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

JÉSSICA MARIA SANCHES LOPES

**Efeitos de drogas inibidoras da secreção ácida do
estômago sobre as respostas hipotensoras do
nitrito de sódio**

Ribeirão Preto - SP

2017

JÉSSICA MARIA SANCHES LOPES

Efeitos de drogas inibidoras da secreção ácida do estômago sobre as respostas hipotensoras do nitrito de sódio

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos

Ribeirão Preto - SP

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

SANCHES-LOPES, JESSICA MARIA

Efeitos de drogas inibidoras da secreção ácida do estômago sobre as respostas hipotensoras do nitrito de sódio. Ribeirão Preto, 2017.

LXXV f.

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

Orientador: José Eduardo Tanus dos Santos

FOLHA DE APROVAÇÃO

SANCHES-LOPES, Jéssica Sanches. **Efeitos de drogas inibidoras da secreção ácida do estômago sobre as respostas hipotensoras do nitrito de sódio.** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Farmacologia.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: _____

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: _____

Àqueles que estão sempre ao meu lado,
fisicamente ou no coração, meus amados pais
Rosemeire e Manoel e meu irmão João Manoel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guia em todas as situações, me dando forças em tudo o que me proponho a fazer.

Aos meus pais, que se fizeram presente em todos os momentos e diante de todas as circunstâncias me apoiaram e me incentivaram. Ao meu irmão pelo companheirismo e cumplicidade.

A minha avó Maria e meu avô Antônio por todo o carinho, exemplo e incentivo. Meus tios e primos, em especial minhas tias Zi e Zô por todo o amor e por sempre me acolherem como filha e aos meus padrinhos por todo o carinho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos, que sempre exerceu tão bem seu papel de orientador. Muito obrigada por toda a atenção, confiança, dedicação e inúmeros ensinamentos.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Ana Laura, Caio, Célio, Evandro, Grazi, Gustavo, Jefferson, Juliana, Leevan, Lucas, Madla, Rafael, Rose, Renato e Sandra, por me transmitirem muitos conhecimentos nesses dois anos, por toda a ajuda técnica e por me fazerem ser mais forte e profissional. Em particular, agradeço à Grazi pela colaboração referente às análises de nitrito.

Ao querido prof. Dr. Cleber Ramos (*in memoriam*), por ter despertado em mim o amor pela farmacologia. Serei eternamente grata.

Aos meus queridos amigos, Airton e Gustavo, que foram pessoas essências na minha caminhada durante o mestrado. Vocês me ouviram, me compreenderam e me transmitiram muito carinho e amizade. Aqui fica o meu muito obrigado por tudo que fizeram por mim.

A Fedoce, Juli e Rafa, por todos os cafés, conversas e momentos de descontração.

A todas as amizades que cultivei em Ribeirão Preto desde minha vinda ao Curso de Inverno em Farmacologia, pessoas extremamente solícitas e amigas que fizeram meus dias mais alegres. A todos os pós-graduandos com quem compartilhei viagens, sorrisos, choros e momentos felizes.

Aos meus amigos conquistados na faculdade, em especial Gabriela Maria e Jefferson, por demonstrarem o mesmo carinho e cumplicidade de quando estávamos juntos fisicamente.

Aos meus amigos promissenses, Ananda, Carol, Alison e Jéssica que sempre estiveram me incentivando, mesmo com a distância.

Aos professores e funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial à Gislaine e ao Ramon, sempre extremamente atenciosos e prestativos. Obrigado por tudo o que fizeram por mim durante este período!

Aos professores da banca examinadora, Profa. Dra. Cristina Antoniali, Prof. Dr. Wilson Salgado e Prof. Dr. Rafael Kemp, agradeço a disponibilidade e participação na banca.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

“Todo homem pode ser, se assim se propuser,
escultor de seu próprio cérebro”

(Santiago Ramón y Cajal)

Resumo

SANCHES-LOPES, J. M. **Efeitos de drogas inibidoras da secreção ácida do estômago sobre as respostas hipotensoras do nitrito de sódio.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O nitrito pode ser reduzido a NO de forma dependente do pH ácido do estômago ou por enzimas com atividade nitrito-redutase. O tratamento com omeprazol, previne parte dos efeitos anti-hipertensivos do nitrito administrado por via oral por aumentar o pH gástrico. Contudo, nenhum estudo até o momento avaliou se, assim como o omeprazol, a ranitidina também é capaz de atenuar os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio por aumentar o pH gástrico. Nesse estudo, examinamos se a administração oral de ranitidina poderia prejudicar os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio administrados por via oral, por interferir na formação de NO e espécies nitrosiladas a partir do nitrito. A fim de verificar a influência da ranitidina no efeito hipotensor do nitrito de sódio, utilizamos animais tratados agudamente com L-NAME pré-tratados com ranitidina, omeprazol e veículo e, posteriormente, com nitrito de sódio 15mg/kg. Como esperado, o tratamento com L-NAME resultou em aumento na pressão arterial média (PAM). O pH gástrico foi diferente entre os grupos, tendo um aumento no pH dos animais tratados com ranitidina e omeprazol, quando comparado ao veículo, e os tampões tinham o mesmo pH do veículo e das drogas. O nitrito de sódio exerceu efeitos anti-hipertensivos significativos nos grupos estudados. No entanto, foram observadas menores diminuições na PAM em ratos tratados com omeprazol e ranitidina em comparação aos ratos que receberam veículo. Esses achados foram associados a diminuições nas concentrações gástricas de NO e diminuições nos níveis plasmáticos de espécies nitrosiladas. Além

disso, houve aumento nas concentrações de nitrito no estômago. Não foram observadas diferenças nas concentrações de nitrito no plasma. Além disso, não foram observadas diferenças nos níveis de NOx no plasma e estômago entre os grupos do estudo. Os animais tratados com tampão apresentaram resultados similares aos tratados com as drogas. Nossos resultados sugerem que a ranitidina, ao aumentar o pH gástrico, afeta as respostas anti-hipertensivas ao nitrito de sódio oral por diminuir a formação de NO e espécies nitrosiladas. Este fato é reforçado pelo aumento do nitrito no estômago, sugerindo uma diminuição na conversão de nitrito a NO e espécies nitrosiladas no ambiente gástrico.

Palavras chaves: Ranitidina, omeprazol, nitrito, nitrosotióis.

Abstract

SANCHES-LOPES, J. M. **Effects of inhibitors of acid secretion of stomach on the hypotensive responses to sodium nitrite.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2017.

Nitrite can be reduced to NO depending on acidic pH of the stomach or by enzymes with nitrite reductase activity. Treatment with omeprazole attenuates the antihypertensive effects of oral nitrite by increasing of gastric pH. However, studies are still necessary to further evaluate wheter ranitidine is also able to attenuate the antihypertensive effects of sodium nitrite by increasing gastric pH. In this study, we examined whether oral administration of ranitidine could impair oral antihypertensive effects of sodium nitrite by interfering with the formation of NO and nitrosylated species from nitrite. In order to analyze the influence of ranitidine under hypotensive effect of sodium nitrite, rats were treated with L-NAME and pretreated with ranitidine, omeprazole, vehicle or buffer, subsequently all the groups were treated with sodium nitrite 15 mg/kg. The L-NAME treatment increase mean arterial pressure (MAP). The gastric pH was different among the groups, there was an increased in rats gastric pH treated with ranitidine and omeprazole compared to the vehicle. The buffer group had the same pH of vehicle and drugs treatment. Sodium nitrite exerted significant antihypertensive effects in the groups studied. However, lesser decreases in MAP were observed in rats treated with omeprazole and ranitidine compared to rats that received vehicle. These findings were associated with a lower NO gastric concentrations as well as nitrosylated species plasma levels. In addition, there was an increased in nitrite concentrations in the stomach. No differences were observed in plasma nitrite levels. Moreover, there was not any significant difference in plasma and stomach NO_x levels among the studied groups. The rats treated with buffer

showed similar results to those treated with the drugs. Together these data demonstrated that ranitidine, through increased gastric pH, affects antihypertensive responses to oral sodium nitrite by reducing the formation of NO and nitrosylated species. This fact is reinforced by higher levels in nitrite concentrations in the stomach, thereby it suggests a lower conversion of nitrite to NO and nitrosylated species in the gastric environment.

Key words: Ranitidine, omeprazole, nitrite, nitrosylated species.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figuras

Figura 1 – O ciclo entero-salivar do nitrato	23
Figura 2 – Conversão do nitrato a nitrito e do nitrito a NO e espécies bioativas de nitrogênio	24
Figura 3 – Formação de nitrosotióis	27
Figura 4 – pH do lavado gástrico em todos os grupos experimentais que receberam as drogas (A). Pressão arterial média (PAM) (B). Δ PAM (C)	43
Figura 5 – Concentrações de NOx (A), nitrito (B) e RXNO (C) no plasma de ratos que receberam as drogas	45
Figura 6 – Concentrações de NO gástrico (A), nitrito (B), NOx (C) e RXNO (D) no estômago de ratos que receberam as drogas	47
Figura 7 – pH do lavado gástrico em todos os grupos experimentais (A). Pressão arterial média (PAM) de ratos que receberam os tampões no pH 3,5; 4,5 e 5,5	49
Figura 8 – Concentrações de NOx (A), nitrito (B) e RXNO (C) no plasma de ratos que receberam os tampões no pH 3,5; 4,5 e 5,5	52
Figura 9 – Concentrações de NO gástrico (A), nitrito (B), NOx (C) e RXNO (D) no estômago de ratos que receberam os tampões no pH 3,5; 4,5 e 5,5	53
Figura 10 – Correlação entre o pH e o as concentrações de NO gástrico; entre as concentrações de NO gástrico e RXNO e entre as concentrações de RXNO em ratos tratados com as drogas ou os tampões	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C – dois rins e um clipe

