UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

LUCAS CÉZAR PINHEIRO

**Estudo de mecanismos anti-hipertensivos do nitrito
de sódio na hipertensão renovascular experimental**

Ribeirão Preto, SP

2014

LUCAS CEZAR PINHEIRO

Estudo de mecanismos anti-hipertensivos do nitrito de sódio na hipertensão renovascular experimental

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

Área de Concentração:
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo
Tanus dos Santos

Ribeirão Preto-SP

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Pinheiro, Lucas Cezar

Estudo de mecanismos anti-hipertensivos do nitrito de sódio na hipertensão renovascular experimental,

Ribeirão Preto, 2014.

112p. : il. ; xx cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo.

1. Nitrito. 2. Hipertensão. 3. Nitrosotióis. 4. Omeprazol. 5. Nitrato.

Agradeço a Deus por tudo, meus erros e acertos.

Agradeço a meus pais Gabriel e Maria da Penha pelo exemplo de trabalho e pela construção do meu caráter.

A Jacqueline, minha esposa, por todo amor, compreensão e dedicação.

Ao Professor José Eduardo Tanus dos Santos pela amizade, orientação e pelo exemplo diário de dedicação a pesquisa.

A meus irmãos Rômulo e Rodrigo pela amizade e por compartilhar e participar deste período tão importante.

Aos amigos do laboratório pelo convívio e paciência em especial a Graziela, Sandra e ao Gustavo pela amizade e pelos dias de imenso trabalho.

A meus amigos e amigas Franklin, Thiago, Aloísio, Felipe, Guilherme, Evandro, Arthur, Leonardo, Maurílio, Gabriel, Priciane, Tiago, Jader, Marcos, Davi, Anderson, Pâmela, Rafael, Marcio e Pedro pela amizade.

Aos funcionários e professores do departamento de farmacologia pelo auxílio em minha formação, em especial ao professor Fernando Morgan e a Jóse Ramon, a Sônia e a Fátima.

Aos professores membros da banca pelos ensinamentos e aos demais professores que ao decorrer de minha vida me auxiliaram na formação acadêmica e humana.

Agradeço a FAPESP, CNPQ e a CAPES pelo auxílio e financiamento deste trabalho.

Acredito que os pesos de todas as coisas têm que ser novamente determinados.

Nietzsche

Resumo

O NO regula diversos sistemas orgânicos. No sistema cardiovascular participa ativamente na regulação do tônus vascular entre outras funções. Disfunções na produção ou disponibilidade de NO podem comprometer sua atuação fisiológica. No âmbito vascular isto pode participar da hipertensão. Além da produção de NO pelas óxido nítrico sintases, outras vias paralela de produção fisiológica de NO a partir do nitrito tem sido descritas.

O nitrito é o produto inicial da oxidação do NO, sendo posteriormente oxidado a nitrato. Sabe-se que estas três moléculas formam um ciclo dentro do organismo, onde o nitrato é excretado na saliva e convertido a nitrito pelas bactérias bucais. Este nitrito é deglutido com a saliva e exerce seus efeitos, através da conversão a NO. A conversão de nitrito a NO pode ocorrer de forma enzimática ou não enzimática. Como forma não enzimática, o nitrito é convertido a NO pela reação com H^+ . Esta redução ocorre principalmente no estômago.

Esta tese visa elucidar possíveis mecanismos responsáveis pelos efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio. Avaliamos ratos 2 rins 1 clipe (2R1C) tratados com nitrito e nitrato e verificamos os efeitos anti-hipertensivo destes. De forma Interessante, o aumento do pH gástrico com omeprazol impediu o efeito anti-hipertensivo tanto do nitrito quanto do nitrato. O omeprazol não gerou qualquer diferença na concentração plasmática de nitrito e nitrato. Foi verificado que o tratamento com nitrito e nitrato resultou em aumento das espécies nitrosiladas no plasma e este aumento foi impedido pelo omeprazol.

Também testamos a influência do ciclo entero-salivar no efeito do nitrito e nitrato. Verificamos que o tratamento com enxaguante bucal levou ao bloqueio do

efeito anti-hipertensivo do nitrato, mas não alterou este efeito nos animais tratados com nitrito. Em todas as abordagens experimentais o efeito anti-hipertensivo do nitrito apenas ocorreu quando houve aumento da concentração plasmática de espécies nitrosiladas.

Palavras-chave: Nitrito, Hipertensão, Nitrato, Nitrosotióis, Omeprazol, Enxaguante bucal

Abstract

Nitric Oxide plays many functional roles in physiological systems. In the cardiovascular system it participates in a unique way in the regulation of vascular tone among other functions. Dysfunctions in the production or availability of NO may compromise their physiological activity and participate in hypertension. Besides the production of NO by the nitric oxide synthase, other physiological pathways of NO production from nitrite have been described.

The nitrite and nitrate are oxidation products of NO. Further nitrite is oxidized to nitrate. These three molecules are known to form a cycle in the body. Nitrate is excreted in saliva and reduced to nitrite by oral bacteria. Nitrite then is swallowed with the saliva and exerts its effects through conversion to NO. The conversion of nitrite to NO may occur by enzymatic or non-enzymatic manner. As a non-enzymatic way nitrite is reduced to NO by reaction with H^+ . This reaction occurs mainly in the stomach.

This thesis aims to elucidate possible mechanisms responsible for the anti-hypertensive effects of sodium nitrite. We studied 2K1C rats treated with nitrite and nitrate and checked anti-hypertensive effects of these molecules. The increased gastric pH by omeprazole prevented the anti-hypertensive effect of nitrite and nitrate. Omeprazole did not cause any differences in plasma nitrite and nitrate. It was found that treatment with nitrite and nitrate resulted in increased nitrosylated species in the plasma, and this increase was blocked by omeprazole.

We also tested the influence of the entero-salivary cycle effect of nitrite and nitrate. We found that treatment with mouthwash blunted the antihypertensive effect of nitrate but this effect did not change in animals treated with nitrite. Interestingly in

all experimental approaches the anti-hypertensive effect of nitrite only occurred when there was an increase in the plasma concentration of nitrosylated species

Key Words: Nitrite, Hypertension, Nitrate, Nitrosothiols, Omeprazole, Mouthwash.

Lista de Figuras

Figura 1.1: Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou omeprazol sobre a pressão arterial (A) e peso corporal dos animais(B)	39
Figura 1.2: Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou omeprazol sobre a pressão arterial média (A) e sobre o pH gástrico (B).....	42
Figura 1.3: Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de nitrito(A) e nitrato (B).....	44
Figura 1.4: Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou omeprazol sobre a concentração de nitrosotióis no plasma (A) e nitrito na aorta (B).....	47
Figura 2.1: Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou omeprazol sobre a pressão arterial sistólica (A) e peso corporal dos animais (B).....	50
Figura 2.2: Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou omeprazol sobre a pressão arterial média (A) e sobre o pH gástrico (B).....	53
Figura 2.3: Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de nitrito(A) e nitrato (B).....	56
Figura 2.4: Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de espécies nitrosiladas (A) nitrosaminas (B) e nitrosotióis (C).....	59
Figura 3.1: Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial (A) e peso corporal dos animais(B).....	62

Figura 3.2: Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial média (A) e sobre o número de bactérias bucais(B).....	65
Figura 3.3: Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrito(A) e nitrato (B).....	68
Figura 3.4: Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de espécies nitrosiladas (A) nitrosaminas (B) e nitrosotióis (C).....	71
Figura 4.1: Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial (A) e peso corporal dos animais(B).....	74
Figura 4.2: Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial média (A) e sobre o número de bactérias bucais(B).....	77
Figura 4.3: Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrito(A) e nitrato (B).....	80
Figura 4.4: Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de espécies nitrosiladas (A) nitrosaminas (B) e nitrosotióis (C).....	83
Figura 5.1 Efeito do tratamento com nitrito de sódio sobre ratos pré-tratados com BSO.....	86
Figura 5.2 Efeito do tratamento com nitrito de sódio na concentração plasmático de nitrito, espécies nitrosiladas, nitrosaminas e nitrosotióis em ratos pré-tratados com BSO.....	89

Listas de tabelas

Tabela 1.1: Pressão arterial sistólica dos animais tratados com nitrito e ou omeprazol.....	38
Tabela 2.1: Pressão arterial sistólica dos animais tratados com nitrato e ou omeprazol.....	49
Tabela 3.1: Pressão arterial sistólica dos animais tratados com nitrito e ou enxaguante bucal.....	61
Tabela 4.1: Pressão arterial sistólica dos animais tratados com nitrato e ou enxaguante bucal.....	73

Lista de abreviaturas

BSO: Butioninasulfoxamina

L-NAME: hidrocloreto de N_ω-Nitro-L-arginina metil Ester.

PAM: Pressão arterial média

PAS: Pressão arterial sistólica

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NOx: nitrito + nitrato

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

PKC: Proteína Quinase C

DASH: “Dietary approaches to stop hypertension”

FAD: Flavina Adenina nucleotídeo

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

BH4: Tetrahidrobiopterina

GSNO: S-Nitrosoglutathione

CSNO: S-Nitrosocisteína

2R1C: 2 rins 1 clipe

RNNO: Nitrosaminas

RSNO: Nitrosotióis

RXNO: Espécies nitrosiladas totais

UFC: Unidades formadoras de colônias

SHNP: Tióis não protéicos

ADMA: Dimetilarginina assimétrica

SHR: Rato espontaneamente hipertenso

SUMÁRIO

	PÁG.
1- INTRODUÇÃO.....	15
Hipertensão e saúde pública.....	16
A dieta DASH e a concentração de nitrito e nitrato nos vegetais.....	17
O ciclo entero-salivar nitrato-nitrito-NO	18
A conversão de nitrato a nitrito, a NO e o efeito anti-hipertensivo do nitrito e nitrato.....	19
A formação de espécies nitrosiladas e o efeito de nitrosilação na pressão arterial.....	22
2- OBJETIVOS	24
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4- RESULTADOS	35
5- DISCUSSÃO	90
6-CONCLUSÃO.....	101
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
8- ANEXOS	113

INTRODUÇÃO

Hipertensão e saúde pública

A hipertensão atinge cerca de 30% da população adulta¹ e é fator de risco para diversos eventos cardiovasculares potencialmente letais como infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral. Tal fato é um problema de saúde pública e o tratamento da hipertensão arterial gera significativos gastos anuais com saúde.

Neste contexto mecanismos efetivos e pouco onerosos para o controle da pressão e também preventivos são desejados. O consumo de vegetais ricos em nitrito e nitrato pode ser uma forma de auxiliar ao controle da pressão arterial como sugerido em diversos estudos^{2,3}. Neste contexto a abordagem farmacológica sobre o nitrito e nitrato se faz necessária a fim de elucidar os mecanismos destas drogas como anti-hipertensivos e talvez viabilizar a idéia de suplementação com nitrito ou nitrato no tratamento da hipertensão.

A hipertensão é doença multifatorial caracterizada pela pressão arterial sistólica acima de 140mmHg e diastólica acima de 90mmHg¹. Dentre os vários fatores que participam do estabelecimento e manutenção da hipertensão podemos citar genética familiar, obesidade e estresse entre outros^{4,5}. Fisiologicamente a pressão arterial é o produto do débito cardíaco (frequência vezes volume cardíaco) e a resistência vascular periférica. Todas as vias que alterem estes dois fatores podem alterar a pressão arterial. Logo o aumento da frequência cardíaca ou vasoconstrição resulta em aumento da pressão arterial e da mesma forma o contrário^{4,5}. Grande parte das drogas utilizadas na terapêutica influenciam algum destes fatores acima descritos.

Na hipertensão o NO exerce papel fundamental como vasodilatador. O NO se difunde para o interior do músculo liso vascular, ativa guanilato ciclase solúvel e esta

produz GMPc, que por sua vez, ativa PKC que faz diversas sinalizações intracelulares que resultam no relaxamento do músculo liso. Isto resulta na diminuição da resistência vascular periférica. Também neste mesmo contexto a alteração da biodisponibilidade de NO altera a resistência vascular.

A dieta DASH e a concentração de nitrito e nitrato nos vegetais.

Diversos trabalhos verificaram que a dieta vegetariana ou muito rica em vegetais está associada à menor prevalência de hipertensão arterial nestes indivíduos^{6,7}. Na década de 90 foram realizados diversos estudos a fim de verificar os motivos deste fato apresentado anteriormente. Inicialmente foi sugerido que a alta concentração de fibras e alguns micronutrientes teriam participação central nesta menor associação e hipertensão em pessoas vegetarianas⁷. No decorrer do início do século XXI diversos autores sugeriram que os efeitos benéficos do consumo de vegetais para o sistema cardiovascular seria devido a alta concentração de nitrito e nitrato nestes vegetais^{8,9}.

Logo, foi verificado que os vegetais, principalmente os folhosos continham significativa concentração de nitrato e de nitrito¹⁰. Também foi demonstrado que este nitrato presente nos vegetais é 100% absorvido no trato gastrointestinal¹¹. Posteriormente este nitrato pode originar tanto nitrito e este NO, conforme descrito no próximo tópico.

Desta forma alimentos contêm níveis significativos de nitrito e nitrato, principalmente vegetais atuam como fontes destas moléculas¹². Assim é sugerido que o nitrito e o nitrato provenientes da ingestão de vegetais tenham uma importante

participação nos efeitos cardiovasculares benéficos relacionados à dieta vegetariana⁹.

O ciclo entero-salivar nitrato-nitrito-NO

O nitrito é o metabólito intermediário do NO, posteriormente o nitrito é oxidado e convertido a nitrato¹³. O NO, associado a estes dois ânions forma um ciclo dentro do organismo. O nitrato sangüíneo é ativamente secretado pelas glândulas salivares para a boca, levando a saliva a ter concentrações 10-20 vezes maior que a concentração plasmática de nitrato¹⁴, recentemente foi observado que os canais de sialina podem ser responsáveis por este transporte¹⁵. Na cavidade oral, o nitrato é convertido a nitrito por bactérias⁸. Este nitrito é deglutido. O nitrito então pode ser absorvido pelo estômago e ser convertido a NO na circulação ou o nitrito pode ser convertido diretamente no estomago a NO¹⁶⁻¹⁹. O NO posteriormente pode ser oxidado diretamente a nitrato ou também ser oxidado a nitrito e este é oxidado a nitrato, reiniciando o ciclo. Este ciclo também é suprido pelo NO produzido pelas óxido nítrico sintases.

