o alvo molecular que pode ser nitrosado e alterar a resposta vascular. Experimentos como a medida do SNO-RAC específica para o receptor α_1 -adrenérgico através de anticorpos ou uma indução de mutação na cisteína dos receptores α_1 -adrenérgicos poderiam nos indicar com mais certeza sobre o alvo molecular da nitrosação. Neste trabalho, tentou-se realizar o SNO-RAC com o anticorpo para o receptor α_1 -adrenérgico, porém, não foi possível extrair a quantidade de proteína necessária para detecção do α_1 -adrenérgico no tecido aórtico. Uma outra limitação deste trabalho foi a não identificação da quantidade de RSNO no plasma após o tratamento com nitrito de sódio durante os 7 dias. Nós realizamos a medida de espécies nitrosadas no plasma mas não identificamos o quanto destas espécies nitrosadas é composta por RSNO.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Concluimos com os resultados do presente trabalho que a sinalização do receptor α_1 -adrenérgico é afetada pelo tratamento diário com nitrito de sódio, muito provavelmente por promover mecanismos que envolvem nitrosação do receptor α_1 -adrenérgico. Apesar do tratamento aumentar as quantidades de nitrito e espécies nitrosadas plasmáticas, os resultados sugerem que seus efeitos anti-hipertensivos se baseiam no aumento de espécies nitrosadas e não no aumento do nitrito, visto que o nitrito não apresenta atividade intrínseca sobre a reatividade vascular induzida pela fenilefrina. Já os RSNOs, neste trabalho representado pela GSNO, são capazes de alterar a reatividade vascular induzida pela fenilefrina e, mais do que isso, seus efeitos se baseiam na nitrosação de proteínas, visto que os efeitos da GSNO sobre a reatividade vascular induzida pela fenilefrina duram mesmo após a sua remoção, há um aumento de proteínas nitrosadas na aorta e estes efeitos são abolidos pelo ascorbato.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ADAM, L.; BOUVIER, M.; JONES, T. L. Z. Nitric oxide modulates β 2-adrenergic receptor palmitoylation and signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 37, p. 26337–26343, 1999.

ALENCAR, J. L.; LOBYSHEVA, I.; GEFFARD, M.; SARR, M.; SCHOTT, C.; SCHINKERT, V. B.; NEPVEU, F.; STOCLET, J.-C.; MULLER, B. Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. **Molecular Pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 1148–58, 2003.

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**, v. 5, p. 340–346, 2015.

ARONSTAM, R. S.; MARTIN, D. C.; DENNISON, R. L.; COOLEY, H. G. S-nitrosylation of m2 muscarinic receptor thiols disrupts receptor-G-protein coupling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 757, p. 215–217, 1995.

BAUER, J. A.; FUNG, H. L. Differential hemodynamic effects and tolerance properties of nitroglycerin and an S-nitrosothiol in experimental heart failure. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 256, n. 1, p. 249–254, 1991.

BROZOVICH, F. V.; NICHOLSON, C. J.; DEGEN, C. V.; GAO, Y. Z.; AGGARWAL, M.; MORGAN, K. G. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. **Pharmacological Reviews**, v. 68, p. 476–532, 2016.

CAHILL, P. A.; REDMOND, E. M.; FOSTER, C.; SITZMANN, J. V. Nitric oxide regulates angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology**, v. 288, n. 2, p. 219–229, 1995.

CHALOTHORN, D.; MCCUNE, D. F.; EDELMANN, S. E.; TOBITA, K.; KELLER, B. B.; LASLEY, R. D.; PEREZ, D. M.; TANOUE, A.; TSUJIMOTO, G.; POST, G. R.; PIASCIK, M. T. Differential Cardiovascular Regulatory Activities of the α 1B- and α 1D-Adrenoceptor Subtypes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 3, p. 1045–1053, 2003.

CHEN, Q.; SIEVERS, R. E.; VARGA, M.; KHARAIT, S.; HADDAD, D. J.; PATTON, A. K.; DELANY, C. S.; MUTKA, S. C.; BLONDER, J. P.; DUBE, G. P.; ROSENTHAL, G. J.; SPRINGER, M. L. Pharmacological inhibition of S-nitrosogluthathione reductase improves endothelial vasodilatory function in rats in vivo. **Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 6, p. 752–760, 2013.