ADMA - dimetilarginina assimétrica

ANOVA – análise de variância

BL - basal

DDAH - dimetilarginina dimethylaminohydrolase

DOCA – desoxicorticosterona

DTPA - dimetilarginina assimétrica

eNOS – sintase endotelial do óxido nítrico

EPM – erro padrão da média

GMPc – Guanosina monofosfato cíclica

GTP – Guanosina trifosfato

IBPs – inibidores da bomba de prótons

iNOS – sintase induzível do óxido nítrico

L-NAME – N- nitro-L-arginine methyl ester

nNOS – sintase neuronal do óxido nítrico

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

NO_x – nitrato + nitrito

NEM - N-etilmaleimida

PAM – pressão arterial diastólica

PKG – proteína quinase G

RXNO – espécies nitrosiladas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Dietas ricas em vegetais e sua importância na prevenção de doenças cardiovasculares	20
1.2 NO e o seu papel na homeostase cardiovascular	21
1.3 O NO pode ser formado por uma via independente das NOS – Via Nitrato-nitrito-NO	22
1.4 Conversões não enzimática do nitrito a NO	23
1.5 Efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio	25
1.6 Geração de espécies nitrosiladas e seus efeitos na pressão arterial	26
1.7 Drogas inibidoras da secreção ácida e sua interferência na conversão não enzimática do nitrito	28
2. HIPÓTESE	32
3. OBJETIVOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Animais	36
4.2 Protocolo 1	36
4.3 Protocolo 2	37
4.4 Análise do NO gástrico	38
4.5 Aferição do pH do lavado gástrico	38
4.6 Inserção da cânula e avaliações hemodinâmicas dos animais acordados	38
4.7 Determinação das concentrações de nitratos	39
4.8 Determinação das concentrações de nitrito e espécies nitrosiladas	39
4.9 Análise estatística	40

5. RESULTADOS	42
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	64

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dietas ricas em vegetais e sua importância na prevenção de doenças cardiovasculares

Dietas ricas em frutas e legumes como a dieta mediterrânea, DASH e a japonesa, estão associadas à redução da pressão arterial e podem diminuir a incidência de doenças cardiovasculares (Rouse et al. 1983; Appel et al. 1997; Hung et al. 2004). Estes efeitos benéficos da dieta foram amplamente atribuídos à presença de altas concentrações de fibras dietéticas, flavonoides e vitaminas que são importantes antioxidantes (Ness et al. 1997; Miller et al. 2006). Entretanto, estudos têm demonstrado que esses componentes não seriam suficientes para promover as mudanças na pressão arterial observadas em uma dieta rica em frutas e vegetais (Bjelakovic et al. 2007; Al-Solaiman et al. 2010). Atualmente, diversos autores sugerem que esses efeitos benéficos para o sistema cardiovascular sejam devido à alta concentração de nitrato e nitrito nesses vegetais (Lundberg et al. 2006; Webb et al. 2008).

Os vegetais folhosos de coloração verde são os que apresentam maior teor de nitrato e nitrito (Weitzberg et al. 2013). Estes estão entre os alimentos com maior proteção a doenças coronárias e acidentes vasculares cerebrais (Joshi et al. 1999; Joshi et al. 2001). Quando ingerido, o nitrato e o nitrito podem ser convertidos endogenamente em óxido nítrico (NO) e espécies nitrosiladas, como descrito nos próximos tópicos. Sugerindo assim que o nitrato e nitrito, presentes nos vegetais, tenham uma grande importância nos efeitos cardiovasculares da dieta vegetariana (Raubenheimer et al. 2017).

1.2O NO e seu papel no controle da homeostase cardiovascular

A partir da descoberta do óxido nítrico (NO) como o fator relaxante derivado do endotélio (Furchgott et al. 1980; Ignarro et al. 1987; Palmer et al. 1987), inúmeros estudos têm demonstrado o seu papel chave na regulação de diversas funções fisiológicas, dentre elas no controle da pressão arterial (Baylis et al. 1992; Sander et al. 1999).

O NO é sintetizado por três sintases diferentes: neuronal (nNOS), induzível (iNOS) e endotelial (eNOS), sendo a eNOS muito importante para a formação endógena de NO, principalmente no sistema cardiovascular (Moncada 1993). O endotélio regula o tônus vascular controlando a liberação de substâncias vasoativas, dentre elas o NO (Villanueva et al. 2010). Disfunção nas células endoteliais e diminuição da formação de NO acarretam em doenças cardiovasculares (Oliveira-Paula et al. 2016).

Na via clássica, o NO é sintetizado a partir da L-arginina que é convertida em L-citrulina e NO pelas enzimas NO sintases (NOS) (Moncada 1993). Nos vasos, o NO produzido na célula endotelial se difunde até as células musculares lisas e se liga e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, aumentando a síntese de guanosina monofosfato cíclica (GMPc) a partir da guanosina trifosfato (GTP), o que ativa a proteína quinase G (PKG) que leva ao relaxamento vascular devido a redução da concentração intracelular de Ca^{2+} (Francis et al. 2010).

Durante a hipoxia / isquemia, as NOS tornam-se menos efetivas na geração de NO. Nessas situações, a via nitrato-nitrito-NO é eficaz para a formação de NO já que essa via é aprimorada durante a hipóxia e baixo pH (Lundberg et al. 2008).

1.3 O NO pode ser formado por uma via independente das NOS - Via Nitrato-nitrito-NO

O NO formado a partir das NOS é oxidado a nitrito e este a nitrato, sendo ambos conhecidos, por um longo tempo, como metabólitos inertes da oxidação do NO (Lauer et al. 2001). Porém, a partir da década de 90 diversos estudos têm demonstrado que a formação de NO não ocorre apenas pelas NOS, mas também pela via nitrato-nitrito-NO (Lundberg et al. 1994; Zweier et al. 1995; Gladwin et al. 2005).

Em humanos, o nitrato pode ser originado de forma endógena pela oxidação do NO ou pela ingestão de nitrato da dieta, presente principalmente em vegetais de folhas verdes (Lundberg et al. 2008). Após a ingestão de alimentos contendo nitrato, ele é absorvido de forma rápida e eficiente no trato gastrointestinal (Omar et al. 2016). Ainda que grande parte do nitrato seja excretado na urina, até 25% é reabsorvido pelas glândulas salivares (van Faassen et al. 2009). Ao ser secretado na cavidade oral, as bactérias anaeróbicas facultativas reduzem o nitrato salivar a nitrito (Lundberg et al. 2004). Na saliva o nitrito é então deglutido e em contato com o pH ácido do estômago, grande parte dele é reduzido a NO e espécies nitrosiladas (Lundberg et al. 1994; Omar et al. 2016). O nitrito remanescente é absorvido sistemicamente e pode ser convertido a NO no sangue e nos tecido por nitrito-redutases (Kim-Shapiro et al. 2014). Por fim, o NO e o nitrito são oxidados a nitrato que pode ser excretado ou reiniciar o ciclo entero-salivar (Fig 1). Desse modo, a via nitrato-nitrito-NO é uma via alternativa e complementar à produção enzimática clássica de NO (Weitzberg et al. 2013).

Figura 1. O ciclo entero-salivar do nitrato. O nitrato inorgânico ingerido é absorvido no intestino delgado e é extraído ativamente pelas glândulas salivares e concentrado na saliva. Na boca, as bactérias reduzem o nitrato ao nitrito pela ação de enzimas nitrato redutase. No ambiente ácido do estômago, o nitrito é decomposto espontaneamente para formar NO e outros óxidos de nitrogênio bioativo. Na circulação o nitrito pode ser convertido a NO por enzimas com ação nitrito-redutase. Adaptado de Lundberg et al. 2008.

1.4 Conversão não enzimática do nitrito a NO.

Na década de 90, foi observado que ao administrar nitrito, a formação gástrica de NO aumentava, mostrando que a formação de NO no estômago ocorre de forma não enzimática a partir do nitrito assim, o ambiente gástrico começou a ser alvo de estudos para a melhor compreensão da biologia do nitrito (Benjamin et al. 1994; Lundberg et al. 1994). Trabalhos posteriores mostraram que a administração de

nitrato também aumenta a formação gástrica de NO, possivelmente pelo intermédio do nitrito (Petersson et al. 2009).

O estômago humano pode então ser considerado um biorreator, sendo o ambiente ácido do estômago muito importante para a formação de NO e espécies bioativas de nitrogênio a partir do nitrito (Richardson et al. 2002; Rocha et al. 2011). Na boca o nitrato é convertido a nitrito (Fig. 2, Equação 1). Ao chegar ao estômago, o nitrito é exposto ao ambiente ácido e ocorre a formação de ácido nitroso (HNO_2) (Fig. 2, Equação 2). Estudos *in vitro* demonstraram que essa conversão ocorre em uma reação com o pKa entre 3,2 e 3,4, sendo então, extremamente dependente do pH ácido (McKnight et al. 1997). O HNO_2 se decompõe para formar diversas espécies bioativas de nitrogênio, incluindo óxido nítrico (NO) (Fig. 2, Equações 3-5) (Pinheiro et al. 2017). Os nitrosotióis também são formados sob estas condições e diversos estudos têm conferido uma grande relevância a essa molécula, assim um tópico o abordará com maiores detalhes.

Figura 2. Conversão do nitrato a nitrito e do nitrito a NO e espécies bioativas de nitrogênio. Adaptado de Richardson et al. 2002.

O NO formado no estômago é importante para assegurar a manutenção da integridade gástrica. Essa molécula possui potente efeito antimicrobiano, conferindo proteção gástrica contra patógenos, além de afetar o fluxo sanguíneo e a aumenta a

espessura da mucosa gástrica, diminuindo os efeitos deletérios da acidez gástrica (Dykhuisen et al. 1996; Petersson et al. 2007).