A importância do ciclo entero-salivar para o sistema gastrointestinal e circulatório emergiu nos últimos anos. Foi demonstrado que o efeito protetor estomacal do nitrato se deve a conversão de nitrato a nitrito na boca, este nitrito ao formar NO no estômago aumenta fluxo sanguíneo estomacal, exerce efeito bactericida e aumenta a espessura da mucosa gástrica¹⁸. A relevância do ciclo entero-salivar para os efeito vasodilatadores do nitrato foi observada em ratos normotensos tratados com anti-séptico bucal, o que gerou diminuição do efeito hipotensor do nitrato²⁰. Também foi verificado em humanos que o uso de enxaguante

bucal e conseqüente extermínio das bactérias bucais resulta em aumento da pressão arterial em indivíduos normotensos²¹. Apesar dos avanços nesta área, até o momento não foi realizado nenhum estudo semelhante com animais hipertensos e não se sabe a importância do efeito do anti-séptico bucal nos efeitos hipotensores do nitrato de sódio em animais hipertensos. Também é importante ressaltar que nenhum estudo de nosso conhecimento verificou a relevância do ciclo entero-salivar no efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio.

A conversão de nitrato a nitrito, a NO e o efeito anti-hipertensivo do nitrito e nitrato

O NO é responsável pela regulação de importantes sistemas orgânicos, como o sistema circulatório²². Comprometimento da produção desta molécula pode levar a diversas doenças¹⁷. Classicamente, a produção de NO é feita pelas enzimas óxido nítrico sintases, subdivididas em três tipos: endotelial (eNOS), induzível (iNOS) e neuronal (nNOS)²³. Um importante mecanismo de regulação da vasodilatação e, conseqüentemente, controle da pressão arterial é mediado pelo NO produzido principalmente via eNOS²⁴.

A síntese enzimática do NO necessita de L-arginina, FAD, NADPH, BH₄ e oxigênio. A ausência de qualquer um destes cofatores ou substratos diminui a eficiência da enzima em produzir NO²⁴. Todavia, fontes alternativas de formação de NO independentes das óxido nítrico sintases são relatadas, como por exemplo, a redução do anion nitrito a NO^{25,26}.

A formação de NO a partir do ânion nitrito tem sido objeto de dezenas de estudos. Até recentemente o ânion nitrito era considerado apenas um metabólito da degradação do NO²⁷.

Embora estudos iniciais com íon nitrito tenham sido associados somente à formação de metemoglobina e de N-nitrosaminas potencialmente cancerígenas²⁸. Trabalhos mais recentes mostraram que a administração de baixas doses de nitrito intravenoso não produz níveis considerados clinicamente tóxicos de metemoglobina,²⁹ bem como demonstram efeitos benéficos do nitrito de sódio sobre o sistema cardiovascular sob diversos aspectos^{30,31}.

No que diz respeito aos mecanismos vasodilatadores do nitrito e nitrato, vias enzimáticas e não enzimáticas são apontadas como responsáveis pela conversão do nitrito a NO, e este exerce o efeito vasodilatador¹⁴. Estudos recentes sugerem que em condições de hipóxia o ânion nitrito é convertido a NO, provavelmente na tentativa do organismo manter a homeostase durante baixas tensões de oxigênio¹⁶. Atribui-se esta conversão a proteínas que contêm o grupo heme, inclusive a deoxihemoglobina³², sendo o grupo heme desta responsável por essa redução³³. Adicionalmente dezenas de trabalhos na literatura, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, demonstram a importância da enzima xantina óxido redutase (XOR) na redução do nitrito a NO^{13,34}. Outros trabalhos também demonstram que o nitrito atua diretamente em enzimas da família do citocromo P450 mitocondrial, regulando a atividade destas¹⁴. Como conversão não enzimática, em meados da década de 90, trabalhos realizados por grupos de pesquisa independentes, verificaram a formação de NO, a partir do nitrito, *in vivo* por uma via não enzimática^{25,35} através da reação em meio ácido e redutor, condições que são encontradas *in vivo* no estômago²⁵.

Observou-se que a administração oral de nitrito levava a redução deste a NO no estômago. Sugeriu-se que o fato se dava através da reação do nitrito presente no estômago com os prótons H^+ provenientes do suco gástrico. Inclusive foi verificada a relação direta entre o valor do pH gástrico e a formação de NO a partir de nitrito^{25,36}. Trabalhos posteriores demonstraram que o nitrato também aumentava a formação de NO intra-gástrica, possivelmente pelo intermédio de nitrito e pelo mesmo mecanismo proposto para a conversão do nitrito²⁰.

Apesar das conhecidas propriedades vasodilatadoras do nitrito, apenas a partir de 2005 trabalhos sugeriram os efeitos hipotensores sistêmicos do nitrito e nitrato por via oral^{17,37}. Inicialmente foi verificado que a administração concomitante de nitrito diminui a hipertensão induzida por L-NAME. Também foi observado que a nitrosil hemoglobina plasmática após o tratamento é proveniente, em parte, do nitrito administrado oralmente e que o nitrito resultava em diminuição de lesão renal e proteinúria decorrentes da hipertensão^{17,38}. Posteriormente foi verificado que a administração de nitrato de sódio por via oral também tinha efeitos hipotensores³⁷. Todavia apenas recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou em modelo animal o efeito hipotensor do nitrito em uma hipertensão já instaurada³⁹. Apesar dos sugeridos mecanismos de ação do nitrito, nenhum estudo até o momento verificou a influência destes no efeito hipotensor sistêmico em animais hipertensos.

A redução em meio ácido do nitrito a NO é observado principalmente no estômago⁵. Além de o pH gástrico^{25,35} ter sido demonstrado como um fator muito importante na conversão do ânion nitrito a NO, a presença de antioxidantes no estômago, tais como flavonóides⁴⁰, ou ácido ascórbico, aumenta a capacidade de formação do NO a partir do nitrito em meio ácido⁴¹. Desta forma a utilização de um inibidor de bomba de prótons, como o omeprazol⁴², poderia aumentar o pH gástrico

e reduzir a conversão acima descrita. Recentemente foi verificada a ausência de efeito do omeprazol sobre a pressão arterial de ratos⁴³, o que o torna aplicável ao nosso estudo. Trabalhos iniciais demonstraram que o aumento do pH gástrico devido à administração de omeprazol leva à diminuição de formação de NO via nitrito proveniente de vegetais²⁵. Outros trabalhos verificaram que os níveis de nitrito estomacal são aumentados quando ocorre o tratamento com omeprazol⁴⁴. Todavia, até o momento nenhum trabalho relacionou a influência do tratamento com omeprazol sobre os efeitos cardiovasculares do nitrato ou nitrito.

A formação de espécies nitrosiladas e o efeito de nitrosilação na pressão arterial

Observa-se que o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio ocorre até mesmo com uma única administração diária do mesmo⁴⁵. Inicialmente, o nitrito de sódio, ao ser deglutido, forma NO e espécies nitrosiladas no suco gástrico do estômago. Este fato leva à diminuição aguda da pressão arterial em animais hipertensos⁴⁶. Todavia, o tempo de meia vida plasmática do nitrito, embora muito variável é relativamente curto, variando de 5 a 40 min^{14,47-49}. Embora seus efeitos anti-hipertensivos ainda estejam mantidos. Isto sugere que as concentrações circulantes de nitrito não explicam os efeitos hipotensores do nitrito de sódio, uma vez que os efeitos após sua administração são observados mesmo quando as concentrações plasmáticas já voltaram às concentrações basais. Portanto não há um mecanismo claro que explique os efeitos anti-hipertensivos do nitrito.

A reação do nitrito em meio ácido, todavia, resulta em diversas espécies além do NO, como N_2O_3 e NO^+ , que são potentes agentes nitrosantes, capazes de formar

nitrosotíóis e nitrosaminas^{17,50,51}. Estes nitrosotíóis formados podem ser protéicos e não-protéicos, dentre estes principalmente S-nitrosoglutationa (GSNO) e S-nitrosocisteína (CSNO), esta última capaz de cruzar a membrana celular⁵⁰⁻⁵². Tanto a GSNO quanto CSNO são aptos a liberar o NO sob redução, quanto nitrosilar proteínas por transnitrosilação⁵²⁻⁵⁵. Inclusive foi relatado que a exclusão da enzima responsável por reduzir GS-NO (GSNOR) resulta em diminuição do tônus vascular periférico e diminuição a respostas de agonistas β -adrenergicos em camundongos nocaute para esta enzima⁵⁶. Estas observações ressaltam a participação dos nitrosotíóis no controle do tônus vascular.

Outro artigo interessante demonstra que ocorre nitrosilação do receptor AT1, responsável pelos efeitos vasoconstritores da angiotensina II⁵⁷. A nitrosilação deste receptor resulta em diminuição da capacidade de ligação da angiotensina II ao receptor. Tal fato resultaria, teoricamente, em menor vasoconstrição na mesma concentração de angiotensina.

Dessa forma, este trabalho visa compreender os mecanismos hipotensores do nitrato e nitrito de sódio e a influência de cada possível via descrita acima sobre seus efeitos hipotensores.

OBJETIVOS

Hipóteses deste projeto:

- 1) O omeprazol, ao aumentar o pH gástrico, diminua o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio e do nitrato de sódio administrado por via oral em ratos 2R1C.
- 2) O efeito hipotensor do nitrato e nitrito de sódio por via oral em ratos 2R1C dependa da presença de bactérias bucais.

Objetivos:

- 1) Avaliar se o omeprazol afeta o efeito hipotensor do nitrito ou nitrato de sódio em ratos 2R1C.
- 2) Verificar se a redução das bactérias bucais afeta o efeito anti-hipertensivo do nitrato ou nitrito de sódio por via oral em ratos 2R1C.
- 3) Verificar se o omeprazol altera as concentrações plasmáticas de nitrato, nitrito e espécies nitrosiladas nos animais tratados com nitrato e nitrito de sódio.
- 4) Verificar se o uso de enxaguante bucal altera as concentrações plasmáticas de nitrato, nitrito e espécies nitrosiladas.
- 5) Verificar a relevância de espécies nitrosiladas no efeito hipotensor do nitrito e nitrato de sódio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética de utilização animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Nº42/2012). Os animais foram manipulados de acordo com os princípios publicados pelo CONCEA. Foram utilizados ratos Wistar de 200 g a 250 g obtidos do biotério central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em caixas com até 4 animais sob o ciclo de 12 h de luz e a temperatura da sala de 22°C a 25°C com acesso a água e alimentação *adlibitum*.

Abordagens experimentais

A fim de analisar o efeito hipotensor do nitrito e nitrato de sódio, bem como a influência do pH gástrico e da microbiota oral nestes efeitos, foram realizadas quatro abordagens experimentais utilizando animais hipertensos 2R1C. Todavia, a cada protocolo foi administrado um tratamento específico. A fim de melhor organização, os protocolos foram divididos em 4.

Protocolo 1 – Tratamento com nitrito de sódio e omeprazol.

Protocolo 2 – Tratamento com nitrato de sódio e omeprazol.

Protocolo 3 – Tratamento com nitrato de sódio e enxaguante bucal.

Protocolo 4 – Tratamento com nitrito de sódio e enxaguante bucal.

As doses que foram utilizadas nos protocolos estão descritas a seguir: Omeprazol 10 mg/kg⁵⁸ ou veículo, tween 80 2% por via intraperitoneal, nitrito de sódio 15 mg/kg^{17,39,59} ou água por gavagem ou nitrato de sódio 140 mg/kg²⁰ ou água

por gavagem. A dose de cada droga foi semanalmente corrigida para o peso dos animais.

Foi utilizado como enxaguante bucal, clorexidine 0,12% (Periogard® sem álcool, Colgate®) que foi administrado diariamente com “swab” estéril embebido na solução²⁰.

Todas as drogas foram administradas concomitantemente e no mesmo horário durante as semanas de tratamento. A fim de estimar o consumo de água dos animais, a quantidade de água consumida por cada caixa de ratos foi mensurada diariamente.

Fluxograma das abordagens experimentais 1,2,3 e 4.

Avaliação da participação da formação de nitrosotióis sobre o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio.

Com o objetivo de verificar a participação da formação de espécies nitrosiladas, especificamente a de s-nitrosotióis, foi realizada uma abordagem experimental visando à depleção de glutathiona. Para isso, foi administrado inibidor seletivo da enzima glutathiona sintetase. (Butionina sulfoxamina 1.4 mmol/kg e 2.8 mmol/Kg 12h/12h i.p. ou salina)⁶⁰ em animais normotensos durante três dias. Ao término do terceiro dia, os animais tiveram a artéria femural canulada e foram avaliados seis horas após a cirurgia. Os animais então receberam L-NAME (100 mg/Kg, gavagem)¹⁹ e após aumento da pressão arterial média (30 min aproximadamente) os animais receberam nitrito de sódio (15 mg/Kg gavagem) ou água. Os animais tiveram seus parâmetros hemodinâmicos avaliados e foram dos com sobre dose de anestésico seguido de exsanguinação 15 min após o tratamento com nitrito de sódio. Amostras de plasma, sangue, aorta e estômago foram coletadas e armazenadas.

Indução de hipertensão

Utilizamos como modelo 2 rins 1 clipe (2R1C), por este ser um modelo que não necessita da administração de drogas para estabelecer a hipertensão e participação primordial do sistema renina angiotensina⁶¹. Os animais sofreram cirurgia como descrito previamente³⁹ A cirurgia consiste, basicamente, na estenose da artéria renal. Inicialmente, os ratos tiveram sua pressão arterial aferida por pletismografia de cauda. Após, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg i.p.) e foi realizada uma incisão abdominal no animal. Foi fixado um clipe

de prata com 0,2 mm de abertura na artéria renal direita. A incisão então foi fechada e o animal recebeu antibiótico (terramicina 50mg/kg, i.m.) e analgésico (Fluxinameglumina 2,5 mg/kg, s.c). Os animais tiveram a pressão arterial aferida semanalmente durante todo o tempo de estudo. Na segunda semana após a cirurgia, foi verificado quais animais ficaram hipertensos. Foram considerados hipertensos aqueles que apresentaram um aumento na pressão arterial superior a 30 mmHg. Para os animais sham todo o processo foi o mesmo com exceção da inserção do clipe na artéria renal.