COSBY, K.; PARTOVI, K. S.; CRAWFORD, J. H.; PATEL, R. P.; REITER, C. D.; MARTYR, S.; YANG, B. K.; WACLAWIW, M. A.; ZALOS, G.; XU, X.; HUANG, K. T.; SHIELDS, H.; KIM-SHAPIO, D. B.; SCHECHTER, A. N.; CANNON, R. O.; GLADWIN, M. T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1498–1505, 2003.

DOGGRELL, S. A.; BROWN, L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. **Cardiovascular Research**, v. 39, p. 89–105, 1998.

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**, v. 16, n. 13, p. 1775–1785, 2002.

FORRESTER, M. T.; THOMPSON, J. W.; FOSTER, M. W.; NOGUEIRA, L.; MOSELEY, M. A.; STAMLER, J. S. Proteomic analysis of S-nitrosylation and denitrosylation by resin-assisted capture. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 557–559, 2009.

FOSTER, M. W.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 9, p. 391–404, 2009.

FOSTER, M. W.; MCMAHON, T. J.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 160–168, 2003.

FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D. cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 525–563, 2010.

FURCHGOTT, R. F.; BHADRAKOM, S. Reactions of Strips of Rabbit Aorta To Epinephrine, Isopropylarterenol, Sodium Nitrite and Other Drugs. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 108, n. 2, p. 129–143, 1953.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

GAUCHER, C.; BOUDIER, A.; DAHBOUL, F.; PARENT, M.; LEROY, P. S-nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and Concepts for the Rational Design of S-nitrosothiols. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 3, p. 458–472, 2012.

GLADWIN, M. T.; SCHECHTER, A. N.; KIM-SHAPIRO, D. B.; PATEL, R. P.; HOGG, N.; SHIVA, S.; CANNON, R. O.; KELM, M.; WINK, D. A.; ESPEY, M. G.; OLDFIELD, E. H.; PLUTA, R. M.; FREEMAN, B. A.; LANCASTER, J. R.; FEELISCH, M.; LUNDBERG, J. O. The Emerging Biology of the Nitrite Anion. **Nature Chemical Biology**, v. 1, n. 6, p. 308–314, 2005.

GLADWIN, M. T.; SHELHAMER, J. H.; SCHECHTER, A. N.; PEASE-FYE, M. E.; WACLAWIW, M. A.; PANZA, J. A.; OGNIBENE, F. P.; CANNON, R. O. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 21, p. 11482–11487, 10 out. 2000.

GOW, A. J.; CHEN, Q.; HESS, D. T.; DAY, B. J.; ISCHIROPOULOS, H.; STAMLER, J. S. Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 9637–9640, 2002.

GOW, A. J.; STAMLER, J. S. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. **Nature**, v. 391, n. 6663, p. 169–173, 8 jan. 1998.

GRYGLEWSKI, R. J.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. **Nature**, v. 320, n. 6061, p. 454–456, 1986.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 5, p. 335–346, 2006.

HARRIS, D. M.; COHN, H. I.; PESANT, S.; ECKHART, A. D. GPCR signalling in hypertension: role of GRKs. **Clinical Science**, v. 115, n. 3, p. 79–89, 2008.

HARRISON, D. G.; GONGORA, M. C. Oxidative Stress and Hypertension. **Medical Clinics**

of North America, v. 93, p. 621–635, 2009.

HEIN, P.; MICHEL, M. C. Signal transduction and regulation: Are all α 1-adrenergic receptor subtypes created equal? **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 8, p. 1097–1106, 2007.

IGNARRO, L. J. Biosynthesis and Metabolism of Endothelium-Derived Nitric Oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 535–560, 1990.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 9265–9269, 1987.

IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: An overview. **Circulation Research**, v. 90, n. 1, p. 21–28, 2002.

JENSEN, B. C.; O'CONNELL, T. D.; SIMPSON, P. C. Alpha-1-adrenergic receptors: Targets for agonist drugs to treat heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 51, n. 4, p. 518–528, 2011.