Demonstrada a importância do pH ácido do estômago, é indispensável analisarmos as consequências de alterações nesse pH. O tratamento de diversas doenças gástricas ocorre através do aumento do pH do estômago, o que pode comprometer a conversão não enzimática do nitrito

1.5 Efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio

Dada a importância da via nitrato-nitrito-NO, estudos tem explorado as possibilidades terapêuticas do uso do nitrito e do nitrato em doenças cardiovasculares (Omar et al. 2016). De fato, demonstrou-se que o tratamento crônico com nitrito de sódio reduz a pressão arterial nos modelos de hipertensão por *N*-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Montenegro et al. 2014), 2R1C (Montenegro et al. 2012) e desoxicorticosterona (DOCA) sal (Amaral et al. 2015). Contudo, até o momento a literatura não apresenta um mecanismo claro que explique os efeitos anti-hipertensivos do nitrito.

A conversão a NO por vias enzimáticas e não enzimáticas são possíveis mecanismos pelos quais o nitrito pode exercer seus efeitos anti-hipertensivos (Kim-Shapiro et al. 2014). Em condições de hipóxia a conversão enzimática ocorre nos vasos sanguíneos através de proteínas que contém o grupo heme, como a deoxihemoglobina (Alzawahra et al. 2008) e outras enzimas nitrito-redutases como a xantina oxidoreductase (Montenegro et al. 2014) e algumas enzimas do CYP450 (Lundberg et al. 2004). Porém, o tratamento com nitrito promove apenas um pequeno aumento nos níveis de nitrito circulante (Montenegro et al. 2014), sendo

difícilmente capaz de exercer efeito anti-hipertensivo. A conversão a NO pela via não enzimática é outro possível mecanismo anti-hipertensivo do nitrito (Lundberg et al. 1994).

Mesmo que o tempo de meia-vida plasmática do nitrito seja curto (5 a 40 minutos) (van Faassen et al. 2009), o ciclo nitrato-nitrito-NO mantém o nitrito em contato com o suco gástrico para a formação de NO e espécies nitrosiladas por um período de 3 a 5 horas (Kapil et al. 2010), relativo à duração do ciclo. Após este período, as concentrações de nitrito e nitrato vão diminuindo, até que em 24 horas estas voltam aos valores basais (Ghosh et al. 2013). Apesar disso, os efeitos anti-hipertensivos do nitrito ainda são mantidos nesse período (Ghosh et al. 2013), sugerindo que estes efeitos não dependem diretamente das concentrações circulantes de nitrito.

Tomadas em conjunto, estas evidências sugerem que outros mecanismos estão envolvidos com os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio, sendo as espécies nitrosiladas, possíveis agentes mediadores desses efeitos.

1.6 Geração de espécies nitrosiladas e seus efeitos na pressão arterial

A reação do nitrito no meio ácido do estômago resulta em diversas espécies além do NO, como o anidrido nitroso que é um forte agente nitrosilante (N_2O_3) (Lundberg et al. 2013). Grupos tiólicos (-SH) de cisteínas podem reagir com o nitrito (Fig. 3, Equação 6) ou com N_2O_3 (Fig. 3, Equação 7), formando nitrosotióis ou ainda sofrer transnitrosação para formar novos nitrosotióis (Fig. 3, Equação 8) (Richardson et al. 2002).

Figura 3. Formação de nitrosotióis. Adaptado de Richardson et al. 2002.

A nitrosilação então é uma modificação pós-traducional caracterizada pela ligação covalente de um resíduo de cisteínas de proteínas alvo ao NO ou agentes nitrosilantes, o que leva a formação de nitrosotióis que podem ser proteicos ou não-proteicos (Lima et al. 2010; Broniowska et al. 2012). Evidências apontam que o aumento ou a redução da nitrosilação de proteínas-alvo desempenha um importante papel na fisiopatologia de doenças associadas a alterações na sinalização redox, tais como hipertensão, infarto e aterosclerose (Kumar et al. 2012; Maron et al. 2013). Neste contexto, agentes terapêuticos capazes de modular a nitrosilação poderiam ter ampla utilidade clínica (Hess et al. 2005).

Os nitrosotióis podem manter o NO ativo, atuando diretamente como doador de NO (Pereira et al. 2015). Além disso, a nitrosilação pode regular funções proteicas de modo semelhante a fosforilação (Stamler et al. 2001). Estudos do nosso grupo demonstraram a possibilidade de que os nitrosotióis sejam exportados do trato gastrointestinal, o que pode contribuir para a redução da pressão arterial (Webb et al. 2008; Pinheiro et al. 2012; Pinheiro et al. 2015).

O NO e as espécies nitrosiladas (RXNO) que são formadas a partir das reações que ocorrem no estômago são importantes para o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio. Recentemente nosso grupo demonstrou que a administração de omeprazol, aumenta o pH gástrico e atenua os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio administrado por via oral, porém não altera as concentrações plasmáticas de nitrito. Interessantemente, a diminuição do efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio

ocorreu de forma relacionada com a diminuição da formação de espécies nitrosiladas (Pinheiro et al. 2012; Pinheiro et al. 2015).

Portanto é possível que as condições ácidas do estômago possibilitem a formação de outras espécies relacionadas ao NO, como os nitrosotióis, que explicariam os efeitos do nitrito e do nitrato.

1.7 Drogas inibidoras da secreção ácida e sua interferência na conversão não enzimática do NO

A síndrome dispéptica é caracterizada por sintomas relacionados ao aparelho digestório superior. A etiopatogênese dessa síndrome está relacionada ao aumento da secreção de ácido gástrico, sendo o tratamento realizado com fármacos que inibem essa secreção, como os inibidores da bomba de prótons (IBPs) e os antagonistas dos receptores H₂ (Hatlebakk et al. 1996; Camilleri et al. 2013).

Os IBPs são fármacos amplamente utilizados em gastroenterologias, o omeprazol é o protótipo dessa classe. O omeprazol é um pró-fármaco convertido à sua forma sulfenamida ativa no meio ácido dos canalículos intracelulares da célula parietal. A sulfenamida rege com um resíduo de cisteína da H⁺/K⁺ ATPase (bomba de prótons), formando uma ligação dissulfeto covalente que inibe de forma irreversível a atividade da bomba de prótons, levando a uma quase completa supressão da secreção de ácido (Golan 2014).

Os IBPs são considerados fármacos seguros. Entretanto estudos recentes sugerem que o omeprazol afeta negativamente a função vascular, aumentando o risco de infarto agudo do miocárdio o que tem sido relacionado, pelo menos em

parte, à atividade reduzida do NO (Bateman et al. 2003; Shih et al. 2014; Shah et al. 2015).

O primeiro estudo que relata a formação não enzimática de NO foi realizado em 1994. Nesse trabalho, a ingestão de alface por humanos acarretou no aumento das concentrações de NO e a administração de omeprazol reduziu essas concentrações.

Estudos recentes do nosso grupo mostraram que o omeprazol reduz significativamente os efeitos hipotensores de nitrito de sódio em ratos hipertensos por interferir na formação gástrica de espécies relacionadas ao NO através do aumento do pH gástrico (Pinheiro et al. 2012; Amaral et al. 2013; Pinheiro et al. 2015). Como mostrado no tópico anterior, o tratamento com omeprazol atenua o aumento nas concentrações plasmática de nitrosotiol relacionado a diminuição do efeito hipotensor do nitrito, sugerindo que a formação de nitrosotiol gástrico conduz, pelo menos em parte, o efeito anti-hipertensivos do nitrito de sódio (Pinheiro et al. 2015).

Outros estudos demonstraram que os IBPs inibem a atividade da dimetilarginina dimethylaminohydrolase (*DDAH*), enzima responsável pela degradação de dimetilarginina assimétrica (ADMA) que é inibidor da óxido nítrico síntase (NOS). Assim, a concentração de ADMA é aumentada, levando a uma diminuição dos níveis de NO e da vasodilatação dependente de endotélio (Ari et al. 2010; Lu et al. 2011; Ghebremariam et al. 2013; Lucas C. Pinheiroa 2016).

Outra droga amplamente utilizada no tratamento de doenças dispépticas é a ranitidina. A ranitidina é um antagonista do receptor histamínico H₂, possui alta seletividade, e rápido início de ação (Brittain et al. 1981; Asseff et al. 2016). Essa droga leva a supressão da secreção gástrica de ácido pela competição reversível

com histamina aos receptores H2 na membrana basolateral das células parietais (Golan 2014).

Existem algumas diferenças importantes no mecanismo de ação pelo qual os antagonistas H2 e IBPs reduzem a secreção de ácido gástrico. Estas diferenças se referem no grau e duração da inibição do ácido: doses repetidas de IBPs são necessárias para atingir o máximo efeito anti-secretor, enquanto o efeito inibidor de ácido de antagonistas H2 é alcançado em poucas horas, mas tende a diminuir em tratamentos prolongados (Lamers 1996; Azizollahi et al. 2016; Xu et al. 2016)

Os achados relacionados ao uso do omeprazol têm grande relevância, especialmente para pacientes com doenças cardiovasculares que utilizam IBPs, por isso é necessário investigar se outras classes de drogas utilizadas para o tratamento de doenças dispepticas podem levar as mesmas consequências.

Tendo em vista o amplo uso da ranitidina, correlacionando com os achados atribuídos ao uso do omeprazol e tendo em vista que nenhum trabalho abordou a influência do tratamento com ranitidina sobre os efeitos cardiovasculares do nitrito, o presente estudo investigou se a administração oral de ranitidina afeta os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio em ratos hipertensos e qual sua interferência na formação de NO e espécies nitrosiladas.