Pressão arterial e peso

A medida de pressão arterial sistólica foi realizada por pletismografia de cauda (CODA, KENT scientific). Antes de cada avaliação, a cauda dos animais foi previamente aquecida a 37°C e imediatamente após, a pressão foi mensurada. Foram realizadas três medidas iniciais para adaptação seguida de dez medidas com intervalo de 30s a cada cinco medidas. Os animais tiveram a pressão sistólica e o peso corporal aferidos semanalmente. Ao final da sexta semana de tratamento, todos os animais tiveram a artéria femoral canulada para aferição de pressão invasiva.

Inserção da cânula

Os animais foram canulados conforme padronizado em nosso laboratório¹⁹. Resumidamente, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg, i.p.). Foi feita uma pequena incisão na região inguinal, inserido um cateter (P10

conectado a cateter P50) na artéria femoral e exteriorizado no dorso para avaliação da pressão arterial. Após a cirurgia, o animal recebeu analgésico (Flunixin meglumine 2,5 mg/kg, s.c.).

Avaliações hemodinâmicas dos animais canulados e coleta de amostras

Seis horas após a realização da cirurgia, com o animal aparentemente recuperado da cirurgia, o cateter inserido na artéria femoral foi acoplado a um transdutor de pressão, conectado a um sistema de aquisição de dados (MP150CE; Biopac Systems, CA, USA) e a pressão arterial média foi registrada (Acknowledge 3.2)⁶². Depois de aferição da pressão invasiva os animais foram eutanasiados com sobre dose de anestésico (tribromoetanol 250 mg/kg i.p.) e exsanguinados. As amostras de sangue arterial foram coletadas em tubos contendo heparina e imediatamente centrifugadas a 1000xg por 3 minutos a 4°C. O sangue foi aliquoteado, adicionou-se solução estabilizadora (NEM 10 mM/DTPA 2 mM)⁶³ para quantificação de nitrosotióis e a alíquota foi guardada a -70°C até análise. As aortas foram retiradas dos animais e acondicionadas em microtubo e guardadas a -70°C. A determinação do pH do lavado gástrico foi realizada imediatamente. Foi realizada a amostragem para contagem bacteriana através de swab bucal nos ratos que receberam enxaguante bucal e os respectivos controles. Os “swabs” foram imediatamente utilizados para cultura bacteriana.

Determinação de pH do lavado gástrico

Considerando que o pH do lavado gástrico reflete diretamente o pH estomacal e a fim de verificarmos uma correlação entre a queda da pressão arterial e o pH gástrico, nós utilizamos o método descrito por Campbell *et al.*⁵⁸ com algumas modificações. Todos os ratos ficaram de jejum de 12 horas antes do experimento. Após o sacrifício do animal, uma incisão abdominal foi realizada e o estômago exteriorizado. A porção pilórica estomacal foi ocluída e a cárdia então seccionada para inserção de uma cânula, onde administramos um mililitro de solução salina. Em seguida, fechamos a cárdia e uma pequena incisão foi realizada no estômago para recolher o conteúdo estomacal. As amostras foram então centrifugadas (6000rpm, 1min) e o sobrenadante utilizado para determinação do pH, utilizando um PHmetro de bancada.

Determinação das concentrações plasmáticas e teciduais de nitrito e espécies nitrosiladas.

As alíquotas de plasma foram analisadas em duplicata pelo método de quimioluminescência dependente de ozônio, segundo metodologia já padronizada em nosso laboratório⁶². Resumidamente, para quantificação de nitrito, 50 µl de amostra do plasma foram injetados no aparelho contendo aproximadamente 8 ml de solução ácida iodo/iodeto, resultando em formação de NO. Este então é arrastado 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).

A quantificação de espécies nitrosiladas foi realizada como demonstrado acima, com exceção que foi utilizado 500 µL de plasma que foi tratado com

sulfanilamida ácida a 5% (10% do volume final) durante 5 minutos e posteriormente analisado⁶³. Para quantificação de nitrosaminas 500µL de plasma foi tratado com solução de HgCl₂ 0,2 % em sulfanilamida ácida a 5% (10% do volume final). A determinação de s-nitrosotióis foi realizada subtraindo o total de nitrosaminas do total de espécies nitrosiladas. Para a quantificação de nitrito na aorta, esta foi pesada e macerada com nitrogênio líquido. Ao término, foi adicionado 500 µl tampão fosfato e a suspensão resultante foi injetada em duplicata, conforme protocolo descrito. Os resultados foram corrigidos pelo peso da aorta de cada animal. As amostras com hemólise não foram utilizadas para medida de concentração de nitrito ou nitrosotióis devido a conhecida degradação destes nestes casos⁶⁴.

Determinação das concentrações de nitrato no plasma

A concentração plasmática de nitrato foi mensurada por reação de Griess, conforme metodologia já estabelecida¹⁹. Resumidamente, ocorre à redução de nitrato a nitrito pela enzima nitrato redutase. A quantidade de NOx foi analisada utilizando a reação de Griess. Todas as análises foram feitas em duplicata. Depois de obtidos os valores de NOx, foi subtraído deste as concentrações de nitrito anteriormente mensuradas.

Contagem de unidades formadoras de colônia

Foi realizada coleta de saliva dos animais, por meio de esfregaço com swab estéril. Em seguida, distribui-se o material em placa de petri contendo meio de cultura bacteriano Ágar Nutriente (Himedia), preparado conforme as especificações

do fabricante. Realizou-se a distribuição do material por meio da técnica de estriamento bacteriano. Em seguida, as placas de petri foram encubadas a 37°C por 18h. Após esse período, realizou-se a contagem de colônias isoladas no quadrante com menor número de colônias.

Determinação de tióis não protéico

A quantificação de grupos tióis livres foi realizada conforme descrito na literatura⁶⁵. Resumidamente, o tecido foi macerado em nitrogênio líquido e resuspenso em tampão fosfato 1M pH 7.4. Ao homogenato foi adicionado ácido tricloroacético 10%, a proporção 1:1. Para quantificação de tióis nas hemácias, será adicionada solução de ácido tricloroacético 20% na proporção 1:1 e homogeneizado. Em ambos homogenatos a suspensão foi centrifugada a 4000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para a determinação total de tióis livres através de reação colorimétrica com ácido 5,5 ditio-bis-2- nitrobenzóico (DTNB) 10mM. Como controle, utilizou-se diferentes concentrações de glutathione como padrão.

Análise dos resultados

Os resultados hemodinâmicos foram analisados por análise de variância de duas vias (Two way-ANOVA) e como pós-teste Bonferroni. Os dados bioquímicos foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) ou duas vias (Two way-ANOVA) e foi utilizado o pós-teste de Tukey e Bonferroni, respectivamente. Para verificar correlação, foi utilizado o método de Pearson. Todos os valores são descritos como média $\pm$ erro padrão da média. Consideramos significativo $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados são descritos conforme as abordagens experimentais

Abordagem experimental 1 – Tratamento com nitrito de sódio e omeprazol

1.1 Efeito do tratamento com nitrito de sódio sobre a pressão arterial e peso corporal dos animais.

Realizamos a cirurgia de 2R1C nos animais e aferimos a pressão sistólica semanalmente por seis semanas. Observamos que os animais 2R1C tiveram significativo aumento da pressão arterial ao final da segunda semana (todos os grupos hipertensos *versus* normotensos, **figura 1.1A**). Neste momento, foi iniciado o tratamento dos grupos (indicado na figura por seta). Verificou-se que na primeira semana de tratamento apenas os animais que receberam somente nitrito tiveram significativa queda de pressão arterial sistólica quando comparados ao controle (Hipertenso nitrito= $149,7 \pm 13$ mmHg *versus* hipertenso veículo= $188,5 \pm 10$ mmHg, $P < 0,01$, figura 1.1A). Não foi observada significativa mudança da pressão arterial nos animais que receberam omeprazol e associação omeprazol nitrito (Hipertenso veículo= $188,5 \pm 10$ mmHg *versus* hipertenso omeprazol= $197,6 \pm 10$ mmHg e hipertenso omeprazol+nitrito= $199,3 \pm 8$ mmHg $P > 0,05$, figura 1.1A) do início até o final do tratamento.

A pressão dos animais foi acompanhada semanalmente e durante este período até o final do tratamento apenas o grupo que recebeu somente nitrito teve sua pressão arterial reduzida. Durante todo o tratamento não foi verificada diferença significativa da pressão arterial dos animais normotensos para qualquer um dos tratamentos. (**Figura 1.1A**).

Os animais foram pesados semanalmente a fim de verificar o efeito do tratamento sobre o ganho de peso do animal. A cirurgia foi realizada em animais

com peso entre 180g a 200g. Até a terceira semana não foi verificada nenhuma diferença significativa entre os pesos dos animais normotensos e hipertensos **(Figura 1.1B)**. Todavia, a partir da quarta semana todos os animais 2R1C tiveram menor ganho de peso quando comparados aos animais sham operados. Apenas na quinta semana de tratamento foi verificada diferença significativa entre os pesos dos animais tratados com omeprazol e nitrito comparado ao grupo hipertenso veículo. **(Figura 1.1B)**.

Tabela 1.1 PAS Abordagem experimental 1

Grupos Semanas	0	1	2	3	4	5	6
Normotenso Veículo	114,7±3,7	125,9±3,6	125,4±5,3	131,6±5,5	126,2±5,3	128,2±5,9	129,0±5,9
Normotenso Omeprazol	121,1±2,3	120,2±2,2	128,1±3,9	131,7±2,3	138,4±6,6	136,2±7,7	141,5±2,5
Normotenso Nitrito	118,9±3,2	123,8±4,2	125,6±5,4	130,6±5,5	136,3±4,1	133,8±5,2	132,0±7,1
Normotenso Omeprazol+Nitrito	115,0±4,4	125,2±5,2	123,7±2,7	134,0±2,7	140,2±4,8	122,5±3,7	125,2±5,9
Hipertenso Veículo	118,6±3,5	149,6±3,7	179,9±6,3 *	188,5±10,4 *	195,9±10,7 *	209,3±10,6 *	200,3±11,7 *
Hipertenso Omeprazol	115,6±4,0	157,9±6,3	174,3±7,8 *	197,6±10,5 *	196,0±9,6 *	200,7±9,2 *	195,0±3,6 *
Hipertenso Nitrito	118,3±2,7	158,7±7,9	171,6±11,8 *	149,7±13,3 #	161,3±9,2 #	157,7±8,6 #	160,8±9,5 #
Hipertenso Omeprazol+Nitrito	113,1±3,6	164,5±7,7	177,0±6,2 *	199,3±8,5 *	202,7±9,8 *	206,0±10,5 *	208,7±12,9 *

Figura 1.1 A: Efeito do tratamento com nitríto e ou omeprazol sobre a pressão arterial sistólica durante seis semanas. **B:** Efeito do tratamento com nitríto e ou omeprazol sobre o peso corporal dos animais. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=8-10 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao hipertenso controle.

1.2A Efeito do tratamento com nitrito de sódio sobre a pressão arterial média dos animais

Ao final do protocolo, a fim de obter a pressão arterial média dos animais e assim outro método de registro dos valores hemodinâmicos, todos os animais tiveram a artéria femoral canulada e a pressão aferida após se recuperarem da cirurgia. Os grupos normotensos operados tratados com omeprazol e com nitrito ou ambos não apresentaram diferença significativa entre a pressão média. (Normotenso veículo *versus* Normotenso nitrito, Normotenso omeprazol e Normotenso omeprazol + nitrito, $P > 0,05$ **Figura 1.2A**). O grupo hipertenso veículo apresentou significativo aumento da pressão arterial média (Hipertenso veículo = $164,6 \pm 10$ mmHg *versus* Normotenso veículo = $108,2 \pm 1,8$ mmHg, $P < 0,05$. **Figura 1.2A**). Foi verificado que o tratamento com nitrito de sódio resultou em significativa queda da pressão arterial média (Hipertenso nitrito = $118,4 \pm 13$ mmHg *versus* hipertenso veículo = $164,6 \pm 10$ mmHg, $P < 0,05$. **Figura 1.2A**). Este efeito não foi verificado, todavia nos animais que receberam concomitantemente omeprazol (hipertenso omeprazol + nitrito = $169,0 \pm 21$ mmHg *versus* hipertenso veículo = $164,6 \pm 10$ mmHg, $P > 0,05$). Estes dados corroboram completamente com os resultados obtidos pelo método de pletismografia de cauda durante o tratamento. Ressalta-se que o N experimental variou devido a alguns animais que sofreram cirurgia e não foi obtido sinal no transdutor posteriormente.

1.2B Efeito do tratamento com omeprazol sobre o pH gástrico.

Ao final do protocolo os animais foram sacrificados e foi coletado o suco gástrico dos animais, segundo protocolo descrito acima, objetivando comprovar que o omeprazol exerceu o efeito de aumentar o pH gástrico dos animais. Todos os grupos tratados com omeprazol apresentaram significativo aumento do pH gástrico ao final do tratamento comparados ao normotenso veículo. Não foi verificada qualquer diferença significativa no pH gástrico oriunda do tratamento com nitrito de sódio. Estes resultados confirmam que a droga teve seu efeito esperado (**Figura 1.2B**).

Figura 1.2 A: Efeito do tratamento com nitrito e ou omeprazol sobre a pressão arterial média. **B:** Efeito do tratamento com nitrito e ou omeprazol sobre o pH do lavado gástrico. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N= 6-8 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao hipertenso controle.

1.3A Efeito do tratamento com nitrito de sódio sobre a concentração plasmática de nitrito

A fim de verificar o efeito do tratamento do nitrito de sódio nos níveis circulantes de nitrito, bem como possíveis alterações devido ao tratamento com omeprazol, foram quantificados os níveis de nitrito plasmático nos grupos. Os animais que receberam nitrito tiveram significativo aumento do nitrito plasmático ao final do tratamento. Todavia, não foi verificada diferença significativa da concentração de nitrito nos animais que receberam conjuntamente omeprazol, sugerindo assim que o bloqueio do efeito hipotensor do nitrito de sódio não se reflete na concentração de nitrito circulante. (normotenso veículo $0,582 \pm 0,06 \mu\text{M}$ *versus* normotenso nitrito $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$, normotenso omeprazol + nitrito $2,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$, hipertenso nitrito $1,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$, hipertenso omeprazol + nitrito $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$, $P < 0,05$ **Figura 1.3A**).