JIA, L.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; STAMLER, J. S. S-nitrosohaemoglobin: A dynamic activity of blood involved in vascular control. **Nature**, v. 380, n. 6571, p. 221–226, 1996.

KLEINBONGARD, P.; DEJAM, A.; LAUER, T.; RASSAF, T.; SCHINDLER, A.; PICKER, O.; SCHEEREN, T.; GÖDECKE, A.; SCHRADER, J.; SCHULZ, R.; HEUSCH, G.; SCHAUB, G. A.; BRYAN, N. S.; FEELISCH, M.; KELM, M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 7, p. 790–796, 2003.

KNOWLES, R. G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 13, p. 5159–62, 1989.

KOBORI, H.; NANGAKU, M.; NAVAR, L. G.; NISHIYAMA, A. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 251–287, 2007.

KUMAR, V.; CALAMARAS, T. D.; HAEUSSLER, D.; COLUCCI, W. S.; COHEN, R. A.; MCCOMB, M. E.; PIMENTEL, D.; BACHSCHMID, M. M. Cardiovascular Redox and Ox Stress Proteomics. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, n. 11, p. 1528–1559, 2012.

LANCASTER, J. R. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 17, p. 8137–8141, 16 ago. 1994.

LAUER, T.; PREIK, M.; RASSAF, T.; STRAUER, B. E.; DEUSSEN, A.; FEELISCH, M.; KELM, M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 22, p. 12814–12819, out. 2001.

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. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 306–313, 2006.

LING, W. C.; MUSTAFA, M. R.; VANHOUTTE, P. M.; MURUGAN, D. D. Chronic administration of sodium nitrite prevents hypertension and protects arterial endothelial function by reducing oxidative stress in angiotensin II-infused mice. **Vascular Pharmacology**, v. 102, p. 11–20, 2018.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; COLE, J. A.; BENJAMIN, N. Nitrate, bacteria and human health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 593–602, 2004.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. M.; ALVING, K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. **Gut**, v. 35, n. 11, p. 1543–6, 1994.

LÜSCHER, T. F.; TANNER, F. C. Endothelial Regulation of Vascular Tone and Growth. **American Journal of Hypertension**, v. 6, p. 283S–293S, 1993.

MCCALL, T. B.; BOUGHTON-SMITH, N. K.; PALMER, R. M.; WHITTLE, B. J.; MONCADA, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. **The Biochemical journal**, v. 261, n. 1, p. 293–6, 1989.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. **New England Journal**

of **Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002–2012, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–42, 1991.

MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; PINHEIRO, L. C.; SAKAMOTO, E. K.; FERREIRA, G. C.; REIS, R. I.; MARÇAL, 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 and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 144–152, 2011.

MONTENEGRO, M. F.; PINHEIRO, L. C.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; PORTELLA, R. L.; TANUS-SANTOS, J. E. Vascular xanthine oxidoreductase contributes to the antihypertensive effects of sodium nitrite in L-NAME hypertension. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 6, p. 591–598, 2014.

MONTENEGRO, M. F.; PINHEIRO, L. C.; AMARAL, J. H.; MARÇAL, 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**, v. 385, n. 5, p. 509–517, 2012.

NOZIK-GRAYCK, E.; MCMAHON, T. J.; HUANG, Y.-C. C.; DIETERLE, C. S.; STAMLER, J. S.; PIANTADOSI, C. A. Pulmonary vasoconstriction by serotonin is inhibited by S-nitrosoglutathione. **Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol**, v. 282, n. 5, p. L1057–L1065, 2002.

NOZIK-GRAYCK, E.; WHALEN, E. J.; STAMLER, J. S.; MCMAHON, T. J.; CHITANO, P.; PIANTADOSI, C. A. S-nitrosoglutathione inhibits alpha1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 290, n. 1, p. L136–L143, 2006.

OLIVEIRA-PAULA, G. H.; PINHEIRO, L. C.; GUIMARAES, D. A.; TELLA, S. O. C.; BLANCO, A. L. F.; ANGELIS, C. D.; SCHECHTER, A. N.; TANUS-SANTOS, J. E. Tempol improves xanthine oxidoreductase-mediated vascular responses to nitrite in experimental renovascular hypertension. **Redox Biology**, v. 8, p. 398–406, 2016.

OLIVEIRA-PAULA, G. H.; TANUS-SANTOS, J. E. Nitrite-stimulated gastric formation of S-nitrosothiols as an antihypertensive therapeutic strategy. **Current Drug Targets**, v. 19, p. 1–35, 2018.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664–666, 1988.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524–526, 1987.

PERTICONE, F.; CERAVOLO, R.; PUJIA, A.; VENTURA, G.; IACOPINO, S.; SCOZZAFAVA, A.; FERRARO, A.; CHELLO, M.; MASTROROBERTO, P.; VERDECCHIA, P.; SCHILLACI, G. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. **Circulation**, v. 104, n. 2, p. 191–6, 2001.

PIASCIK, M. T.; HROMETZ, S. L.; EDELMANN, S. E.; GUARINO, R. D.; HADLEY, R. W.; BROWN, R. D. Immunocytochemical Localization of the Alpha-1B Adrenergic Receptor and the Contribution of This and the Other Subtypes to Vascular Smooth Muscle Contraction: Analysis with Selective Ligands and Antisense Oligonucleotides. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 2, p. 854–868, 1997.

PIASCIK, M. T.; PEREZ, D. M. α 1-adrenergic receptors: new insights and directions. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 298, n. 2, p. 403–410, 2001.

PINHEIRO, L. C.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; PORTELLA, R. L.; CERON, C. S.; MONTENEGRO, M. F.; TOLEDO, J. C.; 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 and Medicine**, v. 87, p. 252–262, 2015.

PINHEIRO, L. C.; FERREIRA, G. C.; VILALVA, K. H.; TOLEDO, J. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Contrasting effects of low versus high ascorbate doses on blood pressure responses to oral nitrite in L-NAME-induced hypertension. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 74, p. 65–73, 2018.

RASSAF, T.; PREIK, M.; KLEINBONGARD, P.; LAUER, T.; HEISS, C.; STRAUER, B. E.; FEELISCH, M.; KELM, M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. **J Clin Invest**, v. 109, n. 9, p. 1241–1248, 1 maio 2002.

RODRÍGUEZ, J. E.; ROMERO-NAVA, R.; RESÉNDIZ-ALBOR, A. A.; ROSALES-CRUZ, E.; HONG, E.; HUANG, F.; VILLAFAÑA, S. Expression and localization of the AT1 and AT2 angiotensin II receptors and α 1A and α 1D adrenergic receptors in aorta of hypertensive

and diabetic rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 39, n. 1, p. 85–92, 2017.

ROKOSH, D. G.; SIMPSON, P. C. Knockout of the 1A/C-adrenergic receptor subtype: The 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 14, p. 9474–9479, 2002.

SCHECHTER, A. N.; GLADWIN, M. T. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. **The New England journal of medicine**, v. 348, n. 15, p. 1483–1485, 2003.

SMITH, J. N.; DASGUPTA, T. P. Kinetics and Mechanism of the Decomposition of S-Nitrosoglutathione by L-Ascorbic Acid and Copper Ions in Aqueous Solution to Produce Nitric Oxide. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 57–66, 2000.

SPIEGELHALDER, B.; EISENBRAND, G.; PREUSSMANN, R. Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 14, p. 545–548, 1976.

STAMLER, J. S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; SIMON, D. I.; KEANEY, J.; VITA, J.; SINGELI, D.; VALERIT, C. R.; LOSCALZO, J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Biochemistry**, v. 89, p. 7674–7677, 1992a.

STAMLER, J. S.; JIA, L.; EU, J. P.; MCMAHON, T. J.; DEMCHENKO, I. T.; BONAVENTURA, J.; GERNERT, K.; PIANTADOSI, C. A. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2034–2037, 27 jun. 1997.

STAMLER, J. S.; LAMAS, S.; FANG, F. C. Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell**, v. 106, n. 6, p. 675–683, 2001.

STAMLER, J. S.; SIMON, D. I.; OSBORNE, J. A.; MULLINS, M. E.; JARAKIT, O.; MICHEL, T.; SINGEL, D. J.; LOSCALZO, J.; ROXBURY, W. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: Synthesis and characterization of biologically active compounds. **Pharmacology**, v. 89, p. 444–448, 1992b.

SUN, J.; MURPHY, E. Protein S-nitrosylation and cardioprotection. **Circulation Research**, v. 106, n. 2, p. 285–296, 5 fev. 2010.

TOUSOULIS, D.; KAMPOLI, A.-M.; TENTOLOURIS NIKOLAOS PAPAGEORGIOU, C.; STEFANADIS, C. The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. **Current Vascular Pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 4–18, 2012.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. **Hypertension Research**, v. 34, p. 5–14, 2011.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effects of Endothelium-Derived Nitric Oxide on Peripheral Arteriolar Tone in Man. **The Lancet**, v. 334, n. 8670, p. 997–1000, 1989.

WALFORD, G.; LOSCALZO, J. Nitric oxide in vascular biology. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, p. 2112–2118, 2003.

WEBB, A. J.; PATEL, N.; LOUKOGEORGAKIS, S.; OKORIE, M.; ABOUD, Z.; MISRA, S.; RASHID, R.; MIAL, P.; DEANFIELD, J.; BENJAMIN, N.; MACALLISTER, R.; HOBBS, A. J.; AHLUWALIA, A. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. **Hypertension**, v. 51, n. 3, p. 784–790, 2008.

WILLIAMS, B.; MANCIA, G.; SPIERING, W.; ROSEI, E. A.; AZIZI, M.; BURNIER, M.; CLEMENT, D. L.; COCA, A.; DE SIMONE, G.; DOMINICZAK, A.; KAHAN, T.; MAHFOUD, F.; REDON, J.; RUILOPE, L.; ZANCHETTI, A.; KERINS, M.; KJELDSSEN, S. E.; KREUTZ, R.; LAURENT, S.; LIP, G. Y. H.; MCMANUS, R.; NARKIEWICZ, K.; RUSCHITZKA, F.; SCHMIEDER, R. E.; SHLYAKHTO, E.; TSIOUFIS, C.; ABOYANS, V.; DESORMAIS, I.; DE BACKER, G.; HEAGERTY, A. M.; AGEWALL, S.; BOCHUD, M.; BORGHI, C.; BOUTOUYRIE, P.; BRGULJAN, J.; BUENO, H.; CAIANI, E. G.; CARLBERG, B.; CHAPMAN, N.; CÍFKOVÁ, R.; CLELAND, J. G. F.; COLLET, J. P.; COMAN, I. M.; DE LEEUW, P. W.; DELGADO, V.; DENDALE, P.; DIENER, H. C.; DOROBANTU, M.; FAGARD, R.; FARSANG, C.; FERRINI, M.; GRAHAM, I. M.; GRASSI, G.; HALLER, H.; HOBBS, F. D. R.; JELAKOVIC, B.; JENNINGS, C.; KATUS, H. A.; KROON, A. A.; LECLERCQ, C.; LOVIC, D.; LURBE, E.; MANOLIS, A. J.; MCDONAGH, T. A.; MESSERLI, F.; MUIESAN, M. L.; NIXDORFF, U.; OLSEN, M. H.; PARATI, G.; PERK, J.; PIEPOLI, M. F.; POLONIA, J.; PONIKOWSKI, P.; RICHTER, D. J.; RIMOLDI, S. F.; ROFFI, M.; SATTAR, N.; SEFEROVIC, P. M.; SIMPSON, I. A.; SOUSA-UVA, M.; STANTON, A. V.; VAN DE BORNE, P.; VARDAS, P.; VOLPE, M.; WASSMANN, S.; WINDECKER, S.; ZAMORANO, J. L. 2018 ESC/ESH Guidelines for

themanagement of arterial hypertension. **European Heart Journal**, v. 39, n. 33, p. 3021–3104, 2018.

YANG, L.; LIU, G.; ZAKHAROV, S. I.; BELLINGER, A. M.; MONGILLO, M.; MARX, S. O. Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 α 1c and β 2 subunits. **Circulation Research**, v. 101, n. 5, p. 465–474, 2007.

ZHONG, H.; MINNEMAN, K. P. α 1-Adrenoceptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**, v. 375, n. 1–3, p. 261–276, 1999.