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE

A ranitidina, por aumentar o pH gástrico, diminui os efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio por via oral em ratos tratados agudamente com L-NAME por atenuar a formação de NO e espécies nitrosiladas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- a) Comparar o aumento do pH gástrico provocado pela administração de ranitidina e omeprazol;
- b) Avaliar agudamente a interferência do tratamento com ranitidina no efeito hipotensor do nitrito de sódio em ratos L-NAME, comparando com a conhecida interferência do omeprazol sobre esses efeitos;
- c) Verificar se o tratamento com ranitidina altera as concentrações plasmáticas de nitrito, nitrato e espécies nitrosiladas no plasma e no estômago e a formação de NO gástrico em animais tratados com nitrito de sódio agudamente e comparar com as alterações provocadas pelo omeprazol;
- d) Avaliar agudamente a interferência de tampões com pH 3,5; 4,5 e 5,5 no efeito hipotensor do nitrito de sódio em ratos L-NAME e comparar com as alterações provocadas pela administração das drogas.
- e) Verificar se a administração de tampões com pH 3,5; 4,5 e 5,5 alteram as concentrações plasmáticas de nitrito, nitrato e espécies nitrosiladas no plasma e estômago e a formação de NO gástrico em animais tratados com nitrito de sódio agudamente e comparar com as alterações provocadas pela administração das drogas.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (nº 171/2016). Ratos Wistar machos com peso entre 250g e 270g foram obtidos do biotério central do Campus da USP de Ribeirão Preto e mantidos em caixas com até 4 animais, em períodos de 12h de luz a 25°C, com acesso livre a comida e água.

4.2 Protocolo 1

No protocolo 1, foi averiguado se o tratamento com ranitidina, assim como o omeprazol, modifica os efeitos agudos do nitrito de sódio oral sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos submetidos a indução da hipertensão aguda com N-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais. 3 grupos receberam nitrito de sódio e foram pré tratados com ranitidina, omeprazol ou veículo, tween 80 2% e 1 grupo controle que não recebeu nitrito ou outras drogas. Todas as drogas foram administradas por gavagem.

As doses escolhidas de ranitidina 100 mg / Kg (Malfara et al. 2002; Balan et al. 2015) e omeprazol 30 mg / Kg (Pinheiro et al. 2012) foram embasadas em estudos prévios e a dose de nitrito de sódio 15 mg / kg (Pinheiro et al. 2015) é a dose padrão utilizada no nosso laboratório.

Os animais foram submetidos à canulação de artéria femoral, descrito a seguir. Após 1 h e 30 min dos tratamentos com ranitidina, omeprazol ou controle, os animais, receberam uma única administração por gavagem de L-NAME (100 mg /

kg) para aumentar a PAM e foram avaliados a partir da mensuração da pressão invasiva. Trinta minutos após o tratamento com L-NAME, os ratos foram tratados com solução salina ou nitrito de sódio, por gavagem. Foram avaliadas alterações na PAM, calculadas pela fórmula: $\Delta PAM = PAM \text{ pós nitrito} - PAM \text{ BL}$.

Trinta minutos após a administração de nitrito ou salina, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg / kg) e eutanasiados. O gás do estômago foi coletado para análise. O pH do lavado gástrico foi aferido. As amostras de sangue arterial foram coletadas em tubos contendo heparina e imediatamente centrifugadas a 1000xg por 4 minutos. Alíquotas de plasma foram adicionadas a uma solução contendo N-etilmaleimida (NEM) (10 mmol / L) e dietilenotriaminopenta ácido (DTPA) (2 mmol / L) para preservar nitrosotíóis. Amostras de estômago foram coletadas e maceradas em PBS. Todas as amostras foram coletadas em tubos âmbar. As amostras foram armazenadas a -70°C até serem analisadas os níveis plasmáticos de nitrito, espécies nitrosiladas e NOx (nitrato+nitrito).

4.3 Protocolo 2

Neste protocolo, foram administrados por via oral, ao invés das drogas, tampões acetato de sódio nos pH de 3,5; 4,5 e 5,5, a fim mimetizar e comparar com os efeitos produzidos pela ranitidina e o omeprazol.

Os animais passaram por todos os procedimentos descritos no protocolo 1, com alteração na ordem cronológica. Receberam L-NAME, 25 min depois receberam os tampões 3,5; 4,5 ou 5,5 por via oral, depois de 5 min receberam o nitrito de sódio e depois de 30 min foram eutanasiados. O grupo controle não recebeu nitrito e nem tampões.

Para atingir os objetivos propostos nestes protocolos, foram utilizadas as seguintes metodologias:

4.4 Análise do NO gástrico

A quantificação foi feita pelo método de quimiluminescência através do ozônio. Para a análise do NO gástrico, o estômago foi ocluído nas duas extremidades, cárdia e piloro e 5 ml de N₂ livre de oxigênio foram injetados no estômago do rato. Após 20 segundos, retiramos esse o gás gástrico e injetamos no aparelho Sievers (Modelo 280 NO analyzer, Boulder, CO). Os dados foram analisados pelo programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA).

4.5 Aferição do pH do lavado gástrico

Os efeitos da ranitidina, do omeprazol e dos tampões no pH gástrico foram avaliados medindo o pH do lavado gástrico. A cavidade abdominal foi aberta e a porção do piloro do estômago ligado. A porção inferior do esôfago foi aberta e foi inserido um eletrodo de pH.

4.6 Inserção da cânula e avaliações hemodinâmicas dos animais acordados

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg / kg). Foi feita uma pequena incisão na porção inguinal. Foi inserido um cateter (segmento de dois cm PE-10 soldado a um cateter PE-50 de 14 cm) na artéria femoral. O cateter foi exteriorizado no dorso do animal. Após a cirurgia o animal recebeu analgesia pós-

operatória (Fluxinameglumina 2,5 mg / kg, s.c.). Após o animal ter se recuperado da cirurgia (6 horas), o cateter inserido na artéria femoral foi acoplado a um transdutor de pressão, conectado a um sistema de aquisição de dados modelo MP150CE (Biopac Systems Inc. CA, USA). Após a cirurgia os animais permaneceram em jejum até o momento do experimento.

4.7 Determinação das concentrações de nitratos

As concentrações de NO_x (Nitrito+Nitrato) em amostras de plasma e macerado de estômago dos grupos experimentais foram determinados pela reação de Griess como descrito previamente (Montenegro et al. 2009). Utilizamos 40 µl de plasma ou macerado incubados com 40 µl de tampão com nitrato redutase. As amostras foram incubadas 12 horas a 37°C e protegidas da luz. Em seguida, foram adicionados 80 µl de reagente de Griess em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540nm.

4.8 Determinação das concentrações de nitrito e espécies nitrosiladas

As concentrações de nitrito e espécies nitrosiladas em amostras de plasma e macerado de estômago dos grupos experimentais foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio. Resumidamente, 100 µl de amostra do plasma ou macerado foi injetado no aparelho contendo solução de iodo acidificada. O óxido nítrico formado então é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (Sievers Modelo 280 NO analyzer, Boulder, CO). Os dados obtidos foram analisados pelo programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) (Damacena-Angelis et

al. 2017). Para a quantificação de espécies nitrosiladas, foi adicionada a amostra sulfanilamida ácida (5% em ácido fosfórico) na proporção de 10% do volume da amostra. Após 5 minutos de reação 500 µl de amostra foram injetados no analisador como descrito acima (Pinheiro et al. 2016).

4.9 Análise estatística

Todos os resultados foram analisados levando-se em consideração os erros padrões e suas respectivas médias (EPM). As comparações entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) de 2 vias seguida do teste de Tukey. Para avaliar correlação foi utilizado o método de Pearson. Consideramos significativo $P < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

A fim de comprovar o aumento do pH gástrico resultante dos tratamentos com ranitidina e omeprazol, foi mensurado o pH do lavado gástrico dos animais. Constatou-se que a ranitidina e o omeprazol aumentaram o pH gástrico significativamente comparado ao veículo nitrito e ao controle e a ranitidina levou a um aumento de pH intermediário entre o omeprazol e o veículo (veículo = $3,4 \pm 0,1$; ranitidina = $4,4 \pm 0,06$; omeprazol = $5,7 \pm 0,1$; $p < 0,05$) (Figura 4A).

Com o intuito de averiguar a interferência do tratamento com ranitidina no efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio, utilizamos o L-NAME para induzir hipertensão em ratos (BL). Houve aumento da pressão arterial em todos os grupos que receberam L-NAME comparado ao controle ($p < 0,05$; Figura 4B) e todos os grupos experimentais tiveram pressões arteriais basais semelhantes.

O tratamento com nitrito de sódio diminui a pressão arterial significativamente, porém o pré-tratamento com ranitidina atenuou o efeito anti-hipertensivo do nitrito de forma intermediária ao tratamento com omeprazol, assim como no aumento do pH (veículo = $-38,4 \pm 1,1$ mmHg, ranitidina = $-32,7 \pm 0,8$ mmHg e omeprazol = $-25,9 \pm 1,3$ mmHg; $P < 0,05$) (Figura 4B e C).

Figura 4. pH do lavado gástrico em todos os grupos experimentais (A). Pressão arterial média (PAM) de ratos que receberam veículo, omeprazol ou ranitidina, após 1h e 30 min receberam L-NAME (BL) e 30 min depois uma dose de nitrito de sódio (NO₂⁻) ou o controle que não recebeu nitrito (B). ΔPAM dos animais tratados com uma dose de nitrito (C). Os dados são mostrados como médias ± EPM (n = 7-9 por grupo). * p<0,05 versus veículo. # p<0,05 para BL versus NO₂⁻. \$ p<0,05 versus ranitidina.