1.3B Efeito do tratamento com nitrito de sódio sobre a concentração plasmática de nitrato

Verificou-se que todos os grupos que receberam o tratamento com nitrito de sódio obtiveram aumento significativo da concentração circulante de nitrato, comparado ao normotenso (normotenso veículo $30,2 \pm 3,5 \mu\text{M}$ *versus* normotenso nitrito $170,0 \pm 42 \mu\text{M}$, normotenso omeprazol + nitrito $154,2 \pm 43 \mu\text{M}$, hipertenso nitrito $204,9 \pm 23 \mu\text{M}$, hipertenso omeprazol + nitrito $211,7 \pm 54 \mu\text{M}$, $P < 0,05$ **Figura 1.3B**).

Verificamos também que o aumento da concentração plasmática de nitrato é independente do concomitante tratamento com omeprazol. Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de nitrato entre controle normotenso e hipertenso, bem como entre os animais que receberam apenas omeprazol.

Figura 1.3 A: Efeito do tratamento com nitrito e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de nitrito **B:** Efeito do tratamento com nitrito e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de nitrato. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=6-10 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao hipertenso controle.

1.4A Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou omeprazol sobre a concentração de nitrosotióis no plasma

Os nitrosotióis são espécies de NO ligados a grupos tiois (RSNO). São descritos na literatura como capazes de transportar e liberar NO pela circulação. Assim verificamos se o tratamento altera a concentração plasmática destes compostos (**Figura 1.4A**). Verificamos inicialmente que apesar do hipertenso ter tendência a menores níveis, estes não foram significativamente menores que o controle normotenso. O tratamento apenas com nitrito de sódio resulta em aumento significativo de nitrosotióis tanto em normotensos (normotenso nitrito $21,6 \pm 4$ nM *versus* normotenso veículo $6,6 \pm 1,5$ nM, $P < 0,05$) quanto em hipertensos. (hipertenso nitrito $23,9 \pm 3,4$ nM *versus* hipertenso veículo $8,6 \pm 2,2$ nM, $P < 0,05$)

O tratamento com omeprazol não alterou as concentrações de nitrosotióis. Já o tratamento com omeprazol + nitrito tendeu a impedir o aumento de nitrosotióis devido ao tratamento com nitrito nos animais normotensos (normotenso nitrito + omeprazol $12,9 \pm 1,9$ nM *versus* normotenso nitrito $21,6 \pm 4$ nM, $P = 0,07$). Já nos hipertensos o omeprazol impediu o aumento de nitrosotióis no plasma. (hipertenso nitrito + omeprazol $14,6 \pm 1,6$ nM *versus* hipertenso nitrito $23,9 \pm 3,4$ nM $P < 0,05$). Ressalta-se que os grupos tratados com omeprazol + nitrito apresentaram significativo aumento quando comparados ao respectivo controle. Tais dados sugerem que os nitrosotióis podem estar associados ao efeito hipotensor do nitrito de sódio.

Nestes grupos experimentais não foi possível quantificar a concentração de espécies nitrosiladas resistentes ao mercúrio devido a estas estarem no limite de

detecção do método. Desta forma, foram considerados nitrosotíóis as espécies quantificadas no tratamento com sulfanilamida ácida.

1.4B Efeito do tratamento com nitrito de sódio sobre a concentração de nitrito na aorta.

Com o objetivo de melhor entendimento dos efeitos hemodinâmicos observados, foi realizada a quantificação da concentração de nitrito na aorta (**Figura 1.4B**). Verificamos que a hipertensão levou à queda significativa da concentração tecidual de nitrito comparada ao normotenso (Hipertenso veículo $5,8 \pm 1 \mu\text{M}$ *versus* normotenso veículo $9,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$, $P < 0,05$).

Foi observado também que o tratamento com nitrito de sódio aumenta significativamente a concentração de nitrito no grupo hipertenso (hipertenso nitrito $12,1 \pm 2 \mu\text{M}$ *versus* hipertenso veículo $5,8 \pm 1 \mu\text{M}$, $p < 0,05$). Apesar de ocorrer aumento da concentração de nitrito nos animais que receberam nitrito e omeprazol, este não foi significativo.

Foi observado aumento da concentração de nitrito nos animais normotensos. Todavia, o aumento não foi significativo (Normotenso nitrito $14,3 \pm 2 \mu\text{M}$ *versus* normotenso veículo $9,1 \pm 0,7 \mu\text{M}$, $P > 0,05$).

A **B**

Figura 1.4 A: Efeito do tratamento com nitrito e ou omeprazol sobre a concentração de nitrosotíóis no plasma **B:** Efeito do tratamento com nitrito e ou omeprazol sobre a concentração de nitrito na aorta dos animais. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=6 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado a hipertenso controle.

2 Abordagem experimental 2 – Tratamento com nitrato de sódio e omeprazol

2.1 Efeito do tratamento com nitrato de sódio e com omeprazol sobre a pressão arterial sistólica e peso corporal dos animais.

Verificamos que os animais que sofreram a cirurgia de 2R1C ficaram significativamente hipertensos ao término da segunda semana ($P < 0,05$ para todos hipertensos *versus* normotenso veículo). (**Figura 2.1 A**)

Podemos verificar que o tratamento com nitrato de sódio levou à queda significativa da pressão arterial a partir da segunda semana de tratamento, com o efeito perdurando até o final do protocolo (hipertenso veículo, 180 ± 7 mmHg *versus* hipertenso nitrato, 157 ± 7 mmHg, $P < 0,05$).

Também observamos que o tratamento concomitante com omeprazol bloqueou o efeito hipotensor do nitrato de sódio (hipertenso veículo, 186 ± 8 mmHg *versus* hipertenso omeprazol+nitrato, 196 ± 5 mmHg, $P > 0,05$).

Não foi verificada qualquer diferença significativa entre os grupos sham ao decorrer do tratamento. Também não foi verificada nenhuma diferença significativa nos pesos corporais entre os grupos normotensos ou hipertensos (**Figura 2.1 B**).

Não foi observada qualquer diferença significativa no consumo de água entre os grupos (normotenso veículo $65,7 \pm 6$ ml/rato/dia, normotenso nitrato $69,9 \pm 3$ ml/rato/dia, hipertenso veículo $67,5 \pm 2$ ml/rato/dia, hipertenso nitrato $65,3 \pm 3$ ml/rato/dia, $P > 0,05$)

Tabela 2.1 PAS Abordagem experimental 2

Grupos Semanas	0	1	2	3	4	5	6
Normotenso Veículo	116,55±3,3	118,89±5,7	129,4±2,7	126,82±3,4	129,27±2,3	128,98±2,8	125,31±4,6
Normotenso Omeprazol	115,78±3,0	109,53±5,8	126,15±2,8	126,24±2,7	136,29±3,2	131,11±4,5	130,19±5,6
Normotenso Nitrato	111,74±2,6	123,45±4,7	120,88±4,6	119,21±4,6	126,34±3,4	127,68±3,8	126,92±5,4
Normotenso Omeprazol+Nitrato	115±2,3	118,83±7,8	125,91±5,6	133,71±3,4	128,02±1,0	122,50±2,1	135,46±3,5
Hipertenso Veículo	115,41±2,9	143,01±5,2	174,8±10,3 *	179,10±5,8 *	180,61±7,7 *	187,1±6,5 *	186,48±8,3 *
Hipertenso Omeprazol	108,81±3,4	152,94±4,0	163,52±6,3 *	180,5±13,5 *	179,59±9,6 *	178,81±10, *	184,23±9,2 *
Hipertenso Nitrato	113,25±2,4	152,14±6,1	167,73±9,7 *	162,32±5,5 *	157,14±7,2 #	155,30±5,8 #	157,08±8,6 #
Hipertenso Omeprazol+Nitrato	110,4±2,2	152,94±4,0	170,03±7,1 *	190,88±6,7 *	188,04±6,3 *	190,46±8,4 *	196,7±5,7 *

A **B**

Figura 2.1 A: Efeito do tratamento com nitrato e ou omeprazol sobre a pressão arterial sistólica durante seis semanas. **B:** Efeito do tratamento sobre peso corporal. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=8 -10 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao hipertenso controle.

2.2A Efeito do tratamento com nitrato de sódio e com omeprazol sobre a pressão arterial média.

A fim de obter a pressão arterial média dos animais e assim outro método de registro dos valores hemodinâmicos dos animais, todos os animais tiveram a artéria femoral canulada e a pressão aferida após se recuperarem da cirurgia (**Figura 2.2A**).

Os animais hipertensos veículo apresentaram significativo aumento da pressão arterial média (Hipertenso veículo $200,7 \pm 19$ mmHg *versus* normotenso veículo 116 ± 5 mmHg, $P < 0,05$). Foi verificado que o tratamento com nitrato de sódio levou a significativa queda da pressão arterial média. (Hipertenso nitrato $140,1 \pm 10$ mmHg *versus* hipertenso veículo $200,7 \pm 19$ mmHg, $P < 0,05$).

Não foi observado efeito hipotensor do nitrato de sódio sobre os animais que receberam concomitantemente omeprazol (Hipertenso omeprazol + nitrato $196,4 \pm 9$ mmHg *versus* hipertenso veículo $200,7 \pm 19$ mmHg, $P > 0,05$). Os grupos sham operados tratados com omeprazol e com nitrito ou ambos não apresentaram diferença significativa entre a pressão média. Ressalta-se que o N experimental variou devido a alguns animais que sofreram cirurgia e não foi obtido sinal no transdutor posteriormente. Estes dados corroboram os resultados obtidos pelo método de pletismografia de cauda durante o tratamento.

2.2B Efeito do tratamento com omeprazol sobre o pH gástrico dos animais.

Ao final do protocolo, os animais foram sacrificados e foi coletado o suco gástrico dos animais conforme metodologia descrita, visando comprovar o aumento do pH gástrico devido ao tratamento com omeprazol (**Figura 2.2B**).

Constatou-se que todos os grupos tratados com omeprazol apresentaram significativo aumento do pH gástrico ao final do tratamento quando comparados ao normotenso veículo ($P < 0,05$). Estes resultados confirmam que a droga teve seu efeito esperado.

Adiciona-se que o N experimental variou devido a alguns animais, mesmo em jejum, estarem com muito conteúdo gástrico, o que impediu a correta medida de pH.

Figura 2.2 A: Efeito do tratamento com nitrito e ou omeprazol sobre a pressão arterial média. **B:** Efeito do tratamento sobre o pH do lavado gástrico. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=7-10 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado a hipertenso controle.

2.3A Efeito do tratamento com nitrato de sódio e com omeprazol sobre a concentração plasmática de nitrito.

As concentrações de nitrito plasmático não foram significativamente diferentes devido à hipertensão, apesar de ocorrer uma tendência da diminuição da concentração de nitrito neste grupo (**Figura 2.3A**).

O tratamento com nitrato de sódio elevou significativamente a concentração plasmática de nitrito tanto no grupo normotenso quanto no grupo hipertenso (Normotenso nitrato $4.2 \pm 1 \mu\text{M}$ *versus* normotenso veículo $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$, hipertenso nitrato $6,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$ *versus* hipertenso veículo $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$). Verificou-se que o tratamento conjunto com omeprazol não alterou significativamente os níveis plasmáticos de nitrito nos grupos controles ou nos grupos que receberam nitrato. Ressalta-se que a variação do N experimental ocorreu devido à hemólise durante a coleta do sangue, o que impossibilita a mensuração confiável do nitrito.

2.3B Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de nitrato

Verificou-se que todos os grupos que receberam o tratamento com nitrato de sódio obtiveram aumento significativo da concentração circulante de nitrato, comparado ao normotenso (**Figura 2.3B**) (normotenso veículo $32,9 \pm 8,7 \mu\text{M}$ *versus* normotenso nitrato $109,3 \pm 21 \mu\text{M}$, normotenso omeprazol + nitrato $107,8 \pm 31 \mu\text{M}$, hipertenso nitrato $119,5 \pm 28 \mu\text{M}$, hipertenso omeprazol + nitrato $121,7 \pm 27 \mu\text{M}$, $P < 0,05$).

Verificamos também que o aumento das concentrações de nitrato é independente do concomitante tratamento com omeprazol. Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de nitrato entre o controle normotenso e hipertenso, bem como entre os animais que receberam apenas omeprazol.

Figura 2.3 A: Efeito do tratamento com nitrato e ou omeprazol sobre as concentrações plasmáticas de nitrito. **B:** Efeito do tratamento sobre as concentrações plasmáticas de nitrato. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=6 -8 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado a normotenso veículo.

2.4A Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de espécies nitrosiladas.

Observamos que o tratamento com nitrato de sódio resultou em aumento significativo das espécies nitrosiladas nos animais normotensos (normotenso nitrito $17,3 \pm 2,3$ nM *versus* normotenso veículo $9,3 \pm 1,2$ nM, $P < 0,05$, **Figura 2.4A**) Nos animais hipertensos ocorreu tendência do aumento das espécies nitrosiladas (hipertenso nitrito $22,3 \pm 6,1$ nM *versus* hipertenso veículo $9,6 \pm 1,4$ nM, $P = 0,08$). Aparentemente, o grupo hipertenso não gerou qualquer alteração na concentração das espécies nitrosiladas. Considerando este fato, se analisarmos em conjunto os dados dos animais normotensos e hipertensos, verificamos que o tratamento com nitrato resulta em significativo aumento de espécies nitrosiladas e ocorre uma interação com o grupo omeprazol, com este impedindo o aumento daquelas. Estes dados sugerem que as significâncias estatísticas que não foram encontradas na análise separada entre hipertenso e normotenso ficariam evidentes com o aumento do N experimental.

Assim, esta análise reforça a tese de que o efeito anti-hipertensivo do nitrato se deve a formação de espécies nitrosiladas no estômago. (**Figura 2.4A**)

2.4B Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de nitrosaminas.

O tratamento com nitrato de sódio e ou omeprazol não alterou a concentração de espécies nitrosiladas resistentes a mercúrio, formadas principalmente por nitrosaminas. (**Figura 2.4B**)

2.4C Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de nitrosotióis.

O tratamento com nitrato de sódio resultou em tendência de aumento dos nitrosotióis(calculados a partir da subtração das espécies nitrosiladas das espécies nitrosiladas resistentes a mercúrio) no grupo normotenso(normotenso nitrito $13,3 \pm 3,3$ nM *versus* normotenso veículo $6,3 \pm 2,1$ nM, $P=0,09$ **Figura 2.4C**). Também foi verificado que o omeprazol reduziu significativamente a concentração de nitrosotióis no grupo normotenso. Ao considerarmos que a hipertensão aparentemente não alterou os nitrosotióis e analisarmos em conjunto os dados dos animais normotensos e hipertensos, verificamos que o nitrato de sódio resultou em significativo aumento dos nitrosotióis e o omeprazol foi significativo em reduzir estes mesmos compostos. Todavia, não foi encontrada interação significativa entre omeprazol e nitrato. Novamente estes dados sugerem que o aumento do N experimental para cada grupo tornaria evidente as diferenças encontradas por esta abordagem.

Estes resultados sugerem que a o tratamento com nitrato de sódio resulta em aumento de nitrosotióis e este fato está associado a redução da pressão arterial.

Figura 2.4: Efeito do tratamento com nitrato e ou omeprazol sobre a concentração plasmática de espécies nitrosiladas (**A**), nitrosaminas (**B**), nitrosotios (**C**). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N= 5-6 por grupo). *diferença significativa comparado ao normotenso água. ** diferença significativa comparado ao hipertenso nitrito, $P<0,05$.

Abordagem experimental 3 – Tratamento com nitrito de sódio e enxaguante bucal

3.1 Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial sistólica e peso corporal dos animais.

Observamos significativo aumento da pressão arterial sistólica após duas semanas da cirurgia de inserção de clipe (todos os grupos hipertensos *versus* normotenso veículo, $P < 0,05$) (**Figura 3.1 A**). A tabela 3.1 mostra detalhadamente a pressão arterial de cada grupo em cada semana do tratamento.

Verificamos que o tratamento com nitrito de sódio resultou na queda significativa da pressão arterial já na primeira semana de tratamento (hipertenso veículo 177 ± 11 mmHg *versus* hipertenso nitrito 147 ± 11 mmHg $P < 0,05$). Observamos que o tratamento concomitante de nitrito de sódio com enxaguante bucal não afetou o efeito hipotensor do nitrito de sódio em nenhum momento do tratamento (hipertenso veículo 177 ± 11 mmHg *versus* hipertenso enxaguante bucal + nitrito 139 ± 8 mmHg, $P < 0,05$).

Não foi verificada qualquer diferença significativa entre os grupos sham ao decorrer do tratamento. Também não foi verificada nenhuma diferença significativa nos pesos corporais entre os grupos normotensos ou hipertensos ao decorrer do tratamento (**Figura 3.1B**). Não foi observada qualquer diferença significativa no consumo de água entre os grupos (normotenso veículo $72,1 \pm 6$ ml/rato/dia, normotenso nitrito $68,1 \pm 4$ ml/rato/dia, hipertenso veículo $72,4 \pm 6$ ml/rato/dia, hipertenso nitrito $71,9 \pm 4$ ml/rato/dia, $P > 0,05$)

Tabela 3.1 PAS, Abordagem experimental 3

Grupos Semanas	0	1	2	3	4	5	6
Normotenso Veículo	121,2±2,4	127,7±4,8	125,7±4,5	125,6±6,8	119,9±7,0	123,4±9,3	119,1±5,6
NormotensoEnx.B ucal	119,3±2,2	126,3±5,3	124,3±3,8	131,7±3,4	129,7±3,5	128,2±8,5	128,7±6,3
Normotenso Nitrito	116,8±3,4	126,8±3,3	128,2±6,4	127,4±5,7	132,7±5,6	130,0±4,7	134,3±3,7
NormotensoEnx.B ucal+Nitrito	117,5±3,7	120,5±4,7	121,6±5,5	122,7±5,9	128,2±6,4	112,4±8,3	125,6±9,1
Hipertenso Veículo	117,5±2,2	154,4±6,3	173,0±10,4 *	177,0±11,8 *	183,2±10,2 *	180,9±8,2 *	186,6±9,7 *
Hipertenso Enx.Bucal	116,9±2,5	145,3±8,0	172,1±9,6 *	175,3±9,4 *	181,1±7,8 *	177,9±7,7 *	182,6±7,5 *
Hipertenso Nitrito	114,3±2,3	149,0±9,7	172,8±7,1 *	147,8±11,2 #	147,0±5,0 #	145,9±6,1 #	147,4±15,9 #
Hipertenso Enx.Bucal+Nitrito	115,4±2,6	143,0±9,2	172,4±8,5 *	139,2±8,1 #	142,2±11,5 #	147,6±8,8 #	149,0±11,4 #

Figura 3.1 A: Efeito do tratamento com nitrito e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial sistólica durante seis semanas. **B:** Efeito do tratamento sobre o peso dos animais. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=8 -10 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao hipertenso controle.

3.2A Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial média.

Ao término do protocolo, todos os animais foram canulados e tiveram a pressão arterial média registrada (**Figura 3.2A**). Foi observado correspondente aumento de pressão nos animais hipertensos e verificamos que o tratamento com nitrito de sódio resultou em significativa queda da pressão arterial média dos ratos hipertensos (Hipertenso nitrito 122 ± 10 mmHg *versus* hipertenso veículo 144 ± 3 mmHg, $P < 0,05$). Também foi observado que o tratamento conjunto com enxaguante bucal não afetou o efeito hipotensor do nitrito de sódio. (Hipertenso veículo 144 ± 3 mmHg *versus* hipertenso nitrito + enxaguante bucal 124 ± 9 mmHg, $P < 0,05$).

Os grupos sham operados tratados com enxaguante bucal e com nitrito ou ambos não apresentaram diferença significativa na pressão média. O tratamento com enxaguante bucal não gerou qualquer diferença significativa nos valores de pressão arterial média tanto no grupo hipertenso como no normotenso.

Adiciona-se que o N experimental variou devido a alguns animais que sofreram cirurgia e não foi obtido sinal no transdutor. Ressalta-se que estes dados corroboram os resultados obtidos pelo método de pletismografia de cauda durante o tratamento.

3.2B Efeito do tratamento com enxaguante bucal sobre a contagem bacteriana oral dos animais

O tratamento com enxaguante bucal resultou em significativa diminuição de unidades formadoras de colônia (UFC) na cavidade oral dos animais que receberam enxaguante bucal, independente da administração de nitrito (**Figura 3.2B**). ($P < 0,05$)

Figura 3.2 A: Efeito do tratamento com nitrito e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial média. **B:** Efeito do tratamento sobre o número de bactérias orais, quantificadas com unidades formadoras de colônia (UFC). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=7 -10 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativo comparado normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado a hipertenso controle.

3.3A Efeito do tratamento com nitrito de sódio e com enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrito

O tratamento com nitrito de sódio elevou significativamente a concentração plasmática de nitrito tanto no grupo normotenso quanto no grupo hipertenso (Normotenso nitrito $1,6 \pm 0,3 \mu\text{M}$ *versus* normotenso veículo $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$, hipertenso nitrito $1,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ *versus* hipertenso veículo $0,7 \pm 0,07 \mu\text{M}$, $P < 0,05$ **Figura 3.3A**).

Verificou-se que o tratamento conjunto com enxaguante bucal reduziu significativamente os níveis de nitrito no plasma (Normotenso veículo $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ *versus* normotenso enxaguante bucal $0,5 \pm 0,05 \mu\text{M}$, hipertenso veículo $0,7 \pm 0,07 \mu\text{M}$ *versus* hipertenso enxaguante bucal $0,6 \pm 0,08 \mu\text{M}$, $P < 0,05$). Também foi observado que o tratamento concomitante com nitrito de sódio e enxaguante bucal resultou em significativo aumento das concentrações de nitrito circulantes. Todavia o aumento foi menor nestes grupos (hipertenso nitrito $1,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ *versus* hipertenso enxaguante bucal + Nitrito $1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $P = 0,06$).

Ressalta-se que a variação do N experimental ocorreu devido à hemólise durante a coleta do sangue, o que impossibilita a mensuração confiável do nitrito nestas amostras.

3.3B Efeito do tratamento com nitrito de sódio e com enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrato

Todos os grupos que receberam o tratamento com nitrito de sódio obtiveram aumento significativo dos níveis circulantes de nitrato, comparados ao normotenso (normotenso veículo $52,5 \pm 5,2 \mu\text{M}$ *versus* normotenso nitrito $88,0 \pm 18,3 \mu\text{M}$,

normotenso enxaguante bucal + nitrito $75,5 \pm 4,2 \mu\text{M}$, hipertenso nitrito $98,8 \pm 5,7 \mu\text{M}$, hipertenso enxaguante bucal + nitrito $51,2 \pm 10,2 \mu\text{M}$, $P < 0,05$, **Figura 3.3B1**). Apesar de um menor aumento ter sido observado nos animais que receberam concomitantemente enxaguante bucal, esta diferença apenas foi significativa para os animais hipertensos. O tratamento com enxaguante bucal reduziu significativamente as concentrações plasmáticas de nitrato (normotenso veículo $52,5 \pm 5,2 \mu\text{M}$ *versus* normotenso enxaguante bucal $32,2 \pm 6,1 \mu\text{M}$, hipertenso veículo $56,7 \pm 7,1 \mu\text{M}$, hipertenso enxaguante bucal $35,4 \pm 4,9 \mu\text{M}$, $P < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de nitrato entre o controle normotenso e hipertenso.

Figura 3.3 A: Efeito do tratamento com nitrato e ou enxaguante bucal sobre a concentração de nitrito no plasma **B:** Efeito do tratamento com nitrato e ou enxaguante bucal sobre a concentração de nitrato no plasma. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=6-9 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado a hipertenso controle. ** $P < 0,05$ diferença significativa comparado a hipertenso nitrito.

3.4A Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de espécies nitrosiladas.

Observamos que o tratamento com nitrito de sódio resultou em aumento significativo das espécies nitrosiladas tanto nos animais normotensos quanto em hipertensos (normotenso veículo $10,4 \pm 1,2$ nM, normotenso nitrito $17,3 \pm 3,3$ nM, normotenso enxaguante bucal+nitrito $13,6 \pm 1,6$ nM e hipertenso veículo $10,3 \pm 0,8$ nM *versus* hipertenso nitrito $17,2 \pm 2,0$ nM hipertenso nitrito+enxaguante bucal $16,7 \pm 2,9$ nM $P < 0,05$, **Figura 3.4 A**). As concentrações de espécies nitrosiladas não foram alteradas em nenhum tratamento pelo uso de enxaguante bucal.

3.4B Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrosaminas.

O tratamento com nitrito de sódio resultou em significativo aumento de nitrosaminas nos animais hipertensos (hipertenso veículo $7,0 \pm 0,9$ nM *versus* hipertenso nitrito $10,1 \pm 1,4$ nM hipertenso nitrito+enxaguante bucal $9,0 \pm 1,9$ nM $P < 0,05$). O tratamento com enxaguante bucal não alterou a concentração de nitrosaminas em qualquer grupo. (**Figura 3.4B**)

2.4C Efeito do tratamento com nitrito de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrosotióis.

O tratamento com nitrito de sódio resultou em significativo aumento das concentração plasmáticas de nitrosotióis no grupo hipertenso (hipertenso veículo $4,0 \pm 1,8$ nM *versus* hipertenso nitrito $7,5 \pm 1,1$ nM hipertenso nitrito+enxaguante bucal

10,2±2,9 nM $P<0,05$). Ao avaliarmos os resultados de nitrosotíóis em conjunto, desconsiderando a hipertensão ou não, verificamos que todos os animais tratados com nitrito têm significativo aumento da concentração de nitrosotíóis no plasma.

O tratamento com enxaguante bucal não alterou a concentração plasmática destes em nenhum grupo experimental. Atenta-se que devido à forma de obter os valores de nitrosotíóis, através de subtração das espécies nitrosiladas pelas nitrosaminas, e estas medidas estarem no limite de detecção do aparelho, foram obtidos alguns valores negativos de nitrosotíóis que foram desconsiderados.

Figura 3.4: Efeito do tratamento com nitrito e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de espécies nitrosiladas (A), nitrosaminas (B), nitrosotióis (C). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N= 6-8 por grupo). *diferença significativa comparado ao normotenso água. # diferença significativa comparado ao hipertenso água, $P < 0,05$.

Abordagem experimental 4 – Tratamento com nitrato de sódio e enxaguante bucal

4.1 Efeito do tratamento com nitrato de sódio e com enxaguante bucal sobre a pressão arterial sistólica e peso corporal dos animais.

Observamos significativo aumento da pressão arterial sistólica após duas semanas da cirurgia de inserção de clipe (todos os grupos hipertensos *versus* normotenso veículo, $P < 0,05$ **Figura 4.1 A**).

Verificamos que o tratamento com nitrato de sódio resultou em queda significativa da pressão arterial sistólica após a segunda semana de tratamento (hipertenso veículo 184 ± 8 mmHg *versus* hipertenso nitrato 150 ± 3 mmHg $P < 0,05$). Também observamos que o tratamento concomitante com enxaguante bucal impediu o efeito hipotensor do nitrato de sódio (hipertenso veículo 184 ± 8 mmHg *versus* hipertenso enxaguante bucal + nitrato 200 ± 6 mmHg, $P > 0,05$). Todos os dados de pressão desta abordagem se encontram na tabela 4.1.