Avaliamos as concentrações plasmáticas de NOx, nitrito, e espécies nitrosiladas a fim de verificar o efeito do tratamento com nitrito de sódio nos níveis circulantes dessas espécies e investigar se as alterações no Δ PAM após o tratamento com nitrito de sódio entre os ratos pré-tratado com ranitidina ou omeprazol estão relacionadas a alterações nos níveis circulantes dessas espécies.

Os animais tratados com nitrito de sódio apresentaram significativo aumento na concentração plasmática de NOx no grupo veículo comparado ao grupo controle (controle = $74,1 \pm 18,2 \mu\text{mol} / \text{L}$, veículo = $138 \pm 11,2 \mu\text{mol} / \text{L}$; $p < 0,05$). O pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol não alteraram esse efeito (veículo = $138 \pm 11,2 \mu\text{mol} / \text{L}$, ranitidina = $132, \pm 13,5 \mu\text{mol} / \text{L}$, omeprazol = $136,2 \pm 9,5 \mu\text{mol} / \text{L}$ $p > 0,05$) (Figura 5A).

O tratamento com nitrito de sódio elevou significativamente a concentração plasmática de nitrito no grupo veículo comparado ao grupo controle (controle = $0,9 \pm 0,1 \mu\text{mol} / \text{L}$, veículo = $38,3 \pm 7,4 \mu\text{mol} / \text{L}$; $p < 0,05$). Entretanto, o pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol não modificou esse efeito (veículo = $38,3 \pm 7,4 \mu\text{mol} / \text{L}$, ranitidina = $40 \pm 4,7 \mu\text{mol} / \text{L}$, omeprazol = $35,9 \pm 5,4 \mu\text{mol} / \text{L}$ $p > 0,05$) (Figura 5B).

O tratamento com nitrito de sódio alterou a concentração plasmática de espécies nitrosiladas no grupo veículo, levando a um aumento da concentração dessas espécies, quando comparado ao grupo controle (controle = $23,4 \pm 2,3 \text{ nmol} / \text{L}$, veículo = $72,9 \pm 11,2 \text{ nmol} / \text{L}$; $p < 0,05$). Já o pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol atenuou o aumento de espécies nitrosiladas no plasma (veículo = $72,9 \pm 11,2 \text{ nmol} / \text{L}$, ranitidina = $37,9 \pm 7,9 \text{ nmol} / \text{L}$, e omeprazol = $33,5 \pm 7,3 \text{ nmol} / \text{L}$; $P < 0,05$) (Figura 5C). Curiosamente, a redução da formação de espécies nitrosiladas foi relacionada com a atenuação na queda da PAM promovida pelo pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol.

Figura 5. Concentrações de NOx (A), nitrito (B) e RXNO (C) no plasma de ratos tratados com L-NAME que receberam nitrito de sódio por via oral (15 mg / kg) 2 h após receber veículo, omeprazol (30 mg / kg) ou ranitidina (100 mg/kg) por gavagem ou controle que não recebeu nitrito. Os dados são mostrados como médias $\pm$ EPM (n = 7-9 por grupo). * p<0,05 versus veículo, & p<0,05 versus controle.

Dada a importância do ambiente gástrico na conversão não enzimática do nitrito, foi verificado o efeito do tratamento com nitrito de sódio na formação de NO gástrico e nas concentrações de nitrito, NOx e espécies nitrosiladas no estômago e se o pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol alteram essas concentrações.

Observamos que os animais veículo tratados com nitrito apresentaram um expressivo aumento nas concentrações de NO gástrico comparado ao controle (controle = $0,79 \pm 0,01$ pmol / μ L, veículo = $75,6 \pm 14,8$ pmol / μ L; $p < 0,05$). O pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol atenuou o aumento na concentração de NO gástrico comparado ao veículo (veículo = $75,6 \pm 14,8$ pmol / μ L, ranitidina = $23,3 \pm 11,1$ pmol / μ L, omeprazol = $29,4 \pm 11,3$ pmol / μ L; $p < 0,05$) (Figura 6A). A redução da formação de NO, como as espécies nitrosiladas, foi relacionada com a atenuação na queda da PAM promovida pelo pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol.

O tratamento com nitrito de sódio aumentou a concentração de nitrito no estômago comparado ao controle (controle = $2,4 \pm 0,3$ pmol / mg, veículo = $83,9 \pm 12,7$ pmol / mg; $p < 0,05$). Já o pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol aumentou ainda mais essa concentração no estômago (veículo = $83,9 \pm 12,7$ pmol / mg, ranitidina = $23,3 \pm 11,1$ pmol / mg, omeprazol = $29,4 \pm 11,3$ pmol / mg; $p < 0,05$) (Figura 6B).

O tratamento com nitrito de sódio não aumentou as concentrações de NOx comparado ao controle e o pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol não alterou essa concentração (controle = $23 \pm 2,1$ μ mol / mg, veículo = $26,1 \pm 1,8$ μ mol / mg, ranitidina = 28 ± 3 μ mol / mg, omeprazol = $27,9 \pm 2,3$ μ mol / mg; $p > 0,05$) (Figura 6C).

A concentração de espécies nitrosiladas no estômago aumentou após o tratamento com nitrito ($p < 0,05$) e o pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol não alterou essa concentração ($p > 0,05$) (controle = $0,6 \pm 0,1$ pmol / mg, veículo = $16,8 \pm$

4,3 pmol / mg, ranitidina = $18,9 \pm 2,6$ pmol / mg, omeprazol = $23,7 \pm 2,7$ pmol / mg) (Fig 6D).

Figura 6. Concentrações de NO gástrico (A), nitrito (B), NOx (C) e RXNO (D) no estômago de ratos tratados com L-NAME que receberam nitrito de sódio por via oral (15 mg / kg) 2 h após receber veículo, omeprazol (30 mg / kg) ou ranitidina (100mg/kg) por gavagem ou controle que não recebeu nitrito. Os dados são mostrados como médias $\pm$ EPM (n = 7-9 por grupo). * p<0,05 versus veículo, & p<0,05 versus controle.

A fim de mimetizar e comparar com os efeitos produzidos pela ranitidina e o omeprazol, realizamos o protocolo 2 utilizando tampões no mesmo pH gástrico obtido pelo tratamento com veículo (pH 3,5), ranitidina (pH 4,5) e omeprazol (pH 5,5). Utilizando os tampões foi possível observar o efeito apenas do pH na via não enzimática do nitrito, sem outros possíveis efeitos das drogas.

O pH do lavado gástrico foi medido o que resultou nos valores: $3,4 \pm 0,1$; $4,4 \pm 0,06$ e $5,7 \pm 0,1$, estes diferiram entre si e foi confirmado que as soluções controlam o pH gástrico e mimetizaram o pH dos grupos tratados com omeprazol e ranitidina ($p < 0,05$; Figura 7A).

Em relação à interferência dos tampões no efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio, todos os grupos que receberam L-NAME aumentaram a pressão arterial comparado ao controle e todos saíram do mesmo BL ($p < 0,05$) (Figura 7B).

O tratamento com nitrito de sódio reduziu a pressão arterial significativamente, porém os tampões 4,5 e 5,5 atenuaram o efeito anti-hipertensivo do nitrito e o tampão 4,5 atenuou de forma intermediária ao tampão 5,5, de forma relacionado aos aumentos do pH (Figura 7B e C) (pH 3,5 = $-38,7 \pm 0,7$ mmHg, pH 4,5 = $33,7 \pm 1,3$ mmHg, pH 5,5 = $21,7 \pm 1,1$ mmHg; $p < 0,05$).

Figura 7. pH do lavado gástrico em todos os grupos experimentais (A). Pressão arterial média (PAM) de ratos que receberam os tampões no pH 3,5; 4,5 e 5,5, após 1h e 30 min receberam L-NAME (BL) e 30 min depois uma dose de nitrito de sódio (NO₂⁻) ou o controle que não recebeu nitrito (B). Δ de PAM nos animais tratados com uma dose de nitrito (C). Os dados são mostrados como médias ± EPM (n = 8-10 por grupo). * p<0,05 versus pH 3,5. # p<0,05 para BL versus NO₂⁻. \$ p<0,05 versus pH 4,5.

Analizamos as concentrações plasmáticas de NOx, nitrito, e espécies nitrosiladas nos animais que receberam tampão.

O tratamento com nitrito de sódio elevou significativamente a concentração plasmática nitrito no tampão 3,5 (controle = $0,9 \pm 0,1 \mu\text{mol} / \text{L}$, pH 3,5 = $35,6 \pm 7,6 \mu\text{mol} / \text{L}$; $p < 0,05$). O tratamento com os tampões 4,5 e 5,5 não modificou esse efeito (pH 3,5 = $35,6 \pm 7,6 \mu\text{mol} / \text{L}$, pH 4,5 = $43,1 \pm 8,8 \mu\text{mol} / \text{L}$, pH 5,5 = $40,8 \pm 9,9 \mu\text{mol} / \text{L}$; $p > 0,05$) (Figura 8A).

As concentrações de NOx se mantiveram as mesmas em todos os grupos experimentais, mesmo nos grupos que receberam nitrito de sódio comparado ao controle que não recebeu (controle = $50,8 \pm 14,8 \mu\text{mol} / \text{L}$, pH 3,5 = $56 \pm 8,6 \mu\text{mol} / \text{L}$, pH 4,5 = $65,5 \pm 11,8 \mu\text{mol} / \text{L}$, pH 5,5 = $61,5 \pm 7,6 \mu\text{mol} / \text{L}$; $p > 0,05$) (Figura 8B).

O tratamento com nitrito de sódio elevou significativamente a concentração plasmática de espécies nitrosiladas no grupo tampão 3,5 comparado ao controle (controle = $21,7 \pm 2,5 \text{nmol} / \text{L}$, pH 3,5 = $43,1 \pm 5,2 \text{nmol} / \text{L}$; $p < 0,05$). Já o tratamento com os tampões 4,5 e 5,5 atenuou esse aumento (pH 3,5 = $43,1 \pm 5,2 \text{nmol} / \text{L}$, pH 4,5 = $26,3 \pm 2,5 \text{nmol} / \text{L}$, pH 5,5 = $27 \pm 4,2 \text{nmol} / \text{L}$; $p < 0,05$) (Figura 8C). Essas alterações condizem com as encontradas pelo pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol.

Figura 8. Concentrações de NOx (A), nitrito (B) e RXNO (C) no plasma de ratos que receberam L-NAME, 25 min depois os tampões 3,5; 4,5 ou 5,5 por via oral e depois de 5 min o nitrito de sódio ou o controle que não recebeu nitrito. Os dados são mostrados como médias $\pm$ EPM ($n = 8-10$ por grupo). * $p < 0,05$ versus veículo, & $p < 0,05$ versus controle.

Por fim, foi realizada a quantificação da formação de NO gástrico e as concentrações de nitrito, NOx e espécies nitrosiladas no estômago.

Confirmamos que os animais tratados com tampão 3,5 tratados com nitrito apresentaram um aumento significativo nas concentrações de NO gástrico (controle = $0,07 \pm 0,01$ pmol / μ L, pH 3,5 = $139,3 \pm 25,9$ pmol / μ L; $p < 0,05$). O tratamento com tampões 4,5 e 5,5 atenuou, na mesma extensão, o aumento na concentração de NO gástrico comparado ao tratamento com tampão 3,5 (pH 3,5 = $139,3 \pm 25,9$ pmol / μ L, pH 4,5 = $38,3 \pm 12,2$ pmol / μ L, pH 5,5 = $21,5 \pm 8,6$ pmol / μ L; $p < 0,05$) (Figura 9A).

Já nos níveis de nitrito no estômago, o tratamento com nitrito de sódio aumentou a concentração de nitrito no estômago (controle = $4 \pm 1,1$ pmol / mg, pH 3,5 = 290 ± 70 pmol / mg; $p < 0,05$). Os tampões 4,5 e 5,5 aumentaram, na mesma proporção, a concentração de nitrito comparado ao tampão 3,5 (pH 3,5 = 290 ± 70 pMol / mg, pH 4,5 = $776,7 \pm 75,9$ pmol / mg, pH 5,5 = $643,4 \pm 78,9$ pmol / mg; $p < 0,05$) (Figura 9B).

O tratamento com nitrito de sódio não aumentou as concentrações de NOx comparado ao controle e o tampões 4,5 e 5,5 não alteraram essa concentração (controle = $20,7 \pm 2,8$ μ mol / mg, pH 3,5 = $18,1 \pm 2,2$ μ mol / mg, pH 4,5 = $17,7 \pm 2,7$ μ mol / mg, pH 5,5 = $18,4 \pm 1,8$ μ mol / mg; $p > 0,05$) (Figura 9C).

A concentração de espécies nitrosiladas no estômago aumentou após o tratamento com nitrito ($p < 0,05$) e os tampões 4,5 e 5,5 não alteraram essa concentração ($p > 0,05$) (controle = $0,8 \pm 0,1$ pmol / mg, pH 3,5 = $13,8 \pm 1,2$ pmol / mg, pH 4,5 = $13,5 \pm 5,4$ pmol / mg, pH 5,5 = $13,7 \pm 4,2$ pmol / mg) (Figura 9D).

Figura 9. Concentrações de NO gástrico (A), nitrito (B), NOx (C) e RXNO (D) no estômago de ratos tratados com L-NAME, 25 min depois os tampões 3,5; 4,5 ou 5,5 por via oral e depois de 5 min o nitrito de sódio ou o controle que não recebeu nitrito. Os dados são mostrados como médias $\pm$ EPM ($n = 8-10$ por grupo). * $p < 0,05$ versus pH 3,5, & $p < 0,05$ versus controle.

Foram feitas correlações para comprovar a associação entre alguns eventos.

Observamos uma correlação negativa entre o aumento do pH do estômago dos ratos tratados com ranitidina, omeprazol e veículo e a formação gástrica de NO (Figura 10A; $r = -0,5332$; $P = 0,0088$). Essa correlação foi mantida nos ratos tratados com os tampões 3,5; 4,5 e 5,5 (Figura 10B; $r = -0,7422$; $P < 0,0001$).

Entre a formação gástrica de NO e espécies nitrosiladas, há uma correlação positiva nos ratos tratados com ranitidina, omeprazol e veículo (Figura 10C; $r = 0,8603$; $P < 0,0001$) e nos ratos tratados com os tampões (Figura 10D; $r = 0,7125$; $P < 0,0001$).

Foi demonstrada uma correlação negativa entre o aumento de espécies nitrosiladas e o Δ PAM de ratos tratados com ranitidina, omeprazol e veículo (Figura 10E; $r = -0,7794$; $P < 0,001$). Essa correlação foi mantida nos ratos tratados com os tampões 3,5; 4,5 e 5,5 (Figura 10F; $r = -0,5318$; $P = 0,0062$).

Figura 10. Correlação entre o pH e o as concentrações de NO gástrico; entre as concentrações de NO gástrico e RXNO e entre as concentrações de RXNO em ratos tratados com veículo, omeprazol (30 mg / kg) ou ranitidina (100mg/kg) ou após receber os tampões 3,5; 4,5 e 5,5. R = coeficiente de correlação de Pearson ($n = 23$ nos tratamentos com as drogas; $n = 25$ nos tratamentos com tampão).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente trabalho foram:

(I) o pré-tratamento com ranitidina aumentou o pH gástrico e atenuou o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio oral, de modo intermediário quando comparado ao pré-tratamento com omeprazol;

(II) o pré-tratamento com ranitidina resultou na diminuição da formação gástrica de NO e a diminuição da concentração circulante de espécies nitrosiladas, de maneira similar às encontradas com o tratamento com omeprazol;

(III) o pré-tratamento com ranitidina resultou no aumento da formação de nitrito no estômago, de maneira similar às encontradas com o pré-tratamento com omeprazol;

(IV) o tratamento com tampões com valores de pH similares aos valores de pH gástrico encontrados após o tratamento com veículo, ranitidina e omeprazol resultou em efeitos semelhantes aos observados com essas drogas.

Atualmente, tem sido analisada a importância da via nitrato-nitrito-NO e as suas possibilidades terapêuticas em doenças cardiovasculares (Kapil et al. 2014). O tratamento crônico ou agudo com nitrito de sódio reduz a pressão arterial em diversos modelos de hipertensão, incluindo o modelo L-NAME (Pinheiro et al. 2012; Montenegro et al. 2014). Com a finalidade de avaliar os efeitos do nitrito de sódio na PAM, induzimos hipertensão com o modelo agudo L-NAME, uma vez que o nitrito de sódio 15 mg/kg por gavagem, não induz alterações na PAM em ratos normotensos (Pinheiro et al. 2016). No presente estudo, a administração do nitrito de sódio levou a uma queda de aproximadamente 40 mmHg, o que corrobora com valores já apresentados na literatura (Pinheiro et al. 2012).

Os mecanismos que elucidam os efeitos anti-hipertensivos de nitrito de sódio ainda não foram claramente demonstrados. Embora na circulação, o nitrito possa ser convertido a NO em leitos vasculares por vias enzimáticas e exerce seu efeito vasodilatador, diversos estudos tem demonstrado a importância da conversão não enzimática do nitrito, que ocorre no estômago, para os seus efeitos anti-hipertensivos (Lundberg et al. 2008; Pinheiro et al. 2017).

Os primeiros estudos que demonstram a conversão do nitrito a NO no pH ácido do estômago são do ano de 1994 (Benjamin et al. 1994; Lundberg et al. 1994). Embora tenham decorrido mais de duas décadas a partir destes estudos iniciais, não havia sido registrado qualquer efeito inibitório de drogas que interferem na secreção ácida gástrica sobre as respostas anti-hipertensivas do nitrito de sódio administrado por via oral. Assim, nosso grupo demonstrou recentemente que o pré-tratamento com omeprazol interfere no efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio (Pinheiro et al. 2012). No presente estudo, reproduzimos estes achados prévios, sendo que o pré-tratamento com omeprazol diminuiu cerca da metade do efeito hipotensor do nitrito de sódio e esses dados corroboram os valores já apresentados na literatura (Pinheiro et al. 2012; Amaral et al. 2013). Comprovada a interferência do omeprazol no efeito hipotensor do nitrito, fez-se necessária a análise de outra droga que interfira no pH ácido do estômago e sua possível relação com esses efeitos do nitrito, já que esses achados podem ter implicações clínicas importantes para pacientes que fazem uso de inibidores da secreção gástrica.

Deste modo, neste estudo foi avaliado se o pré-tratamento com ranitidina produz alterações nos efeitos do nitrito de sódio. Esta droga aumentou o pH gástrico de forma intermediária em comparação com o tratamento com omeprazol e veículo, o que foi associado à um comprometimento intermediário do efeito hipotensor do

nitrito de sódio. A relação entre o aumento crescente do pH gástrico e a diminuição do efeito anti-hipertensivo do nitrito, reforça a importância do ambiente ácido do estômago para o efeito do nitrito de sódio na PAM.

O tratamento com nitrito de sódio levou a um aumento nos níveis plasmáticos de nitrito e NOx (nitrato + nitrito), porém, o pré-tratamento com ranitidina ou omeprazol não alteraram essas concentrações. Assim, a atenuação do efeito hipotensor do nitrito provocado pelo aumento do pH a partir da administração dessas drogas não é claramente refletido nas concentrações dessas espécies. Isto sugere que os efeitos anti-hipertensivos do nitrito não possam ser explicados exclusivamente pelo aumento das concentrações de nitrito e nitrato circulante.

Interessantemente, o presente trabalho demonstra que o tratamento com nitrito aumenta a formação de NO e o pré-tratamento com ranitidina reduz a formação de NO gástrico quando comparado ao veículo, sendo esta redução similar àquela encontrada após o tratamento com omeprazol. O presente estudo corrobora os achados do estudo feito por Lundberg e colegas em 1994, o qual demonstra redução do NO gástrico após pré-tratamento com omeprazol (Lundberg et al. 1994). Esta redução do NO gástrico sugere que a formação do NO gástrico influencia o efeito anti-hipertensivo do nitrito. De fato, descobertas anteriores mostraram que o consumo de nitrito induz a difusão do NO à vasculatura gástrica e pode modular o fluxo sanguíneo local, podendo então gerar consequências importantes na redução da pressão arterial (Rocha et al. 2010). Porém o NO possui um tempo de meia vida na circulação extremamente curto, de cerca de 1 segundo (Cosby et al. 2003), o que dificulta a atribuição dos efeitos anti-hipertensivos do nitrito a somente este gás produzido no estômago.

Neste contexto, o ambiente ácido do estômago converte nitrito a NO e forma diversas de espécies nitrosiladas, em especial os nitrosotióis (Richardson et al. 2002; Lundberg et al. 2008; Lundberg et al. 2013). No presente estudo, o tratamento com nitrito aumentou a formação de espécies nitrosiladas e o pré-tratamento com ranitidina reduziu a formação espécies nitrosiladas quando comparado ao veículo e essa redução foi similar ao tratamento com omeprazol. Essa relação encontrada com o tratamento com ranitidina reforça que a formação de espécies nitrosiladas está relacionada com o efeito anti-hipertensivo do nitrito, como demonstrado em outro trabalho do nosso grupo, a partir do tratamento com omeprazol (Pinheiro et al. 2015). Portanto, conjuntamente, estas evidências apoiam a ideia de que o tratamento com nitrito promove o aumento de espécies nitrosiladas no plasma de forma dependente do pH gástrico e que estas espécies estão relacionadas ao efeito hipotensor do nitrito de sódio administrado por via oral.

Importantemente, os nitrosotióis podem carrear o NO ativo, atuando diretamente como doador de NO e assim, teoricamente, o NO formado no estômago possa assim atingir de forma mais eficaz a vasculatura sistemicamente (Pereira et al. 2015). Adiciona-se que os nitrosotióis devem ser abordados como muito mais que doadores de NO, pois eles, através da nitrosação, podem regular diversas funções proteicas, podem alterar a atividade de receptores, enzimas e sinalizadores celulares por, podendo possivelmente participar do efeito anti-hipertensivo do nitrito (Stamler et al. 2001; Gould et al. 2013).

No presente trabalho, foi observado que o pré-tratamento com ranitidina e omeprazol, aumentou a concentração de nitrito no estômago, o que pode ser explicado pelo aumento do pH gástrico, que acarretou na menor formação de NO e espécies nitrosiladas (Pinheiro et al. 2015). Desse modo, sugere-se que o nitrito

pode ter se acumulado no estômago, já que uma parte não foi reduzida a NO e espécies nitrosiladas, em decorrência do aumento do pH gástrico.

De fato, o tratamento com ranitidina ou omeprazol levou a reduções similares da formação de NO gástrico e RXNO e a aumentos similares na concentração de nitrito gástrico. Por outro lado, observamos os valores de pH e a atenuação dos efeitos anti-hipertensivos induzidos pelo nitrito foram maiores com o tratamento com o omeprazol em comparação com a ranitidina. Portanto, é possível que outros mecanismos além da formação dessas espécies possam estar parcialmente envolvidos na atenuação dos efeitos anti-hipertensivos do nitrito pH-dependentes. Estudos adicionais são necessários para explorar esses possíveis mecanismos.

Observando o impacto da ranitidina e do omeprazol no efeito hipotensor do nitrito de sódio, nas concentrações circulantes medidos e considerando-se que essas drogas alteraram o pH, decidimos realizar um protocolo com tampões para observar se alterações exclusivas no pH, similares às aquelas produzidas pelas drogas, reproduziriam os mesmos efeitos. Desse modo, realizamos tratamentos com tampões no pH 3,5; 4,5 e 5,5 que mimetizaram o pH dos grupos veículo, ranitidina e omeprazol, respectivamente.

Os tratamentos com os tampões resultaram em alterações no efeito hipotensor do nitrito de sódio e nas concentrações circulantes e gástricas medidas de maneira muito similar às encontradas com o tratamento com ranitidina e omeprazol. Esse achado reconfirma a importância do pH gástrico no efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio, ressaltando a importância do ambiente ácido do estômago na conversão do nitrito a NO e espécies nitrosiladas (Weitzberg et al. 2013; Pinheiro et al. 2015).

A partir dos resultados encontrados com o tratamento com veículo, ranitidina e omeprazol e com o tratamento com os tampões no pH 3,5; 4,5 e 5,5 realizamos correlações para visualizar de forma mais clara a relação entre os principais efeitos provocados por esses tratamentos. Houve uma correlação negativa entre o aumento do pH gástrico e a formação de NO e essa formação está correlacionado positivamente com a formação de espécies nitrosiladas nos tratamentos com as drogas e os tampões, sugerindo que o pH ácido do estômago propicia a formação dessas moléculas e o aumento do pH reduz essa formação, confirmando a importância do ambiente ácido do estômago na formação não enzimática de NO e espécies nitrosiladas a partir do nitrito (Richardson et al. 2002; Rocha et al. 2011).

Observamos também uma correlação negativa entre as concentrações de espécies nitrosiladas e o Δ PAM, ou seja, quanto maiores são os valores de espécies nitrosiladas, maiores são as quedas da PAM induzidas pelo nitrito. Nos dois protocolos experimentais verificamos que o efeito anti-hipertensivo do nitrito aumenta de forma correlacionada com o aumento da concentração das espécies nitrosiladas. Logo, sugerimos que o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio ocorre, ao menos em parte, devido à formação de espécies nitrosiladas, principalmente nitrosotióis, no estômago de forma dependente do pH.

Essas observações podem ser de grande relevância clínica para pacientes que fazem uso de inibidores da secreção ácido do estômago e possuem doenças cardiovasculares subclínicas ou até mesmo indivíduos saudáveis, pois provavelmente estão perdendo o efeito protetor importante do nitrito na dieta, o que pode predispor esses pacientes a maior risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares significativos.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou pela primeira vez a interferência do pré-tratamento com ranitidina no efeito hipotensor do nitrito de sódio e na formação de NO e espécies nitrosiladas no estômago. Nossos dados permitiram demonstrar que o pré-tratamento com ranitidina aumentou o pH gástrico e atenuou o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio oral. Essa atenuação foi associada à diminuição da formação gástrica de NO e à diminuição da formação de espécies nitrosiladas, sugerindo um importante papel destes metabólitos nos efeitos observados. Os resultados do presente estudo reforçam as fortes evidências de que a diminuição do efeito hipotensor do nitrito de sódio ocorre de forma dependente do pH e, pelo menos em parte, pela diminuição da formação de NO e espécies nitrosiladas independentemente dos níveis plasmáticos de nitrito. Assim, concluímos que a ranitidina interfere no efeito hipotensor do nitrito de sódio oral.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Al-Solaiman, Y., et al. (2010). "DASH lowers blood pressure in obese hypertensives beyond potassium, magnesium and fibre." **J Hum Hypertens** 24(4): 237-246.
- Alzawahra, W. F., et al. (2008). "Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 295(2): H499-508.
- Amaral, J. H., et al. (2015). "Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension." **Redox Biol** 5: 340-346.
- Amaral, J. H., et al. (2013). "TEMPOL enhances the antihypertensive effects of sodium nitrite by mechanisms facilitating nitrite-derived gastric nitric oxide formation." **Free Radic Biol Med** 65: 446-455.
- Appel, L. J., et al. (1997). "A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group." **N Engl J Med** 336(16): 1117-1124.
- Ari, H., et al. (2010). "A novel predictor of restenosis and adverse cardiac events: asymmetric dimethylarginine." **Heart Vessels** 25(1): 19-26.
- Asseff, I. L., et al. (2016). "Pharmacokinetics of ranitidine in preterm and term neonates with gastroesophageal reflux." **BMC Pediatr** 16: 90.
- Azizollahi, H. R. and M. Rafeey (2016). "Efficacy of proton pump inhibitors and H2 blocker in the treatment of symptomatic gastroesophageal reflux disease in infants." **Korean J Pediatr** 59(5): 226-230.

- Balan, T., et al. (2015). "Antioxidant and anti-inflammatory activities contribute to the prophylactic effect of semi-purified fractions obtained from the crude methanol extract of *Muntingia calabura* leaves against gastric ulceration in rats." **J Ethnopharmacol** 164: 1-15.
- Bateman, D. N., et al. (2003). "Mortality study of 18 000 patients treated with omeprazole." **Gut** 52(7): 942-946.
- Baylis, C., et al. (1992). "Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage." **J Clin Invest** 90(1): 278-281.
- Benjamin, N., et al. (1994). "Stomach NO synthesis." **Nature** 368(6471): 502.
- Bjelakovic, G., et al. (2007). "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis." **JAMA** 297(8): 842-857.
- Brittain, R. T. and M. J. Daly (1981). "A review of the animal pharmacology of ranitidine--a new, selective histamine H₂-antagonist." **Scand J Gastroenterol Suppl** 69: 1-9.
- Broniowska, K. A. and N. Hogg (2012). "The chemical biology of S-nitrosothiols." **Antioxid Redox Signal** 17(7): 969-980.
- Camilleri, M. and V. Stanghellini (2013). "Current management strategies and emerging treatments for functional dyspepsia." **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 10(3): 187-194.

- Cosby, K., et al. (2003). "Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation." **Nat Med** 9(12): 1498-1505.
- Damacena-Angelis, C., et al. (2017). "Nitrate decreases xanthine oxidoreductase-mediated nitrite reductase activity and attenuates vascular and blood pressure responses to nitrite." **Redox Biol** 12: 291-299.
- Dykhuizen, R. S., et al. (1996). "Antimicrobial effect of acidified nitrite on gut pathogens: importance of dietary nitrate in host defense." **Antimicrob Agents Chemother** 40(6): 1422-1425.
- Francis, S. H., et al. (2010). "cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action." **Pharmacol Rev** 62(3): 525-563.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." **Nature** 288(5789): 373-376.
- Ghebremariam, Y. T., et al. (2013). "Unexpected effect of proton pump inhibitors: elevation of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine." **Circulation** 128(8): 845-853.
- Ghosh, S. M., et al. (2013). "Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential." **Hypertension** 61(5): 1091-1102.
- Gladwin, M. T., et al. (2005). "The emerging biology of the nitrite anion." **Nat Chem Biol** 1(6): 308-314.

- Golan, D. E. e. a. (2014). **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Gould, N., et al. (2013). "Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation." **J Biol Chem** 288(37): 26473-26479.
- Hatlebakk, J. G. and A. Berstad (1996). "Pharmacokinetic optimisation in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease." **Clin Pharmacokinet** 31(5): 386-406.
- Hess, D. T., et al. (2005). "Protein S-nitrosylation: purview and parameters." **Nat Rev Mol Cell Biol** 6(2): 150-166.
- Hung, H. C., et al. (2004). "Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease." **J Natl Cancer Inst** 96(21): 1577-1584.
- Ignarro, L. J., et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." **Proc Natl Acad Sci U S A** 84(24): 9265-9269.
- Joshipura, K. J., et al. (1999). "Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke." **JAMA** 282(13): 1233-1239.
- Joshipura, K. J., et al. (2001). "The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease." **Ann Intern Med** 134(12): 1106-1114.
- Kapil, V., et al. (2010). "Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO." **Hypertension** 56(2): 274-281.

- Kapil, V., et al. (2014). "Clinical evidence demonstrating the utility of inorganic nitrate in cardiovascular health." **Nitric Oxide** 38: 45-57.
- Kim-Shapiro, D. B. and M. T. Gladwin (2014). "Mechanisms of nitrite bioactivation." **Nitric Oxide** 38: 58-68.
- Kumar, V., et al. (2012). "Cardiovascular redox and ox stress proteomics." **Antioxid Redox Signal** 17(11): 1528-1559.
- Lamers, C. B. (1996). "The changing role of H₂-receptor antagonists in acid-related diseases." **Eur J Gastroenterol Hepatol** 8 Suppl 1: S3-7.
- Lauer, T., et al. (2001). "Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action." **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(22): 12814-12819.
- Lima, B., et al. (2010). "S-nitrosylation in cardiovascular signaling." **Circ Res** 106(4): 633-646.
- Lu, T. M., et al. (2011). "Plasma asymmetric dimethylarginine predicts death and major adverse cardiovascular events in individuals referred for coronary angiography." **Int J Cardiol** 153(2): 135-140.
- Lucas C. Pinheiroa, G. H. O.-P., Rafael L. Portellaa, Danielle A. Guimarães, Celio D. de Angelisb, Jose E. Tanus-Santosa (2016). "Omeprazol impairs vascular redox biology and causes xanthine oxidoreductase-mediated endothelial dysfunction." **Redox biology** 9: 134-143.
- Lundberg, J. O., et al. (2006). "Cardioprotective effects of vegetables: is nitrate the answer?" **Nitric Oxide** 15(4): 359-362.

- Lundberg, J. O. and M. Govoni (2004). "Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide." **Free Radic Biol Med** 37(3): 395-400.
- Lundberg, J. O. and E. Weitzberg (2013). "Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract." **Gut** 62(4): 616-629.
- Lundberg, J. O., et al. (2004). "Nitrate, bacteria and human health." **Nat Rev Microbiol** 2(7): 593-602.
- Lundberg, J. O., et al. (2008). "The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics." **Nat Rev Drug Discov** 7(2): 156-167.
- Lundberg, J. O., et al. (1994). "Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air." **Gut** 35(11): 1543-1546.
- Malfara, W. R., et al. (2002). "Effects of H(2)-receptor antagonists on dapsone-induced methaemoglobinaemia in rats." **Pharmacol Res** 45(4): 269-273.
- Maron, B. A., et al. (2013). "S-nitrosothiols and the S-nitrosoproteome of the cardiovascular system." **Antioxid Redox Signal** 18(3): 270-287.
- McKnight, G. M., et al. (1997). "Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans." **Gut** 40(2): 211-214.
- Miller, E. R., 3rd, et al. (2006). "The effects of macronutrients on blood pressure and lipids: an overview of the DASH and OmniHeart trials." **Curr Atheroscler Rep** 8(6): 460-465.

- Moncada, S. (1993). "The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles." **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res** 28: 97-99.
- Montenegro, M. F., et al. (2009). "Assessment of vascular effects of tamoxifen and its metabolites on the rat perfused hindquarter vascular bed." **Basic Clin Pharmacol Toxicol** 104(5): 400-407.
- Montenegro, M. F., et al. (2014). "Vascular xanthine oxidoreductase contributes to the antihypertensive effects of sodium nitrite in L-NAME hypertension." **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 387(6): 591-598.
- Montenegro, M. F., et al. (2012). "Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension." **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 385(5): 509-517.
- Ness, A. R. and J. W. Powles (1997). "Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: a review." **Int J Epidemiol** 26(1): 1-13.
- Oliveira-Paula, G. H., et al. (2016). "Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms." **Gene** 575(2 Pt 3): 584-599.
- Omar, S. A., et al. (2016). "Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases." **J Intern Med** 279(4): 315-336.
- Palmer, R. M., et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." **Nature** 327(6122): 524-526.

- Pereira, C., et al. (2015). "Dietary nitrite induces nitrosation of the gastric mucosa: the protective action of the mucus and the modulatory effect of red wine." **J Nutr Biochem** 26(5): 476-483.
- Petersson, J., et al. (2009). "Gastroprotective and blood pressure lowering effects of dietary nitrate are abolished by an antiseptic mouthwash." **Free Radic Biol Med** 46(8): 1068-1075.
- Petersson, J., et al. (2007). "Dietary nitrate increases gastric mucosal blood flow and mucosal defense." **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 292(3): G718-724.
- Pinheiro, L. C., et al. (2015). "Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension." **Free Radic Biol Med** 87: 252-262.
- Pinheiro, L. C., et al. (2016). "Oral nitrite circumvents antiseptic mouthwash-induced disruption of enterosalivary circuit of nitrate and promotes nitrosation and blood pressure lowering effect." **Free Radic Biol Med** 101: 226-235.
- Pinheiro, L. C., et al. (2012). "Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats." **Free Radic Biol Med** 53(4): 701-709.
- Pinheiro, L. C., et al. (2017). "The potential of stimulating nitric oxide formation in the treatment of hypertension." **Expert Opin Ther Targets** 21(5): 543-556.
- Raubenheimer, K., et al. (2017). "Acute Effects of Nitrate-Rich Beetroot Juice on Blood Pressure, Hemostasis and Vascular Inflammation Markers in Healthy

- Older Adults: A Randomized, Placebo-Controlled Crossover Study." **Nutrients** 9(11).
- Richardson, G., et al. (2002). "The ingestion of inorganic nitrate increases gastric S-nitrosothiol levels and inhibits platelet function in humans." **Nitric Oxide** 7(1): 24-29.
- Rocha, B. S., et al. (2010). "Diffusion of nitric oxide through the gastric wall upon reduction of nitrite by red wine: physiological impact." **Nitric Oxide** 22(3): 235-241.
- Rocha, B. S., et al. (2011). "Dietary nitrite in nitric oxide biology: a redox interplay with implications for pathophysiology and therapeutics." **Curr Drug Targets** 12(9): 1351-1363.
- Rouse, I. L., et al. (1983). "Blood-pressure-lowering effect of a vegetarian diet: controlled trial in normotensive subjects." **Lancet** 1(8314-5): 5-10.
- Sander, M., et al. (1999). "A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans." **Hypertension** 33(4): 937-942.
- Shah, N. H., et al. (2015). "Proton Pump Inhibitor Usage and the Risk of Myocardial Infarction in the General Population." **PLoS One** 10(6): e0124653.
- Shih, C. J., et al. (2014). "Proton pump inhibitor use represents an independent risk factor for myocardial infarction." **Int J Cardiol** 177(1): 292-297.
- Stamler, J. S., et al. (2001). "Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism." **Cell** 106(6): 675-683.

- van Faassen, E. E., et al. (2009). "Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology." **Med Res Rev** 29(5): 683-741.
- Villanueva, C. and C. Giulivi (2010). "Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease." **Free Radic Biol Med** 49(3): 307-316.
- Webb, A. J., et al. (2008). "Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite." **Hypertension** 51(3): 784-790.
- Weitzberg, E. and J. O. Lundberg (2013). "Novel aspects of dietary nitrate and human health." **Annu Rev Nutr** 33: 129-159.
- Xu, X., et al. (2016). "A stepwise protocol for the treatment of refractory gastroesophageal reflux-induced chronic cough." **J Thorac Dis** 8(1): 178-185.
- Zweier, J. L., et al. (1995). "Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues." **Nat Med** 1(8): 804-809.