Não foi verificada qualquer diferença significativa entre os grupos sham ao decorrer do tratamento. Também não foi verificada nenhuma diferença significativa nos pesos corporais entre os grupos normotensos ou hipertensos ao decorrer do tratamento (**Figura 4.1B**). Não foi observada qualquer diferença significativa no consumo de água entre os grupos (normotenso veículo $77,1 \pm 6$ ml/rato/dia, normotenso nitrato $74,1 \pm 3$ ml/rato/dia, hipertenso veículo $75,5 \pm 5$ ml/rato/dia, hipertenso nitrato $77,3 \pm 2$ ml/rato/dia, $P > 0,05$)

Tabela 4.1: PAS abordagem experimental 4

Grupos Semanas	0	1	2	3	4	5	6
Normotenso Veículo	114,4±4,2	116,1±6,0	129,9±3,1	125,1±3,5	129,1±2,7	129,5±3,3	123,3±4,8
Normotenso Enxaguante Bucal	106,7±3,1	125,1±3,7	129,5±2,7	126,3±3,6	126,9±3,6	127,9±2,2	132,7±7,9
Normotenso Nitrato	112,9±3,7	128,6±4,4	122,1±5,1	119,3±5,6	125,0±3,7	126,2±4,2	125,7±6,4
Normotenso Enx.Bucal+Nitrato	107,5±2,1	125,1±2,9	125,5±4,2	133,5±4,5	130,8±6,3	127,9±7,5	125,5±3,3
Hipertenso Veículo	117,1±3,0	145,6±6,9	179,9±10,4 *	180,9±6,5 *	184,2±8,0 *	190,7±6,5 *	195,3±8,3 *
Hipertenso Enxaguante Bucal	111,2±3,1	142,4±6,5	171,8±7,3 *	184,3±7,7 *	182,7±6,8 *	193,2±8,6 *	202,9±4,8 *
Hipertenso Nitrato	111,12±1,8	151,79±7,2	171,71±10, *	160,58±6,1 *	150,51±3,6 #	155,75±6,8 #	160,74±8,9 #
Hipertenso EnxBucal+Nitrato	107,5±2,8	142,16±6,7	173,18±6,6 *	183,93±7,9 *	200,56±6,3 *	193,14±8,8 *	198,08±9,6 *

Figura 4.1 A: Efeito do tratamento com nitrato e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial sistólica durante seis semanas. **B:** Efeito do tratamento sobre o peso corporal durante seis semanas. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=8 -10 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado ao hipertenso controle.

4.2A Efeito do tratamento com nitrato de sódio e com enxaguante bucal sobre a pressão arterial média.

Ao término do protocolo, todos os animais foram canulados e tiveram a pressão arterial média registrada (**Figura 4.2A**). Foi observado correspondente aumento de pressão nos animais hipertensos e verificamos que o tratamento com nitrato de sódio resultou em significativa queda da pressão arterial média dos ratos hipertensos (Hipertenso nitrato 147 ± 9 mmHg *versus* hipertenso veículo 185 ± 17 mmHg, $P < 0,05$). Também foi observado que o tratamento conjunto com enxaguante bucal bloqueou o efeito hipotensor do nitrato. (Hipertenso nitrato 147 ± 9 mmHg *versus* hipertenso nitrato + enxaguante bucal 196 ± 9 mmHg, $P < 0,05$).

Os grupos sham operados tratados com enxaguante bucal e com nitrato ou ambos não apresentaram diferença significativa na pressão média. O tratamento com enxaguante bucal não gerou qualquer diferença significativa nos valores de pressão arterial média tanto no grupo hipertenso como no normotenso.

Adiciona-se que o N experimental variou devido a alguns animais que sofreram cirurgia e não foi obtido sinal no transdutor. Ressalta-se que estes dados corroboram os resultados obtidos pelo método de pletismografia de cauda durante o tratamento.

4.2B Efeito do tratamento com enxaguante bucal sobre a contagem bacteriana oral dos animais

O tratamento com enxaguante bucal resultou em significativa diminuição de unidades formadoras de colônia (UFC) na cavidade oral dos animais que receberam enxaguante bucal, independente da administração de nitrato (**Figura 4.2B**). ($P < 0,05$)

Figura 4.2 A: Efeito do tratamento com nitrito e ou enxaguante bucal sobre a pressão arterial média. **B:** Efeito do tratamento sobre o número de bactérias bucais, quantificadas como unidades formadoras de colônia (UFC). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=7 -10 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado normotenso controle. # $P < 0,05$ diferença significativa comparado a hipertenso controle.

4.4A Efeito do tratamento com nitrato de sódio e com enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrito

O tratamento com nitrato de sódio elevou significativamente a concentração plasmática de nitrito tanto no grupo normotenso quanto no grupo hipertenso (Normotenso nitrato $5,3 \pm 1 \mu\text{M}$ *versus* normotenso veículo $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$, hipertenso nitrato $7,6 \pm 2 \mu\text{M}$ *versus* hipertenso veículo $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$, $P < 0,05$) (**Figura 4.3**).

Verificou-se que o tratamento conjunto com enxaguante bucal reduziu significativamente a concentração de nitrito no plasma (Normotenso veículo $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ *versus* normotenso enxaguante bucal $0,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ $P < 0,05$). Também foi observado que o tratamento com enxaguante bucal impediu o aumento da concentração de nitrito devido ao tratamento com nitrato (normotenso nitrato $5,3 \pm 1 \mu\text{M}$ *versus* normotenso enxaguante bucal+nitrato $2,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ e hipertenso nitrato $7,6 \pm 2 \mu\text{M}$ *versus* hipertenso enxaguante bucal+Nitrato $4,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$, $P < 0,05$).

Ressalta-se que a variação do N experimental ocorreu devido à hemólise durante a coleta do sangue, o que impossibilita a mensuração confiável do nitrito.

4.3B Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrato

Verificou-se que todos os grupos que receberam o tratamento com nitrato de sódio obtiveram aumento significativo dos níveis circulantes de nitrato, comparados ao normotenso (normotenso veículo $32,5 \pm 9,6 \mu\text{M}$ *versus* normotenso nitrato $94,8 \pm 40,6 \mu\text{M}$, normotenso enxaguante bucal+nitrato $82,8 \pm 11,1 \mu\text{M}$, hipertenso nitrato $127,2 \pm 23 \mu\text{M}$, hipertenso enxaguante bucal +nitrato $102,1 \pm 19 \mu\text{M}$, $P < 0,05$,

Figura4.3B). Apesar de um menor aumento ter sido observado nos animais que receberam concomitantemente enxaguante bucal, esta diferença não foi significativa. Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de nitrato entre o controle normotenso e hipertenso, bem como entre os animais que receberam apenas enxaguante bucal.

Figura 4.3 A: Efeito do tratamento com nitrato e ou enxaguante bucal sobre a concentração de nitrito no plasma **B:** Efeito do tratamento com nitrato e ou enxaguante bucal sobre a concentração de nitrato no plasma. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=5-9 por grupo). * $P < 0,05$ diferença significativa comparado normotenso controle. ** $P < 0,05$ diferença significativa comparado a hipertenso nitrato.

4.4A Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de espécies nitrosiladas.

O tratamento com nitrato de sódio resultou em aumento significativo das espécies nitrosiladas nos animais hipertensos (hipertenso nitrato $21,2 \pm 6,8$ nM e hipertenso enxaguante bucal nitrato $13,7 \pm 1,8$ nM *versus* hipertenso veículo $8,6 \pm 1,8$ nM, $P < 0,05$). Ocorreu uma tendência de aumento das espécies nitrosiladas no grupo normotenso. O tratamento com enxaguante bucal resultou em diminuição das espécies nitrosiladas nos animais normotensos. **(Figura 4.4A)**. Quando estes resultados são analisados em conjunto, desconsiderando a hipertensão, verificamos que o nitrato resulta em significativo aumento das espécies nitrosiladas, com significativa interação com o enxaguante bucal. O enxaguante bucal em tal análise também é significativo em reduzir as espécies nitrosiladas.

4.4B Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrosaminas.

O tratamento com nitrato de sódio não alterou a concentração de nitrosaminas nos grupos experimentais. Também não houve qualquer influência do tratamento com enxaguante bucal. **(Figura 4.4B)**

4.4C Efeito do tratamento com nitrato de sódio e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de nitrosotióis.

Não foi observado aumento de nitrosotióis devido ao tratamento com nitrato de sódio tanto no grupo hipertenso quanto no grupo normotenso. Também não foi

verificada qualquer diferença significativa proveniente do tratamento com enxaguante bucal nestes grupos em separado. Quando analisados em conjunto, desconsiderando o fator hipertensão ou não, é observado que o enxaguante bucal resulta em significativa diminuição dos nitrosotíóis e que o tratamento com nitrato de sódio tende a elevar a concentração de nitrosotíóis no plasma ($P=0,1$)(**Figura 4.4C**).

Figura 4.4: Efeito do tratamento com nitrato e ou enxaguante bucal sobre a concentração plasmática de espécies nitrosiladas (**A**), nitrosaminas (**B**), nitrosotióis (**C**). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N= 3-6 por grupo). *diferença significativa comparado ao normotenso água. $P < 0,05$.

Abordagem experimental 5. Influência da depleção de tióis sobre o efeito hipotensor do nitrito de sódio.

5.1A Efeito do tratamento com nitrito de sódio sobre ratos pré-tratados com BSO.

O tratamento com nitrito de sódio reduziu a pressão arterial nos animais hipertensivos pré-tratados com L-NAME. O pré-tratamento com BSO resultou em diminuição do efeito anti-hipertensivo agudo do nitrito de sódio (Controle Nitrito - $37 \pm 2,4$ mmHg *versus* BSO1.4 $-27 \pm 1,1$ mmHg BSO2.8 $-21 \pm 3,1$ mmHg, $P < 0,05$). Salienta-se que todos os animais (BSO ou salina) tiveram a pressão basal avaliada e não foi verificada qualquer diferença significativa entre os grupos antes da administração do nitrito (Controle Nitrito $151 \pm 2,8$ mmHg *versus* BSO1.4 $146 \pm 3,6$ mmHg BSO2.8 $150 \pm 3,2$ mmHg, $P > 0,05$ **Figura 5.1A**).

5.1B Efeito do tratamento com BSO sobre a concentração de SH não protéico na hemácia e estômago.

O tratamento com BSO reduziu significativamente a concentração de SH não protéico tanto na hemácia (Controle Nitrito $0,9 \pm 0,05$ mM *versus* BSO1.4 $0,6 \pm 0,05$ mM BSO2.8 $0,4 \pm 0,03$ mM, $P < 0,05$) quanto no estômago (Controle Nitrito $1,0 \pm 0,09$ mM/g *versus* BSO1.4 $0,7 \pm 0,06$ mM/g BSO2.8 $0,7 \pm 0,05$ mM/g, $P < 0,05$ **Figura 5.2B**). Devido ao BSO ser um inibidor seletivo da síntese de glutatona, este fármaco impede apenas a síntese desta. Todavia, é importante considerarmos que a queda da concentração de glutatona pode levar a redução das concentração de outros tióis livres. Isto ocorreria devido a maior oxidação destes devido à falta de glutatona.

Devido a hemácia ter altas concentrações de glutathione (aproximadamente 1mM), o BSO foi mais efetivo na redução do total de SH não protéico nesta. Fato que justifica inversamente o menor efeito do BSO no estômago.

5.1C Correlação da queda de pressão com a concentração de SH não protéico na hemácia.

Observamos uma correlação positiva entre a queda de pressão e a maior concentração de SH não protéico na hemácia através correlação de Pearson ($P=0,002$). Também uma regressão linear aponta $R=0,65$. (**Figura 5.1C**).

Figura 5.1 **A:** Efeito do tratamento com BSO sobre a queda de pressão arterial gerada pelo nitrito de sódio. **B:** Efeito do tratamento com BSO sobre as concentrações de grupos tióis não protéicos na hemácia e estômago (SHNP). **C:** Correlação entre a queda da pressão arterial e a concentração de SHNP na hemácia. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N=6-7 por grupo). * $P<0,05$ diferença significativa comparado controle.

5.2A Efeito do tratamento com nitrito de sódio na concentração plasmático de nitrito em ratos pré-tratados com BSO

O tratamento com nitrito de sódio resultou em significativo aumento da concentração plasmática de nitrito em todos os animais tratados, independente do pré-tratamento com BSO. (Controle água $0,3 \pm 0,02 \mu\text{M}$ *versus* controle nitrito $35,5 \pm 5,5 \mu\text{M}$, BSO1.4 $35,5 \pm 3,0 \mu\text{M}$, BSO2,8 $34,5 \pm 2,4 \mu\text{M}$ $P < 0,05$, **Figura 5.2A**).

5.2B Efeito do tratamento com nitrito de sódio na concentração plasmática de espécies nitrosiladas em ratos pré-tratados com BSO

O tratamento com nitrito de sódio resultou em significativo aumento da concentração de espécies nitrosiladas no plasma dos animais. O pré-tratamento com BSO não alterou a concentração de espécies nitrosiladas no plasma. (Controle água $12,4 \pm 2,5 \text{ nM}$ *versus* controle nitrito $23,7 \pm 3,1 \text{ nM}$, BSO1.4 $24,4 \pm 7,0 \text{ nM}$, BSO2,8 $30,4 \pm 10,4 \text{ nM}$ $P < 0,05$, **Figura 5.2B**)

5.2C Efeito do tratamento com nitrito de sódio na concentração plasmática de espécies resistentes a mercúrio em ratos pré-tratados com BSO

O pré-tratamento com BSO por si resultou em aumento das concentrações de espécies nitrosiladas resistentes ao mercúrio, representadas principalmente pelas nitrosaminas. O tratamento com nitrito de sódio resultou em aumento da concentração de nitrosaminas nos grupos pré-tratados com BSO quando comparado ao grupo que não recebeu BSO. (Controle água $7,2 \pm 1,2 \text{ nM}$ *versus* controle BSO1.4 $12,2 \pm 1,4 \text{ nM}$ e controle BSO2.8 $12,8 \pm 4,0 \text{ nM}$, controle nitrito $7,0 \pm 0,5 \text{ nM}$ *Versus* BSO1.4 Nitrito $19,6 \pm 2,6 \text{ nM}$ BSO2.8 Nitrito $18,6 \pm 4,1 \text{ nM}$ $P < 0,05$, **Figura 5.2C**)

5.2D Efeito do tratamento com nitrito de sódio na concentração plasmática de nitrosotióis em ratos pré-tratados com BSO

O pré-tratamento com BSO por si resultou em tendência a diminuição das concentrações de nitrosotióis no plasma. Apesar de não ocorrer evidente diferença estatística, isto provavelmente se deve ao fato deste ser um fator calculado (espécies nitrosiladas subtraídas nitrosaminas), somado ao fato de grande variabilidade. O tratamento com nitrito de sódio resultou em significativo aumento da concentração de nitrosotióis. Não foi observada interação entre o tratamento com BSO e nitrito de sódio (**Figura 5.2D**)

Figura 5.2: Efeito do tratamento com nitrato sobre a concentração plasmática de nitrato (A), nitrosotios totais (B), nitrosaminas (C), nitrosotios (D) nos animais tratados com BSO. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão da média (N= 6-7 por grupo). *diferença significativa comparado ao controle água. # diferença significativa comparado ao controle nitrato, $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

As principais observações desta tese são:

- I. Os tratamentos com nitrito e nitrato de sódio reduzem significativamente a pressão arterial sistólica e pressão arterial média dos animais. Este efeito é completamente bloqueado pelo tratamento concomitante com omeprazol.
- II. Em todos os tratamentos crônicos, os tratamentos com nitrito ou nitrato de sódio resultaram em aumento das concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato. Todavia este aumento não teve relação com os efeitos hipotensores.
- III. O tratamento concomitante com nitrito ou nitrato de sódio e omeprazol, apesar de bloquear o efeito anti-hipertensivo, não afeta as concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato.
- IV. Os tratamentos crônicos com nitrito e nitrato de sódio resultaram em aumento da concentração das espécies nitrosiladas no plasma.
- V. O tratamento concomitante com nitrito ou nitrato de sódio e omeprazol impediram o aumento da concentração de espécies nitrosiladas, principalmente nitrosotióis, no plasma.
- VI. O tratamento com nitrito ou nitrato de sódio reduzem a pressão arterial sistólica e pressão arterial média dos animais e o tratamento concomitante de enxaguante bucal bloqueia o efeito anti-hipertensivo do nitrato de sódio mas não do nitrito de sódio.
- VII. Os tratamentos com nitrito ou nitrato de sódio resultam em aumento das concentrações de nitrito e nitrato no plasma. O tratamento com enxaguante bucal reduziu a concentração de nitrito plasmático nos

animais tratados e não alterou as concentrações plasmáticas de nitrato.

- VIII. Os tratamentos com nitrito e nitrato de sódio resultaram em aumento da concentração de espécies nitrosiladas no plasma e o tratamento concomitante com enxaguante bucal impediu o aumento da concentração destes apenas nos animais que receberam nitrato.
- IX. A depleção de grupos tióis livres resultou em menor efeito hipotensor do nitrito de sódio. Com correlação direta entre a queda de pressão e a concentração de tióis livres nas hemácias.
- X. A depleção de tióis livres não alterou a formação de espécies nitrosiladas. Apenas ocorreu maior formação de espécies resistentes a mercúrio.

O efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio tem sido alvo de diversos estudos particularmente na última década^{14,16,17,39,59}. Todavia já na década de 1990 Classen et al observaram o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio em ratos SHR⁶⁶. Estudos neste âmbito foram retomados apenas em 2005 com Tsuchiya et al¹⁷. A abordagem perante o efeito anti-hipertensivo do nitrito e nitrato de sódio foi iniciada em virtude da alta concentração de nitrito e nitratos em vegetais principalmente naqueles da dieta DASH⁷. Assim o nitrito e nitrato estão presentes em diversos vegetais e na própria saliva humana^{12,33}. Na década de 90 foi demonstrado por dois autores distintos que o nitrito de sódio era convertido a NO no pH ácido do estômago.^{25,35}. No contexto que o nitrito é capaz de ser convertido a NO e posteriormente este exercer efeito vasodilatador do tônus vascular entre

outros, várias vias de conversão de nitrato a nitrito e nitrito e NO foram elucidadas^{14,16,48,67}.

Apenas recentemente estudos de nosso grupo demonstraram o efeito hipotensor dependente da dose do nitrito de sódio em ratos 2R1C. A administração desta droga tanto na água ingerida pelos animais como diariamente por gavagem se mostrou eficaz para reduzir a pressão arterial sistólica^{59,68}. Também foi verificado que o pH gástrico afeta o efeito hipotensor do nitrito de sódio agudamente, sugerindo que o NO formado pelo nitrito no suco gástrico é capaz de reduzir a pressão arterial¹⁹.

Nesta tese demonstramos em quatro tratamentos crônicos que o nitrito e o nitrato de sódio exercem efeitos anti-hipertensivos. O tratamento com nitrito de sódio uma vez ao dia resultou em queda de cerca de 40 mmHg da pressão arterial média sistólica, dados que corroboram valores já apresentados na literatura⁵⁹.

De forma interessante o tratamento com nitrato de sódio exerceu efeito anti-hipertensivo apenas após uma semana de tratamento. Os valores absolutos de queda da pressão foram semelhantes a valores já encontrados na literatura em outros modelos de hipertensão³⁷. Nestes tratamentos ocorreu aumento da concentração plasmática de nitrito e nitrato.

Observamos também que o omeprazol aboliu completamente o efeito anti-hipertensivo do nitrito e nitrato de sódio. Ambas as observações demonstram a importância do pH gástrico no efeito do tratamento crônico de nitrito ou nitrato de sódio. Também é importantíssimo ressaltar que o efeito anti-hipertensivo do nitrato de sódio reforça a participação do ciclo de nitrato-nitrito-NO no organismo¹³ e corrobora outros resultados já apresentados na literatura em outros modelos de

hipertensão³⁷. Tomados em conjunto estes resultados ajudam a elucidar o fato que o maior consumo de vegetais, os quais possuem elevadas concentrações de nitrato e nitrito, auxiliam no combate a hipertensão⁷.

Com estes resultados poderíamos concluir que o efeito anti-hipertensivo do nitrito e nitrato de sódio são dependentes do pH gástrico ou influenciadas pelo omeprazol. Podemos verificar que em ambos os tratamentos ocorreu significativo aumento da concentração plasmática de nitrito e nitrato. Logo poderíamos considerar que o aumento da concentração plasmática de nitrito seria responsável pelo efeito anti-hipertensivo destes^{16,49,69}. Entretanto dois fatos são importantes, a concentração plasmática de nitrito nos animais que receberam nitrato foi duas vezes maior que a concentração plasmática observada nos animais que receberam nitrito. Todavia o efeito anti-hipertensivo foi igual em ambos e demorou mais a aparecer no grupo nitrato. Adiciona-se que podemos sugerir que o nitrato está sendo convertido a nitrito dentro do organismo e que, possivelmente, devido à estequiometria da conversão ser 1 para 1, observamos valores maiores de nitrito nestes animais.

Outro ponto fundamental é o tratamento concomitante com omeprazol que bloqueou completamente o efeito anti-hipertensivo do nitrito e nitrato de sódio. Todavia a concentração plasmática de nitrito nestes animais era igual aos animais que receberam nitrito e tiveram redução da pressão arterial. Assim o omeprazol por aumentar o pH gástrico, bloqueia o efeito hipotensor, ou por alguma outra via impediria este efeito. Adicione-se que o omeprazol exerceu efeito significativo sobre o aumento do pH gástrico. A fim de verificar possível interação no contexto cardiovascular entre o efeito vasodilatador do nitrito e o omeprazol, nosso grupo em trabalhos anteriores em órgão isolado demonstrou ausência de interação entre estas duas drogas¹⁹. Também é importante ressaltar que já foi demonstrado que o

omeprazol e outros inibidores da bomba de prótons não são capazes de alterar a pressão arterial sistólica⁴³. A única interação direta do omeprazol sobre o sistema cardiovascular foi observada recentemente, no qual o omeprazol e inibidores da bomba de próton inibem a enzima que degrada ADMA e resulta na maior concentração deste inibidor endógeno das NOS⁷⁰.

Outro fato importante sobre a interação entre omeprazol e o sistema cardiovascular provém de um estudo epidemiológico no qual foram avaliados 18.000 pacientes e a mortalidade por doenças cardiovasculares naqueles que utilizavam omeprazol foi maior⁷¹. Apesar do estudo sugerir confusão entre o diagnóstico de doenças cardiovasculares que resultam em dor no tórax com refluxo, talvez a interação entre a sistema gastrointestinal e cardiovascular seja maior do que imaginado, como sugere esta tese.

Assim esta abordagem experimental permitiu a nós apoiar a hipótese que o efeito anti-hipertensivo do nitrito e nitrato de sódio é dependente do pH gástrico.

Dois pontos necessitam ser reforçados. Primeiro, se considerarmos que o efeito vasodilatador do NO é responsável pelo efeito anti-hipertensivo do nitrito, pela conversão de nitrito a NO no sangue ou no tecido^{16,17,48,72}, ocorrem alguns conflitos. Primeiramente o NO tem tempo de meia vida no sangue de menos de um segundo e o nitrito, de 11 minutos^{16,49}. Logo, para reduzir a pressão, o NO teria que ser produzido continuamente. Mas os animais que receberam omeprazol tiveram o mesmo aumento plasmático de nitrito, sem efeito na pressão arterial. Assim, provavelmente, o efeitos anti-hipertensivos do nitrito e nitrato, nestas doses, não são provenientes da formação de NO no vaso ou através do sistema cardiovascular.

Desta forma, apesar de resultados simples, uma análise mais refinada destes indica que o efeito anti-hipertensivo do nitrito provavelmente não ocorre devido a uma produção contínua de NO.

O tratamento com nitrito de sódio elevou a concentração plasmática de nitrito para aproximadamente 2 μM e o omeprazol não alterou este valor significativamente. Já o tratamento com nitrato elevou a concentração plasmática de nitrito para aproximadamente 6 μM com o omeprazol apresentando mesmo comportamento descrito. Ao analisarmos estas concentrações de nitrito verificamos que são semelhantes às encontradas em trabalhos que verificaram o efeito hipotensor do nitrito de sódio^{17,37,39,45,73}. Se compararmos estes valores com as concentrações plasmáticas de nitrito após a infusão deste e o efeito hipotensor verificaremos inconsistências. Num recente estudo, infundiram-se 10 $\mu\text{mol/kg}$ de nitrito em ratos hipertensos de 300g, resultando em uma concentração plasmática inicial de 100 $\mu\text{mol/L}$ (considerando 10% do peso como volume sanguíneo). Esta elevada concentração plasmática resultou em queda de 15mmHg da pressão média do animal^{69,73}. Logo, como o nitrito oral diminui 40mmHg a pressão sistólica e média concomitantemente com concentrações plasmáticas muito menores que acima? Tomados em conjunto, todos estes dados reforçam que o efeito anti-hipertensivo do nitrito ou nitrato de sódio não ocorre devido ao aumento da concentração plasmática de nitrito.

A participação do trato gastrointestinal no efeito anti-hipertensivo do nitrito foi inicialmente sugerida pelo nosso grupo¹⁹. O ambiente ácido do estômago converte nitrito a NO, mas vai muito mais além, pois o nitrito em meio ácido forma diversas espécies nitrosilantes antes de formar NO^{17,51,74}. Assim nós encontramos que os animais que receberam nitrito e nitrato de sódio tiveram significativo aumento das

espécies nitrosiladas, em especial nitrosotióis no plasma. Interessantemente o tratamento com omeprazol impediu o aumento da concentração de espécies nitrosiladas e de nitrosotióis no plasma. Fato que pode ser relacionado à abolição do efeito hipotensor pelo omeprazol. Adicione-se que os nitrosotióis são capazes de carrear NO, logo, permitindo, teoricamente, que o NO nítrico formado no estômago possa atingir de forma mais eficaz a vasculatura sistemicamente. Adiciona-se que os nitrosotióis devem ser abordados como muito mais do que doadores de NO, pois podem fazer transnitrosilações diversas e as nitrosilações podem alterar a atividade de receptores, enzimas e sinalizadores celulares^{50,52,54,57}.

A fim de elucidarmos melhor a dependência do efeito anti-hipertensivo do nitrito e nitrato com o ciclo entero-salivar, os animais foram tratados com enxaguante bucal. Verificamos que o tratamento com nitrato de sódio reduziu a pressão após uma semana de administração do fármaco e o uso concomitante de enxaguante bucal uma vez ao dia impediu a queda da pressão arterial. Estes resultados mostram pela primeira vez o efeito do enxaguante bucal sobre o efeito do nitrato na hipertensão. Assim corroborando com dados publicados durante a execução desta tese^{20,21} sugerimos que o efeito anti-hipertensivo do nitrato de sódio ocorre devido à conversão de nitrato a nitrito pelas bactérias bucais e posteriormente a deglutição do nitrito. Ressalta-se que o ciclo entero-salivar é fundamental para o efeito anti-hipertensivo do nitrato de sódio. Isto também reforça a necessidade do nitrito passar pelo sistema gastrointestinal para exercer o efeito anti-hipertensivo.

Surpreendentemente os animais tratados com nitrato de sódio e enxaguante bucal apresentaram significativo aumento da concentração de nitrito plasmático, apesar deste aumento ser menor que o grupo tratado apenas com nitrato. Considerando que aqueles animais tiveram grande diminuição das bactérias orais,

acreditamos que ocorra conversão de nitrato a nitrito ou por bactérias estomacais e intestinais⁷⁵ ou por enzimas no próprio sistema cardiovascular, como a XOR⁷⁶.

Novamente verificamos que o aumento da concentração plasmática de nitrito não esta relacionada com o efeito anti-hipertensivo observado.

De forma surpreendente, verificamos que o nitrito de sódio reduziu a pressão arterial independente do co-tratamento com enxaguante bucal. A queda da pressão arterial, tanto do grupo que recebeu apenas nitrito quanto do grupo que recebeu nitrito e enxaguante bucal, foi muito próxima e semelhante àquela já observada nesta tese e em outros estudos anteriores⁵⁹.

Logo, podemos sugerir que o nitrito de sódio, quando administrado por via oral, gera alguma substância que reduz a pressão arterial e a mantém reduzida por um período mínimo de 24 horas.

O tratamento com enxaguante bucal resultou em diminuição das concentrações plasmáticas nos controles. Este resultado acrescido dos resultados de concentração de nitrito e nitrato plasmáticos sugerem que parte do nitrito plasmático provenha do ciclo enterossalivar. Isto resulta que o nitrito plasmático, considerado como melhor marcador da atividade das NO sintases⁷⁷, pode ser influenciado pela dieta e pelo número de bactérias bucais.

Nestas duas abordagens experimentais descritas novamente verificamos que o efeito anti-hipertensivo apenas ocorre quando há aumento das espécies nitrosiladas. Logo sugerimos que o efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio ocorre devido à formação de espécies nitrosiladas, principalmente nitrosotióis, no estômago de forma dependente do pH. A fim de apoiar melhor esta hipótese, pré-tratamos ratos normotensos com BSO e posteriormente L-NAME, e então avaliamos o efeito

hipotensor do nitrito de sódio nestes animais. Verificamos que os animais pré-tratados com BSO tiveram menor queda de pressão devido ao nitrito quando comparado ao controle. Estes resultados reforçam que a formação de nitrosotióis, em especial nitrosoglutationa, participa do efeito hipotensor do nitrito de sódio. Diversos trabalhos na literatura sugerem as espécies nitrosiladas modifiquem as funções protéicas e, conseqüentemente, afetam a homeostase de sistemas orgânicos, como o sistema cardiovascular^{50,53,54,56,78}. Estas participariam tanto como doadoras de NO quanto gerando nitrosilações diversas através de transnitrosilações^{53,56,78}. De forma muito interessante ocorreu uma significativa correlação entre a queda da pressão arterial e a quantidade de grupos tiois livres na hemácia. Ressalta-se que a concentração de tióis não protéicos na hemácia foi mais afetada pelo BSO devido a hemácia conter altas concentrações de glutathione. Perante o estômago, possivelmente devido à alta concentração de tióis não protéicos (mas que provavelmente não são glutathione), não houve grande queda da concentração de SH livre.

Verificamos que o tratamento com nitrito resulta em significativo aumento da concentração de espécies nitrosiladas agudamente, o que corrobora dados da literatura¹⁹. De forma interessante, o tratamento com BSO gerou aumento de espécies nitrosiladas resistentes a mercúrio. Por fim, observa-se aparente aumento da concentração de nitrosotióis nos animais tratados com nitrito quando comparados aos animais tratados com nitrito e que receberam BSO.

Em conclusão, podemos sugerir que o efeito anti-hipertensivo do nitrato de sódio é dependente da conversão deste a nitrito, dependendo do ciclo enterosalivar e das bactérias bucais. O efeito anti-hipertensivo do nitrito ocorre devido à formação de espécies nitrosiladas, em especial nitrosotióis, a partir da reação do nitrito nas

condições ácidas do estômago. Estas espécies nitrosiladas são capazes de reduzir a pressão por 24 horas por meios ainda desconhecidos. Maiores estudos ainda são fundamentais para elucidar a forma com que as espécies nitrosiladas oriundas do nitrito exercem efeitos anti-hipertensivos. Também fica por determinar se estas são capazes de realizar transnitrosilações ou doar NO por longos períodos.

CONCLUSÃO

Esta tese demonstra pela primeira vez que o efeito anti-hipertensivo do nitrito e nitrato de sódio ocorre devido à formação de espécies nitrosiladas de forma dependente do pH gástrico. Também demonstra que o efeito anti-hipertensivo do nitrato é dependente do ciclo entero-salivar e que o nitrato provavelmente necessita ser convertido a nitrito na cavidade oral para reduzir a pressão. Adiciona-se que nesta tese observa-se que o nitrito de sódio exerce efeito anti-hipertensivo independente do ciclo entero-salivar. Por fim sugere-se que dentre as espécies nitrosiladas, os nitrosotióis participam ativamente do efeito anti-hipertensivo do nitrito de sódio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nobre, F., *et al.* VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **95**, 1-51 (2010).
2. Kapil, V., *et al.* Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension* **56**, 274-281 (2010).
3. Webb, A.J., *et al.* Acute blood pressure lowering, vasoprotective and anti-platelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension* **51**, 784-790 (2010).
4. Oparil, S. Pathogenesis of Hypertension. *Annals of Internal Medicine* **139**, 761 (2003).
5. Ingelfinger, J.R. The molecular basis of pediatric hypertension. *Pediatric clinics of North America* **53**, 1011-1028 (2006).
6. Ophir, O., Peer, G., Gilad, J., Blum, M. & Aviram, A. Low blood pressure in vegetarians: the possible role of potassium. *Am J Clin Nutr* **37**, 755-762 (1983).
7. Sacks, F.M., *et al.* Rationale and Design of the Dietary Approaches Hypertension Trial (DASH). *Hypertension* **5**, 108-118 (1995).
8. Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Cole, J.A. & Benjamin, N. Nitrate, bacteria and human health. *Microbiology* **2**(2004).
9. Lundberg, J.O., Feelisch, M., Björne, H., Jansson, E.a. & Weitzberg, E. Cardioprotective effects of vegetables: is nitrate the answer? *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **15**, 359-362 (2006).
10. Weitzberg, E. & Lundberg, J.O. Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annual review of nutrition* **33**, 129-159 (2013).

11. van Velzen, A.G., *et al.* The oral bioavailability of nitrate from nitrate-rich vegetables in humans. *Toxicology letters* **181**, 177-181 (2008).
12. Hord, N. & Tang, Y. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American journal of clinical*, 1-10 (2009).
13. Lundberg, J.O., Weitzberg, E. & Gladwin, M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery* **7**, 156-167 (2008).
14. van Faassen, E.E., *et al.* Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev* **29**, 683-741 (2009).
15. Qin, L., *et al.* Sialin (SLC17A5) functions as a nitrate transporter in the plasma membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 13434-13439 (2012).
16. Cosby, K., *et al.* Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* **9**, 1498-1505 (2003).
17. Tsuchiya, K., *et al.* Nitrite is an alternative source of NO in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H2163-2170 (2005).
18. Björne, H., Weitzberg, E. & Lundberg, J.O. Intra-gastric generation of antimicrobial nitrogen oxides from saliva--physiological and therapeutic considerations. *Free radical biology & medicine* **41**, 1404-1412 (2006).
19. Pinheiro, L.C., *et al.* Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. *Free Radic Biol Med* **53**, 701-709 (2012).
20. Petersson, J., *et al.* Gastroprotective and blood pressure lowering effects of dietary nitrate are abolished by an antiseptic mouthwash. *Free radical biology & medicine* **46**, 1068-1075 (2009).

21. Kapil, V., *et al.* Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. *Free radical biology & medicine* **55**, 93-100 (2013).
22. Kanematsu, Y., *et al.* Dietary doses of nitrite restore circulating nitric oxide level and improve renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F1457-1462 (2008).
23. Andrew, P.J. & Mayer, B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* **43**, 521-531 (1999).
24. Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142 (1991).
25. Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Lundberg, J.M. & Alving, K. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* **35**, 1543-1546 (1994).
26. Li, H., Samouilov, A., Liu, X. & Zweier, J.L. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues. *Biochemistry* **42**, 1150-1159 (2003).
27. Lauer, T., *et al.* Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12814-12819 (2001).
28. Tang, Y., Jiang, H. & Bryan, N.S. Nitrite and nitrate: cardiovascular risk-benefit and metabolic effect. *Curr Opin Lipidol* **22**, 11-15.
29. Hunault, C.C., van Velzen, A.G., Sips, A.J., Schothorst, R.C. & Meulenbelt, J. Bioavailability of sodium nitrite from an aqueous solution in healthy adults. *Toxicol Lett* **190**, 48-53 (2009).

30. Dejam, A., *et al.* Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation. *Circulation* **116**, 1821-1831 (2007).
31. Dias-Junior, C.A., Gladwin, M.T. & Tanus-Santos, J.E. Low-dose intravenous nitrite improves hemodynamics in a canine model of acute pulmonary thromboembolism. *Free Radic Biol Med* **41**, 1764-1770 (2006).
32. Alzawahra, W.F., Talukder, M.A., Liu, X., Samouilov, A. & Zweier, J.L. Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H499-508 (2008).
33. Lundberg, J.O., *et al.* Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat Chem Biol* **5**, 865-869 (2009).
34. Zweier, J.L., Li, H., Samouilov, A. & Liu, X. Mechanisms of nitrite reduction to nitric oxide in the heart and vessel wall. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **22**, 83-90 (2010).
35. Benjamin, N., *et al.* Stomach NO synthesis. *Nature* **368**, 502 (1994).
36. McKnight, G.M., *et al.* Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut* **40**, 211-214 (1997).
37. Carlström, M., *et al.* Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injuries, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. *Cardiovascular research* **89**, 574-585 (2011).
38. Tsuchiya, K., *et al.* Dietary nitrite ameliorates renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **22**, 98-103 (2010).

39. Montenegro, M.F., *et al.* Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free radical biology & medicine* (2011).
40. Rocha, B.S., Gago, B., Barbosa, R.M. & Laranjinha, J. Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation. *Toxicology* **265**, 41-48 (2009).
41. McColl, K.E.L. Effect of Proton Pump Inhibitors on Vitamins and Iron. *Am J Gastroenterol* **104**, 5 (2009).
42. Kirchheiner, J., *et al.* Relative potency of proton-pump inhibitors-comparison of effects on intragastric pH. *Eur J Clin Pharmacol* **65**, 19-31 (2009).
43. Yenisehirli, A. & Naseri, E. Omeprazole, lansoprazole and pantoprazole had no effect on blood pressure and electrocardiogram of anesthetized rat. *Pharmacol Res* **58**, 65-71 (2008).
44. Mowat, C., Carswell, A., Wirz, A. & McColl, K.E. Omeprazole and dietary nitrate independently affect levels of vitamin C and nitrite in gastric juice. *Gastroenterology* **116**, 813-822 (1999).
45. Montenegro, M.F., *et al.* Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **385**, 509-517 (2012).
46. Pinheiro, L.C., *et al.* Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. *Free radical biology & medicine* **53**, 701-709 (2012).
47. Dejam, A., *et al.* Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation. *Circulation* **116**, 1821-1831 (2007).

48. Lundberg, J.O. & Weitzberg, E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**, 915-922 (2005).
49. Dejam, A., *et al.* Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* **106**, 734-739 (2005).
50. Hogg, N. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free radical biology & medicine* **28**, 1478-1486 (2000).
51. Broniowska, K.a. & Hogg, N. The chemical biology of S-nitrosothiols. *Antioxidants & redox signaling* **17**, 969-980 (2012).
52. Broniowska, K.a., Diers, A.R. & Hogg, N. S-nitrosoglutathione. *Biochimica et biophysica acta* **1830**, 3173-3181 (2013).
53. Anand, P. & Stamler, J.S. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **90**, 233-244 (2012).
54. Gould, N., Doulias, P.-t., Tenopoulou, M., Raju, K. & Ischiropoulos, H. Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. *The Journal of biological chemistry* **288**, 26473-26479 (2013).
55. Grossi, L. & Montevocchi, P.C. S -Nitrosocysteine and Cystine from Reaction of Cysteine with Nitrous Acid. A Kinetic Investigation 1. *The Journal of Organic Chemistry* **67**, 8625-8630 (2002).
56. Beigi, F., *et al.* Dynamic denitrosylation via S-nitrosoglutathione reductase regulates cardiovascular function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 4314-4319 (2012).

57. Leclerc, P.C., *et al.* S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. *British journal of pharmacology* **148**, 306-313 (2006).
58. Campbell, C.A., *et al.* Validation of a conscious rat model for the discovery of novel agents that inhibit gastric acid secretion. *Eur J Pharmacol* **589**, 260-263 (2008).
59. Montenegro, M.F., *et al.* Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **385**, 509-517 (2012).
60. Pechánová, O., Kashiba, M. & Inoue, M. Role of glutathione in stabilization of nitric oxide during hypertension developed by inhibition of nitric oxide synthase in the rat. in *Japanese journal of pharmacology*, Vol. 81 223-229 (1999).
61. Ceron, C.S., *et al.* Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **31**, 261-270 (2012).
62. Montenegro, M.F., Pessa, L.R. & Tanus-Santos, J.E. Isoflavone genistein inhibits the angiotensin-converting enzyme and alters the vascular responses to angiotensin I and bradykinin. *Eur J Pharmacol* **607**, 173-177 (2009).
63. Feelisch, M., *et al.* Concomitant S-, N-, and heme-nitros (yl) ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *The FASEB journal*, 1775-1785 (2002).
64. Pelletier, M.M., *et al.* The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions. *Free radical biology & medicine* **41**, 541-548 (2006).
65. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. (1959).

66. Classen, H.G., Stein-Hammer, C. & Thoni, H. Hypothesis: the effect of oral nitrite on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. Does dietary nitrate mitigate hypertension after conversion to nitrite? *J Am Coll Nutr* **9**, 500-502 (1990).
67. Lundberg, J.O. & Weitzberg, E. NO-synthase independent NO generation in mammals. *Biochemical and biophysical research communications* **396**, 39-45 (2010).
68. Montenegro, M.F., *et al.* Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free Radic Biol Med* **51**, 144-152.
69. Ghosh, S.M., *et al.* Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. *Hypertension* **61**, 1091-1102 (2013).
70. Ghebremariam, Y.T., *et al.* Unexpected effect of proton pump inhibitors: elevation of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine. *Circulation* **128**, 845-853 (2013).
71. Bateman, D.N., *et al.* Mortality study of 18 000 patients treated with omeprazole. *Gut* **52**, 942-946 (2003).
72. Li, H., Cui, H., Kundu, T.K., Alzawahra, W. & Zweier, J.L. Nitric Oxide Production from Nitrite Occurs Primarily in Tissues Not in the Blood. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 17855-17863 (2008).
73. Montenegro, M.F., *et al.* Vascular xanthine oxidoreductase contributes to the antihypertensive effects of sodium nitrite in L-NAME hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **387**, 591-598 (2014).

74. Lundberg, J.O. & Weitzberg, E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract. *Gut* (2012).
75. Sobko, T., *et al.* Gastrointestinal bacteria generate nitric oxide from nitrate and nitrite. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **13**, 272-278 (2005).
76. Huang, L., Borniquel, S. & Lundberg, J.O. Enhanced xanthine oxidoreductase expression and tissue nitrate reduction in germ free mice. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **22**, 191-195 (2010).
77. Kleinbongard, P., *et al.* Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radical Biology ...* **35**, 790-796 (2003).
78. Lewis, S.J., *et al.* The vasodilator potency of the endothelium-derived relaxing factor, L-S-nitrosocysteine, is impaired in conscious spontaneously hypertensive rats. *Vascular pharmacology* **44**, 476-490 (2006).

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 091/2009, sobre o projeto intitulado "*Efeitos do nitrito de sódio na hipertensão experimentalmente induzida e na reatividade vascular de ratos hipertensos*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Eduardo Tanus dos Santos** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de **08 de junho de 2009**.

(We certify that the protocol nº 091/2009, about "*Effects of sodium nitrite on hypertension and vascular reactivity of hypertensive rats*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved in **06/08/2009** meeting.

Ribeirão Preto, 08 de junho de 2009.

Prof. Dr. Eduardo Melani Rocha
Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 042/2012, sobre o projeto intitulado "*Estudo de mecanismos anti-hipertensivos do nitrato de sódio na hipertensão renovascular experimental.*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Eduardo Tanus dos Santos** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 30 de julho de 2012.

(We certify that the protocol nº 042/2012, about "*Study of anti-hypertensive mechanisms of sodium nitrate in experimental renovascular hypertension*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 07/30/2012.

Ribeirão Preto, 30 de julho de 2012.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto

*Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal*