

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

**MESTRADO**

**JOSÉ VIRGULINO DE OLIVEIRA LIMA**

**Estudo comparativo entre a S-nitroso-N-acetilcisteína e o nitrito de sódio  
quanto aos seus efeitos hipotensores e alterações bioquímicas vasculares**

**RIBEIRÃO PRETO - SP**

**2022**

**JOSÉ VIRGULINO DE OLIVEIRA LIMA**

**Estudo comparativo entre a S-nitroso-N-acetilcisteína e o nitrito de sódio quanto aos seus efeitos hipotensores e alterações bioquímicas vasculares**

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

**Área de concentração: Farmacologia**

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

**RIBEIRÃO PRETO – SP**

**2022**

**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 A FONTE.**

#### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Lima, José Virgulino de Oliveira

Estudo comparativo entre a s-nitroso-n-acetilcisteína e o nitrito de sódio quanto aos seus efeitos hipotensores e alterações bioquímicas vasculares. Ribeirão Preto, 2010, 2022.

106 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Tanus-Santos, José Eduardo

1. Nitrito. 2. S-nitroso N-acetilcisteína. 3. L-NAME 4. Hipertensão.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

José Virgulino de Oliveira Lima

**Estudo comparativo entre a s-nitroso-n-acetilcisteína e o nitrito de sódio quanto aos seus efeitos hipotensores e alterações bioquímicas vasculares.**

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

**Área de concentração: Farmacologia**

Aprovado em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### **Banca examinadora:**

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo dom da vida, amor, abdições em prol da realização dos meus sonhos e apoio incondicional, e Deus por toda coragem, determinação, resiliência, força e fé atribuída a mim.**

*...Essas proações são para mostrar que a fé que vocês têm é verdadeira. Pois até o ouro, que perece, é provado pelo fogo. Da mesma maneira, a fé que vocês têm, que vale muito mais do que o ouro, precisa ser provado para que siga firme, para toda aprovação, glória e honra, no dia da revelação de cristo (Pedro 1:7).*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ser a força motriz por toda minha determinação, persistência, resiliência e fé para suportar todas as adversidades enfrentadas nesse percurso

Aos meus irmãos por todo apoio e incentivo incondicional fornecidos a mim durante essa trajetória.

A Gisele, minha companheira fiel em toda a minha jornada, eu partilho todas as minhas conquistas e toda minha gratidão, pois sei que sem ela, nada disso seria possível e nada faria sentido. Em todos os momentos de dúvidas, sempre foi a luz que iluminava meu caminho e tornava mais leve.

A minha cunhada, por todo incentivo e ajuda prestada a mim, em prol do meu sucesso e conclusão de meus objetivos.

Ao Professor José Eduardo Tanus dos Santos pela orientação, além de toda ajuda intelectual e conhecimento científico disponibilizados durante todos esses anos.

A Dani por me ajudar em minha jornada no laboratório, sempre com muita paciência e carinho para ensinar.

Ao meu amigo Leevan, pelo companheirismo e sinceridade durante minha jornada, sempre disposto a ajudar.

Agradeço também aos demais integrantes do laboratório JETS, por toda ajuda sempre que necessário.

Aos membros da banca Dr. Alceu Afonso Jordão Junior, Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior por aceitarem o convite, pela disponibilidade e pelas contribuições oferecidas.

Aos professores do departamento de Farmacologia da FMRP/USP pela contribuição acadêmica e intelectual.

A Gislaine, por todas as dúvidas sanadas de forma solícita e educada, sempre facilitando a minha vida.

A todos os funcionários do departamento pelos serviços prestados a instituição em que estudei.

Ao apoio financeiro disponibilizado pela CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior) para a realização do presente trabalho.

*“...Onde estiver, seja lá como for, tenha fé, porque até no lixão nasce flor.”*

**Mano Brown**



## RESUMO

Lima, José Virgulino de Oliveira. **Estudo comparativo entre a S-nitroso-N-acetilcisteína e o nitrito de sódio quanto aos seus efeitos hipotensores e alterações bioquímicas vasculares.** 2022. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um distúrbio cardiovascular resultante do aumento crônico dos valores pressóricos ocasionado em parte por deficiente produção de óxido nítrico (NO) e pela ação constritora vascular mediada pela ação da angiotensina II (ANGII). Embora existam terapias medicamentosas para o tratamento da HAS, ainda é necessária a pesquisa de novos mecanismos anti-hipertensivos em busca de vias alternativas de tratamento. A síntese do óxido nítrico (NO) pela via nitrato-nitrito-NO é um dos mecanismos mais estudados para o controle dos eventos cardiovasculares provocados pela HAS, assim como a via clássica, que trata da formação de NO por meio das enzimas NO sintases (NOS): endotelial, neuronal e induzível. A nitrosação de proteínas é representada pela adição de um grupamento NO em centros ativos, causando uma modificação pós-translacional capaz de alterar sua função. Tal modificação pode ser causada por nitrosotióis (RSNO) formados endogenamente. Contudo nosso foco de estudo é baseado em um nitrosotiól sintético, a S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC), produto oriundo da S-nitrosação da N-acetilcisteína (NAC). Assim, a hipótese deste estudo é que a SNAC, comparada em dose equimolar ao nitrito de sódio, causaria maiores reduções de pressão arterial (PA) que o nitrito de sódio por promover maiores aumentos na concentração plasmática de nitrosotióis aumentando o grau de nitrosação proteica nos vasos, o que explicaria maiores efeitos anti-hipertensivos do que os causados pelo nitrito de sódio propriamente dito. Foram utilizados ratos normotensos divididos em quatro grupos experimentais, que receberam: a) Veículo (água destilada); b) L-NAME (100mg/kg); c) L-NAME (100mg/kg) +  $\text{NO}_2^-$  72  $\mu\text{mol/kg}$ ; d) L-NAME (100mg/kg) + SNAC 72  $\mu\text{mol/kg}$ . Todos os tratamentos foram realizados por via oral (gavagem), uma única vez, e após dez minutos foram avaliados os parâmetros discutidos abaixo. Os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral (para aferição da pressão) e avaliados no Biopac 4-6 horas após a cirurgia. Amostras de plasma foram analisadas pelo método de quimioluminescência através de ozônio. O total de proteínas nitrosadas foram determinadas usando a técnica SNO-RAC com modificações. Além disso, foi medido a produção de espécies reativas de oxigênio por meio dos ensaios de DHE e Lucigenina. As concentrações de cGMP também foram medidas na aorta dos ratos. Os tratamentos com Nitrito de sódio ou SNAC reduziram a pressão arterial média (PAM) e a pressão arterial sistólica (PAS). A frequência cardíaca (FC) teve um aumento após o tratamento com Nitrito e SNAC em resposta a hipertensão. As concentrações plasmáticas de nitrito mostraram aumento expressivo no tratamento com Nitrito. Contudo, houve também um ligeiro aumento após o tratamento com o SNAC. Ambos os tratamentos também promoveram aumento nas concentrações plasmáticas de S-nitrosotióis, em especial, com o SNAC. O ensaio de DHE não apresentou diferenças significativas entre os grupos. O tratamento com nitrito e SNAC reduziram a produção de espécies reativas de oxigênio avaliada pelo ensaio de lucigenina. Por fim, não foi obtida evidência de aumento na nitrosação proteica após os tratamentos realizados. Embora o tratamento com L-NAME tenha diminuído as

concentrações de cGMP, os tratamentos não produziram aumentos das mesmas. Os grupos tratados mostraram uma redução na expressão de cGMP. Nossos resultados permitem sugerir que a diminuição da pressão arterial parece ocorrer em proporção aos aumentos das concentrações de RSNO, e não de nitrito plasmático, sendo mais intensa com SNAC do que com o nitrito de sódio comparados em doses equimolares. Não pudemos evidenciar mecanismos associados diferenças na formação de GMPc ou mecanismos antioxidantes, nem quanto a diferenças de nitrosação proteica vascular induzidos pelas duas drogas testadas que poderiam explicar a diferença observada quanto ao efeito hipotensor destas drogas. É possível que aumentos das concentrações de nitrito possam potencializar os efeitos vasodilatadores apresentados por RSNO, como sugerem estudos recentes, explicando assim os achados do presente estudo.

**Palavras chave:** Nitrito. S-nitrosotióis. Hipertensão. L-NAME.

## ABSTRACT

Lima, José Virgulino de Oliveira. **Comparative study between S-nitroso-N-acetylcysteine and sodium nitrite regarding their hypotensive effects and vascular biochemical changes.** 2022. Masters dissertation – School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Systemic arterial hypertension (SAH) is a cardiovascular disorder resulting from the chronic increase in blood pressure caused in part by deficient production of nitric oxide (NO) and by the vascular constrictor action mediated by the action of angiotensin II (ANGII). Although there are drug therapies for the treatment of SAH, it is still necessary to research new antihypertensive mechanisms in search of alternative treatment routes. The synthesis of nitric oxide (NO) through the nitrate-nitrite-NO pathway is one of the most studied mechanisms for the control of cardiovascular events caused by SAH, as well as the classical pathway, which deals with the formation of NO through NO synthase enzymes (NOS): endothelial, neuronal and inducible. Protein nitrosation is represented by the addition of a NO group in active centers, causing a post-translational modification capable of altering its function. Such modification may be caused by endogenously formed nitrosothiols (RSNO). However, our study focus is based on a synthetic nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC), a product derived from the S-nitrosation of N-acetylcysteine (SNAC). Thus, the hypothesis of this study is that SNAC, compared at an equimolar dose to sodium nitrite, would cause greater reductions in blood pressure than sodium nitrite by promoting greater increases in the plasma concentration of nitrosothiols, increasing the degree of protein nitrosation in the vessels, which would explain greater antihypertensive effects than those caused by sodium nitrite itself. Normotensive rats were divided into four experimental groups, which received: a) Vehicle (distilled water); b) L-NAME (100mg/kg); c) L-NAME (100mg/kg) + NO<sub>2</sub> - 72 µmol/kg; d) L-NAME (100mg/kg) + SNAC 72 µmol/kg. All treatments were performed orally (gavage) once, and after ten minutes the parameters discussed below were evaluated. The animals were submitted to femoral artery cannulation (to measure pressure) and evaluated in the Biopac 4-6 hours after surgery. Plasma samples were analyzed by the chemiluminescence method using ozone. Total nitrosated proteins were determined using the SNO-RAC technique with modifications. In addition, the production of reactive oxygen species was measured through DHE and Lucigenin assays. cGMP concentrations were also measured in the rat aorta. Sodium nitrite or SNAC treatments reduced mean arterial pressure (MAP) and systolic blood pressure (SBP). Heart rate (HR) increased after treatment with Nitrite and SNAC in response to hypertension. Plasma concentrations of nitrite showed a significant increase in treatment with nitrite. However, there was also a slight increase after treatment with SNAC. Both treatments also promoted an increase in plasma concentrations of S-nitrosothiols, especially with SNAC. The DHE assay showed no significant differences between groups. Treatment with nitrite and SNAC reduced the production of reactive oxygen species evaluated by the lucigenin assay. Finally, no evidence of an increase in protein nitrosation was obtained after the treatments performed. Although treatment with L-NAME decreased cGMP concentrations, the treatments did not produce increases in them. Treated groups showed a reduction in cGMP expression. Our results allow us to suggest that the decrease in blood pressure seems to occur in proportion to increases in RSNO concentrations, and not plasma

nitrite, being more intense with SNAC than with sodium nitrite compared at equimolar doses. We could not evidence mechanisms associated with differences in cGMP formation or antioxidant mechanisms, nor with differences in vascular protein nitrosation induced by the two tested drugs that could explain the difference observed in the hypotensive effect of these drugs. It is possible that increases in nitrite concentrations may potentiate the vasodilatory effects presented by RSNO, as suggested by recent studies, thus explaining the findings of the present study.

**Keywords:** Nitrite. S-nitrosothiols. Hypertension. L-NAME.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

### FIGURAS:

<b>Figura 1</b> – Sinalização vascular do óxido nítrico na saúde e na doença.....	21
<b>Figura 2</b> – Via NOS-NO e alvos terapêuticos.....	23
<b>Figura 3</b> – Via NOS-NO nas doenças do leito vascular.....	28
<b>Figura 4</b> – Ciclo do nitrito e nitrato enterosalivar.....	32
<b>Figura 5</b> – Nitrosação da proteína quinase C.....	38
<b>Figura 6</b> – Efeitos do tratamento com nitrito sobre a pressão arterial média em animais com Hipertensão L-NAME.....	47
<b>Figura 7</b> – Efeitos do tratamento com SNAC sobre a pressão arterial média em animais com Hipertensão L-NAME.....	49
<b>Figura 8</b> – Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre a pressão arterial média em animais com Hipertensão L-NAME.....	51
<b>Figura 9</b> – Efeitos do tratamento com nitrito sobre a pressão arterial sistólica em animais com Hipertensão L-NAME.....	53
<b>Figura 10</b> – Efeitos do tratamento com SNAC sobre a pressão arterial sistólica em animais com Hipertensão L-NAME.....	55
<b>Figura 11</b> – Efeitos do tratamento com nitrito sobre a frequência cardíaca (FC) em animais com Hipertensão L-NAME.....	57
<b>Figura 12</b> – Efeitos do tratamento com SNAC sobre a frequência cardíaca em animais com Hipertensão L-NAME.....	59

<b>Figura 13</b> – Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações plasmáticas de nitrito em animais com Hipertensão L-NAME.....	61
<b>Figura 14</b> – Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações plasmáticas da SNAC em animais com Hipertensão L-NAME.....	63
<b>Figura 15</b> – Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre o potencial antioxidante reativo e total (TRAP) em animais com Hipertensão L-NAME.....	65
<b>Figura 16</b> – Relação percentual das concentrações teciduais aórtica de proteínas nitrosadas em ratos tratados com nitrito e SNAC e hipertensão L-NAME.....	67
<b>Figura 17</b> - Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no tecido aórtico em animais com Hipertensão L-NAME.....	69
<b>Figura 18</b> – Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no tecido aórtico em animais com Hipertensão L-NAME.....	71
<b>Figura 19</b> – Avaliação comparativa do tratamento com nitrito e SNAC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio vascular (EROs) por meio do DHE em animais com hipertensão L-NAME.....	73
<b>Figura 20</b> – Avaliação da produção de EROs dependente de NADPH vascular em ratos com hipertensão L-NAME tratados com Nitrito e SNAC.....	75

**Figura 21** – Avaliação dos níveis teciduais de cGMP em ratos com hipertensão L-NAME tratados com Nitrito e SNAC.....77

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 Hipertensão Arterial Sistêmica.....	18
1.2 Regulação da Pressão arterial.....	19
1.3 Biologia Cardiovascular do óxido nítrico.....	22
1.4 Papel do NO nas doenças cardiovasculares.....	26
1.5 Efeitos farmacológicos no sistema cardiovascular da via $\text{NO}_3^-$ / $\text{NO}_2^-$ / NO e RSNO.....	28
1.6 Tipos de nitrosotíóis e seus efeitos S-nitrosantes no sistema cardiovascular.....	33
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 Abordagem experimental.....	41
3.2 Avaliações hemodinâmicas dos animais acordados.....	41
3.3 Coleta e homogeneização de tecidos.....	41
3.4 Determinação das concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato e espécies nitrosadas.....	42
3.5 Avaliação da nitrosação proteica.....	43
3.6 Avaliação do potencial antioxidante reativo e total (TRAP).....	43
3.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio vascular (EROs).....	43
3.8 Medição da produção de EROs dependente de NADPH vascular.....	44
3.9 Medição dos níveis teciduais de cGMP na aorta.....	45
3.10 Análise estatística.....	45
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
4.1 Efeitos do tratamento com nitrito sobre a pressão arterial média em animais com Hipertensão L-NAME.....	46
4.2 Efeitos do tratamento com SNAC sobre a pressão arterial média em animais com Hipertensão L-NAME.....	48
4.3 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre a pressão arterial média em animais com Hipertensão L-NAME.....	50
4.4 Efeitos do tratamento com nitrito sobre a pressão arterial sistólica em animais com Hipertensão L-NAME.....	52
4.5 Efeitos do tratamento com SNAC sobre a pressão arterial sistólica em animais com Hipertensão L-NAME.....	54
4.6 Efeitos do tratamento com nitrito sobre a frequência cardíaca (FC) em animais com Hipertensão L-NAME.....	56



4.7 Efeitos do tratamento com SNAC sobre a frequência cardíaca em animais com Hipertensão L-NAME.....	58
4.8 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações plasmáticas de nitrito em animais com Hipertensão L-NAME.....	60
4.9 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações plasmáticas da SNAC em animais com Hipertensão L-NAME.....	62
4.10 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre o potencial antioxidante reativo e total (TRAP) em animais com Hipertensão L-NAME.....	64
4.11 Relação percentual das concentrações teciduais aórtica de proteínas nitrosadas em ratos tratados com nitrito e SNAC e hipertensão L-NAME.....	66
4.12 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no tecido aórtico em animais com Hipertensão L-NAME.....	68
4.13 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no tecido aórtico em animais com Hipertensão L-NAME.....	70
4.14 Avaliação comparativa do tratamento com nitrito e SNAC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio vascular (EROs) por meio do DHE em animais com hipertensão L-NAME.....	72
4.15 Avaliação da produção de EROs dependente de NADPH vascular em ratos com hipertensão L-NAME tratados com Nitrito e SNAC.....	74
4.16 Avaliação dos níveis teciduais de cGMP em ratos com hipertensão L-NAME tratados com Nitrito e SNAC.....	76
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1. Hipertensão Arterial Sistêmica

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é um problema de saúde pública relevante no mundo inteiro, uma vez que tem desenvolvimento silencioso e lento e tem origem multifatorial. Além disso, a HAS oferece um fator de risco gigantesco ao sistema cardiovascular e conseqüentemente a todos os órgãos que o coração bombeia sangue (TM, 2011). A prevalência da HAS é proporcionalmente ligada ao avanço da idade, combinados com o surgimento de fatores comuns nessa idade. Além disso, a HAS age como fator de risco relevante para o surgimento de novas doenças cardiovasculares com maior severidade, tais como insuficiência cardíaca, doença renal crônica, aneurisma, infarto e (DC) (GOSSE et al., 2012; LABARTHE; DUNBAR, 2012). Estudos anteriores mostraram que 45% das mortes por doença cardíaca e 51% das mortes por acidente vascular cerebral (AVC), minimamente, foram relacionadas à HAS (SCHULTZ; LI, 2007; ZUCKER; PATEL; SCHULTZ, 2012), o que caracteriza a HAS como grave problema de saúde pública. Conforme os dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS), em adultos com 18 anos ou mais, a incidência de HAS foi evidenciada em 24 % dos homens e 20 % das mulheres do mundo em 2015, totalizando 1,13 bilhões de pessoas acometidas pela HAS, apontando que houve uma elevação abrupta na quantidade de pessoas com o distúrbio nesse período, dado que em 1975 a prevalência de pessoas com HAS era de 594 milhões (ZHOU et al., 2017).

A HAS é considerada um dos mais relevantes fatores de risco para o desencadeamento das desordens cardiovasculares, podendo ser citados como exemplo, 40% das mortes provocadas por AVCs e 25% de DC. Para o diagnóstico da

HAS, além dos níveis de tensão, devem ser levados em conta os fatores de risco, os danos aos órgãos-alvo e as comorbidades presentes (BENJAMIN et al., 2018). Ademais, a HAS é caracterizada como uma doença assintomática, contudo, eventualmente, pode se mostrar sintomático, como a cefaleia pela manhã localização na região occipital, tonturas, tinido, palpitações e desconforto precordial. Além da elevação da Pressão arterial (PA) evidente na HAS, é visto também haver outras mudanças na atividade fisiológica, onde se destaca a disfunção autonômica, representada pela elevação da atividade simpaticomimética e parassimpática diminuída, o que leva a desregulação da PA e de outras funções fisiológicas, como frequência cardíaca (FC) e resistência vascular (GRASSI; MARK; ESLER, 2015; MANCIA; GRASSI, 2014).

## **1.2 Regulação da Pressão Arterial**

Com isso, diversos mecanismos participam da regulação da PA, dentre eles o controle da PA momento a momento se dá por meio de projeções nervosas de controle central dos barorreflexos por duas vias neurais: a parassimpática-excitatória e a simpática-inibitória. O controle da PA a longo prazo é realizado pelo sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA)(WADEI; TEXTOR, 2012), responsável por modular funcionalidades no organismo importantes para a preservação da PA, como equilíbrio hídrico e de Sódio (Na<sup>+</sup>) (CABANDUGAMA; GARDNER; SOWERS, 2017), o que influi na homeostase do balanço sal/água e do tônus vascular (MIRABITO COLAFELLA; BOVÉE; DANSER, 2019). Essa regulação acontece por meio de quatro componentes: a renina, Inibidores da conversão de angiotensina (IECA), os antagonistas dos receptores de angiotensina (AT2) e o angiotensinogênio (AGT) (TE RIET et al., 2015). Sumariamente, a secreção de renina é estimulada e converte o AGT em angiotensina

I (AT1) e, conseqüentemente, é convertido em angiotensina II, gerando eventos regulatórios da PA (WILKINSON-BERKA; AGROTIS; DELIYANTI, 2012).

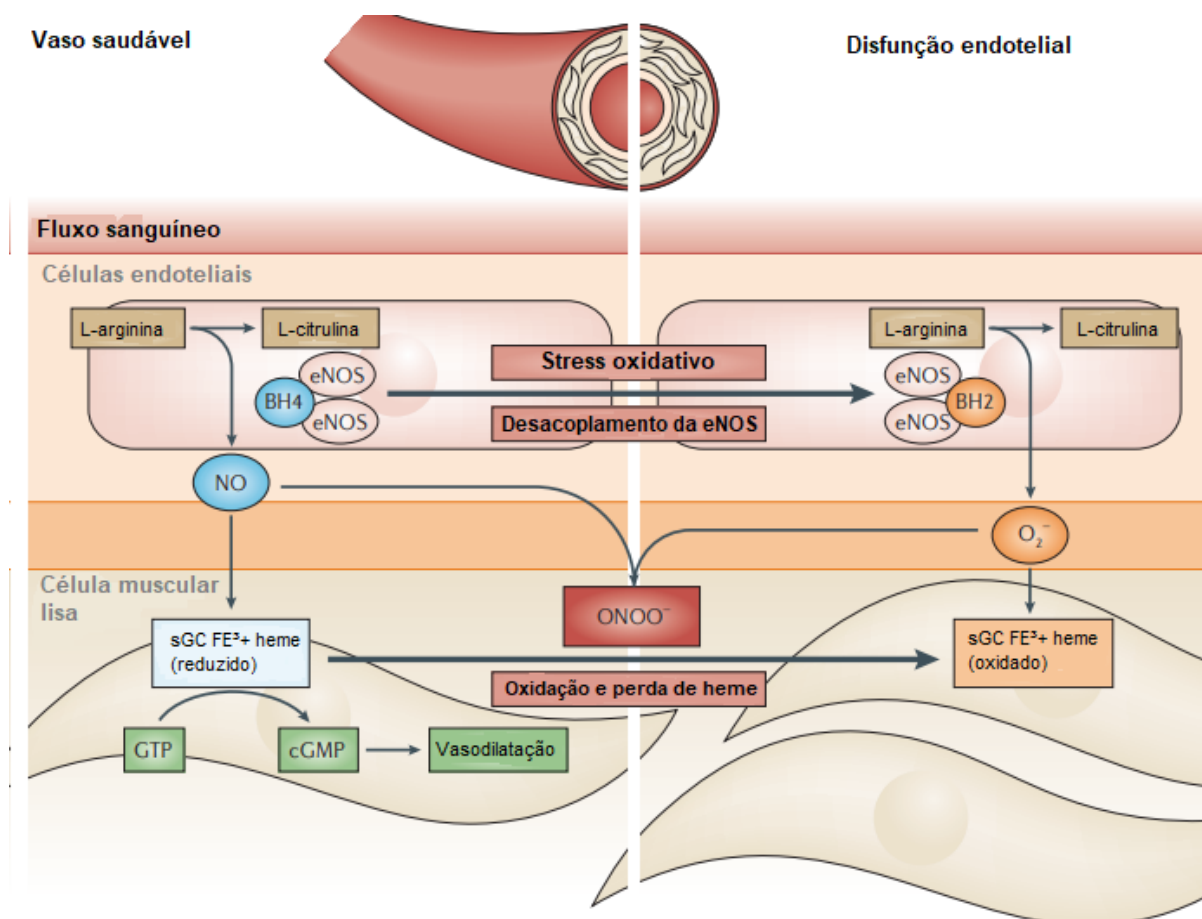
Dentre os mecanismos que participam da regulação da PA, destacamos a produção de Óxido nítrico (NO), principal componente do músculo liso vascular (MLV) e responsável pelo controle do tônus vascular, participando essencialmente da regulação da PA (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). O NO exerce dilatação dos vasos teciduais em decorrência da elevação do fluxo sanguíneo, mecanismo essencial para desencadear secundariamente a autorregulação, uma vez que as células endoteliais envolvidas no tecido arterial contribuem para produção de NO, e então relaxa o vaso, o que reduz a PA (NAVAR, 1997). Em contrapartida, na HAS, há deficiência na síntese de NO, culminando em uma desregulação no tônus vascular, provocada pela disfunção endotelial. O endotélio vascular responde à diversos estímulos e sintetiza e secreta uma grande quantidade de compostos com atividade biológica e com capacidade de regular ou inibir os efeitos de muitas substâncias liberadas pelo endotélio vascular (GROSS; AIRD, 2000; JELANI et al., 2015). Fisiologicamente, essas substâncias agem modulando a camada média vascular, formada por MLV, onde acontece a vasodilatação e/ou vasoconstrição, regulando assim, a distensão vascular e alterações na sua resistência (LOHMEIER et al., 2004; TOUYZ et al., 2018) O endotélio libera substâncias com respostas diferentes, isto é, efeitos relaxantes como os produzidos pelo NO (TOUSOULIS et al., 2012)(CYR et al., 2020) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (MANDRAS et al., 2021); e contráteis como Angiotensina II(DENNIS LEO et al., 2015), Espécies reativas de oxigênio (EROs) (ECKERS; ALTSCHMIED; HAENDELER, 2012) e endotelina-1(DINARTI et al., 2020).

Um dos mecanismos em que o relaxamento acontece é mediado pelos canais para K<sup>+</sup>, uma vez que são ativados e ficam abertos, ocorre o efluxo de K<sup>+</sup>, culminando

na hiperpolarização da membrana (KÖHLER; OLIVÁN-VIGUERA; WULFF, 2016). Em paralelo, os canais para  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes são fechados, resultante da sua ligação à calmodulina ter sido reduzida, impedindo que a fosforilação da miosina quinase de cadeia leve aconteça e ocorra o vasorrelaxamento (SATIN; SCHRODER; CRUMP, 2011)(AHERN; SATIN, 2019).

O NO medeia o relaxamento do MLV ativando diretamente o grupamento heme da guanilil ciclase (GC) ou adenilil ciclase (AC), estimulando à formação da guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) (CHILDERS; GARCIN, 2018) e adenosina de monofosfato cíclica (AMPc) (SCHEIB et al., 2018), respectivamente. A estimulação da GMPc leva à ativação da proteína quinase G (PKG) (BARRETTO-DE-SOUZA et al., 2018; SELLAK et al., 2013), bem como a estimulação de AMPc leva à ativação da proteína quinase A (PKA) (SURYAVANSHI et al., 2018). Estas duas proteínas uma vez que ativadas, promovem inibição formação de inositol trifosfato (IP3), levando a captura de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico e estimulam a atividade enzimática da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase da membrana e do retículo sarcoplasmático, bem como a abertura dos canais para  $\text{K}^+$ , culminando na hiperpolarização e diminuição das concentrações de cálcio intracelular, o que resulta no relaxamento muscular (AHERN; SATIN, 2019; FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018)

**Figura 01.** Sinalização vascular do óxido nítrico na saúde e na doença



**Fonte:** Lundberg, J.O; Gladwin, M.T; Weitzberg, E, 2015.

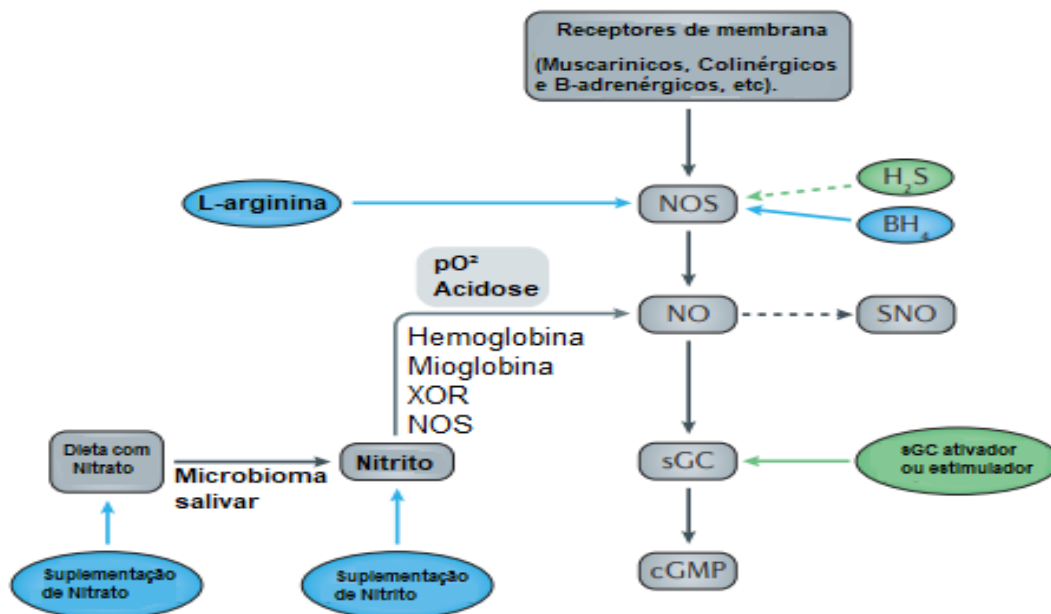
### 1.3 Biologia cardiovascular do Óxido nítrico

A formação de NO ocorre por diferentes tipos celulares por três isoformas da Óxido nítrico sintase (NOS): Óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e Óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012). Em sua totalidade, as isoformas utilizam o aminoácido L-arginina e oxigênio associado a diversos cofatores, como por exemplo, a NADPH e tetrahydrobiopterina (BH4) (GONÇALVES; JASIULIONIS; DE MELO, 2021), por meio de reações de transferências de elétrons dependente de oxigênio, culminando em quantidades equimolares de NO e L-citrulina (KWON et al., 1990).

A geração constante de NO acontece por meio das NOS constitutivas, isto é, a nNOS e a eNOS, que são codificadas por NOS1 e NOS3, respectivamente (CARNICER et al., 2013; IDIGO et al., 2012). Ambas isoformas formam frações moderadas de NO, que se relaciona aos diversos eventos fisiológicos, por exemplo, a eNOS presente no endotélio vascular, no qual o NO exerce função primordial na modulação do tônus vascular e na preservação da estrutura do endotélio (FARAH et al., 2017). A ação da eNOS é controlada em geral pelos níveis elevados de cálcio liberado do meio intracelular, pois ativam a calmodulina e liga-se à eNOS e favorece o fluxo de NADPH (STUEHR et al., 2004).

Além disso, o cofator BH<sub>4</sub>, dependente das condições redox, tem função essencial no controle da ação da eNOS, proporcionando estabilidade a estrutura da eNOS, bem como a ligação da L-arginina ao seu grupo heme catalítico (HILGERS et al., 2017). Concomitante ao processo de estresse inflamatório e oxidativo, o superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) é formado através da eNOS desacoplada e da estimulação de enzimas oxidases, como NADPH oxidases (NOXs) (GRAY; SHAH; SMYRNIAS, 2019) e Xantina oxidorreductase (XOR), com potencial de gerar reações com NO e formar peróxidos (PELELI et al., 2017). Estas condições retratam um processo patológico significativo relacionado à redução crescente da disponibilidade de NO vascular. A isoforma induzível está presente nos macrófagos, assim como também em células neuronais, epiteliais de vias aéreas e hepatócitos (CINELLI et al., 2020).

### **Figura 02:** Via NOS-NO e alvos terapêuticos



Fonte: Farah et al., 2018.

A sinalização fisiológica pelo NO é guiado por sua característica de radical livre e reatividade elevada com outros radicais e metais de transição. As principais vias de sinalização de NO acontecem por meio de reações envolvendo EROs (SIES; JONES, 2020). A velocidade em que as reações do NO ocorrem com grupamentos contendo heme e radicais prediz que a estimulação da sGC e reações entre radicais necessita somente concentrações molares de NO (KEMP-HARPER et al., 2021). Em contrapartida, reações que oxidam NO para gerar Trióxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) exigem concentrações superiores de estresse oxidativo ou nitrosativo (TSIKAS; BÖHMER, 2017). Em todas as circunstâncias, os principais cofatores finais oxidativos do NO em sistemas biológicos são nitrato e nitrito (MÖLLER et al., 2019). A complexidade da função endotelial vêm sendo estudada em modelos animais,



utilizados visando-se reproduzir a disfunção endotelial, proporcionando assim funcionamento do sistema em situações de biodisponibilidade de NO alta ou diminuída (CYR et al., 2020; TOUSOULIS et al., 2012).

No entanto, a formação de NO acontece por outra via independente de oxigênio. Porém essa nova via foi descrita apenas em 1994, onde foi observado a formação intragástrica de NO, onde esse mecanismo não necessita de atividade das sintases sobre o NO, pois ocorre por meio de ações redutase sobre o nitrato e nitrito na circulação enterosalivar (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). O nitrato proveniente da alimentação tem absorção rápida no trato gastrointestinal superior e, em seguida, ao chegar na circulação sanguínea, ele une-se ao nitrato endógeno resultante da oxidação de NO das enzimas NOS. Portanto, após ingestão de alimentos ricos em nitrato, como espinafre e beterraba, as concentrações plasmáticas atingem níveis elevados e sustentados por horas. Como esperado, as concentrações plasmáticas de nitrito se elevam depois de ingerir nitrato dietético. Ainda que uma quantidade significativa de nitrato seja eliminado pelos rins, uma fração inferior é absorvida pelas glândulas salivares e retorna à saliva (LC et al., 2016).

Na cavidade oral existem bactérias comensais que utilizam nitrato salivar como substrato para reduzi-lo em nitrito por meio das redutases de nitrato. Após as concentrações salivares chegarem no estômago com pH baixo, o nitrito em sua maioria sofre protonação e forma ácido nitroso (HNO), além de NO e outros óxidos de nitrogênio após reações de decomposição do produto inicial (KEMP-HARPER et al., 2021; MÖLLER et al., 2019). O NO gástrico também exerce uma função fisiológica sobre a modulação do fluxo sanguíneo e na produção de muco.

Além da formação gástrica de NO a partir do nitrito deglutido, existem também enzimas e outras proteínas com atividade nitrito-redutase (formando NO a partir do

nitrito). Aqui destacamos a hemoglobina e a mioglobina, que convertem nitrito em NO, contudo, as proteínas precisam se encontrar em estados desoxigenados, para não oxidar o NO. Dentre as conversões enzimáticas mais relevantes que formam NO, destaca-se a XOR, que também exerce ação nitrito redutase (AMARAL et al., 2013; DAMACENA-ANGELIS et al., 2017). Além do papel metabólico de degradação de purinas, a XOR reduz nitrito a NO, podendo contribuir para os efeitos hipotensivos do nitrito. Com menor potencial, a aldeído oxidase também exerce ação nitrito redutase (PARDUE et al., 2020).

#### **1.4 Papel do NO nas doenças cardiovasculares**

O papel do NO nas doenças cardiovasculares é atrelado ao fato do NO possuir um fator protetor cardíaco. Por este motivo, a deficiência de NO provoca complicações cardíacas como a HAS, assim como na aterosclerose, eventos tromboembólicos e DC (INFANTE; COSTA; NAPOLI, 2021). Desse modo, muitas doenças, como as dislipidemias, a HAS e a aterosclerose exibem alterações da função endotelial. Por isso, fatores contribuintes para a ocorrência da disfunção endotelial são determinados por uma formação deficiente ou disponibilidade baixa de NO (ROCHETTE et al., 2013).

As células endoteliais produzem NO que exercem função imprescindível na proteção à aterosclerose, inibindo a oxidação causada em moléculas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), impossibilitando a agregação de plaquetas (GIMBRONE; GARCÍA-CARDEÑA, 2016). A maquinaria do NO impede a geração de LDL-ox devido à sua atividade antioxidante, vetando a produção de radicais livres, como ânions superóxidos, que possibilitam a oxidação dessa molécula aterosclerótica (LEI et al., 2010).

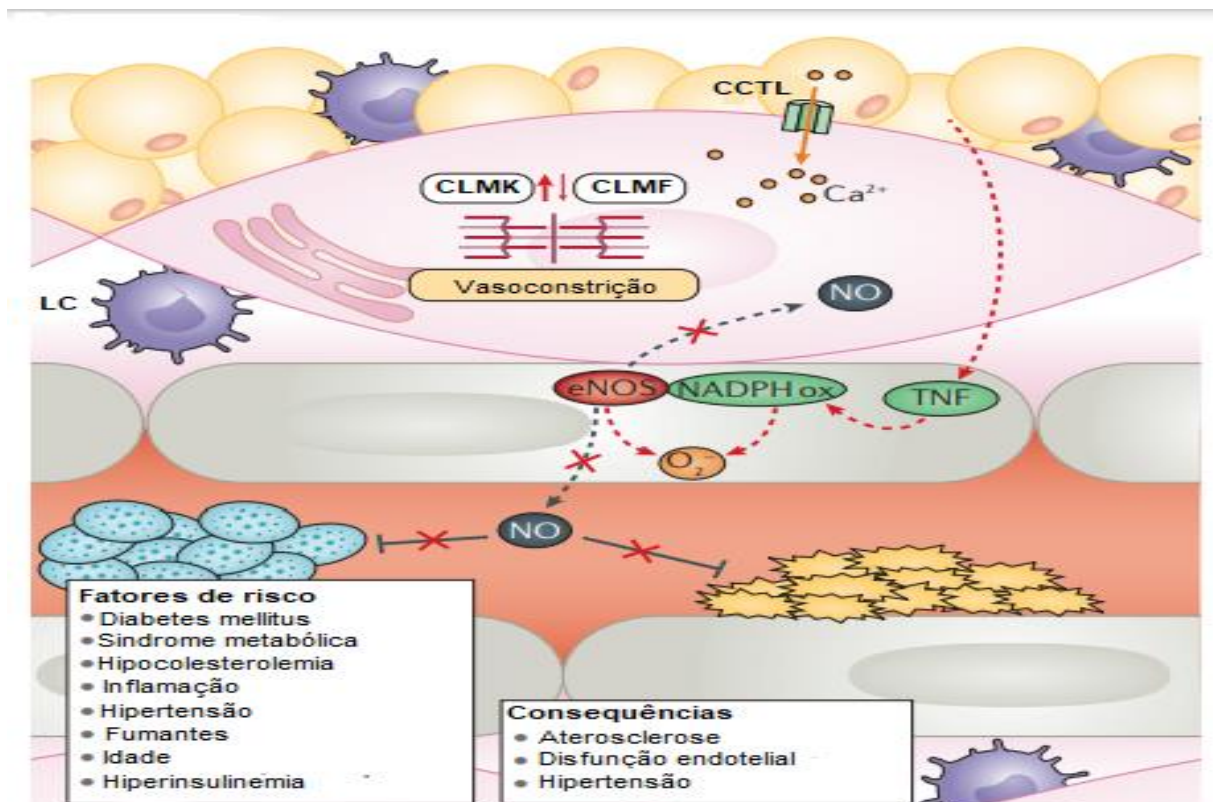
No sistema cardíaco, a diminuição do fluxo sanguíneo vascular das coronárias pode culminar em deficiência na função miocárdica e insuficiência cardíaca crônica. No entanto, a melhoria da função lipídica devolve a formação e biodisponibilidade de NO ao fisiológico, fazendo com que a diminuição das concentrações plasmáticas do colesterol de baixa densidade e a elevação dos níveis do colesterol de alta densidade responsável pela logística reversa do LDL, resultando em condições positivas para o organismo e tratamento da aterosclerose (PHILLIPS et al., 2009).

Sobre a HAS, a inibição da NOS por análogos da L-arginina, como por exemplo, o L-Nitroarginina Metilester (L-NAME), diminui a produção de NO e resulta na HAS de forma proporcional a dose usada. A inibição da produção de NO, além da PA, é seguida por mudanças na função e estrutura renal e do coração. Este último sofre um desequilíbrio cardíaco que incluem em grande maioria, a hipertrofia dos ventrículos, além de gerar morte celular e fibrose (BROSNAN; BROSNAN, 2004). O músculo cardíaco necrosado origina um tecido conjuntivo cicatrizante do tipo fibrótico, podendo levar a um comprometimento severo ao miócito (GIERHARDT et al., 2021). Desse modo, os efeitos do NO exerce função relevante ao sistema cardiovascular, especialmente, na regulação da PA.

Além disso, a disfunção endotelial dependente de NO é reconhecida como um ponto de partida para a aterogênese e antecede a progressão da HAS, contudo, pode-se também resultar do estresse oxidativo por meio da inibição oxidativa ao acoplamento do NO ou EROs (INCALZA et al., 2018), podendo ser reconvertido pela melhora na biodisponibilidade de BH4 na HAS (CYR et al., 2020; DIKALOVA et al., 2020). Diversas abordagens tem o potencial de reverter a disfunção da eNOS, conforme a compreensão dos mecanismos envolvidos no controle dessa enzima. As abordagens incluem a diminuição da caveolina (ZHANG et al., 2020), amenizando

dessa forma, sua inibição alostérica negativa, assim como sua composição de NOX em caveolae, o que eleva as concentrações de sirtuína e o crescimento da expressão do seu coativador 1-alfa do receptor estimulado por proliferação de EROs (SHAMSALDEEN; LIONE; BENHAM, 2020). A disfunção endotelial dependente de eNOS pode ser potencializada pela iNOS, o que gera endocitose e destruição dos lisossomos de proteína quinase ligada à integrina (ILK)(GONG et al., 2014; KUMAR; MANI, 2021).

**Figura 03.** Via NOS-NO nas doenças do leito vascular



**Fonte:** Farah; Michel; Balligand, 2018.

## 1.5 Efeitos farmacológicos no sistema cardiovascular da via $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^- / \text{NO}$ e RSNO

Nas últimas décadas, observou-se que ativar o ciclo enterosalivar pela administração de nitrato ou nitrito pode causar efeitos farmacológicos relevantes em doenças cardiovasculares. Estas drogas podem funcionar, basicamente, por mecanismos que envolvem nitrosação proteica, mediada por nitrosotióis (RSNO) (CAUWELS, 2007). Apesar dos efeitos vasodilatadores de nitrito exógeno serem conhecidos há muito tempo, o NO demonstra um crescimento no fluxo sanguíneo, que já foi relacionado também a elevação de nitrito plasmático, evidenciando que o nitrito tem potencial para desempenhar a função de transporte interno estável e transdutor de efeitos bioativos similares ao NO direto na circulação (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018). Por este motivo, uma redução relevante na PA consequente a ingestão de nitrato, se correlaciona a uma elevação nas concentrações plasmáticas de nitrito. O mecanismo de manutenção das integridades das estruturas celulares por intervenção do nitrito, aparentemente, ocorre por meio de mecanismos NO-dependente (KAPIL et al., 2015).

Desde o início, a função fisiológica do nitrito ou nitrato inorgânico na mediação das respostas biológicas do NO foi rapidamente tido como molécula importante na fisiologia do NO (BENJAMIN; VANE, 1996; TANNENBAUM; CORREA, 1985). Nos últimos anos, essa relação de Nitrato-Nitrito-NO foi amplamente estudada (LIU et al., 2020; LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008; OMAR et al., 2016) Foi mostrado que nitrato/nitrito atuam como reservatório essencial para o NO e caracterizou-se como acontece especificamente a atividade nitrito-redutase para formar o NO e, assim, elevar a biodisponibilidade independente da via clássica da NOS (GLADWIN et al., 2005). Assim, a ingestão de nitrato e nitrito pode modificar notavelmente a PA. Isto pode ser atingido por meio do consumo de alimentos enriquecidos em nitrato (HORTON; SCHIEFER, 2019).

A redução de nitrito a NO acontece em muitos tecidos por meio de mecanismos distintos, porém, a avaliação preliminar e entendimento de uma redução de um elétron do ânion nitrito ocorreu pela identificação da metaloproteína desoxihemoglobina com ação redutase de nitrito (COSBY et al., 2003). Desse modo, está claro que a formação de NO por meio da redução de nitrito pela hemoglobina tem papel importante no tônus vascular ex vivo (CASTIGLIONE et al., 2012).

Estudos recentes demonstraram que a suplementação oral de nitrato pode conceder efeito protetor contra lesão de isquemia e reperfusão dos tecidos (BRYAN et al., 2007; CUI et al., 2020; ZHU et al., 2011). Além disso, a biodisponibilidade do NO controla a angiogênese mediada pela isquemia e o nitrito estimula a angiogênese em tecidos isquêmicos e, assim, estimula o aumento de vasos, o que representa uma forma ideal para tratar a doença vascular isquêmica crônica. O nitrato sofre distribuição tecidual e tem  $t^{1/2}$  próxima à 5h (LV et al., 2020). Curiosamente, a via da L-arginina-NOS para a geração de NO é dependente de oxigênio, por outro lado a geração de NO por meio de redução de nitrato e nitrito acontece em concentrações inferiores de oxigênio. Assim, a via nitrato-nitrito-NO pode ser considerada como um sistema de backup para garantir concentrações capazes de NO ao decorrer das situações de isquemia (LUNDBERG et al., 2009).

Se o nitrato é convertido em nitrito e NO, podemos acreditar que o vasorrelaxamento através dele atenuaria a os valores pressóricos(LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015). Por este motivo, alguns estudos mostram que a suplementação de extrato de beterraba, rico em nitrato, é capaz de potencializar a diminuição dos parâmetros de PA, em detrimento do aumento na formação de NO e ativação de cGMP (COLES; CLIFTON, 2012; REMINGTON; WINTERS, 2019; TROPEA et al., 2020).

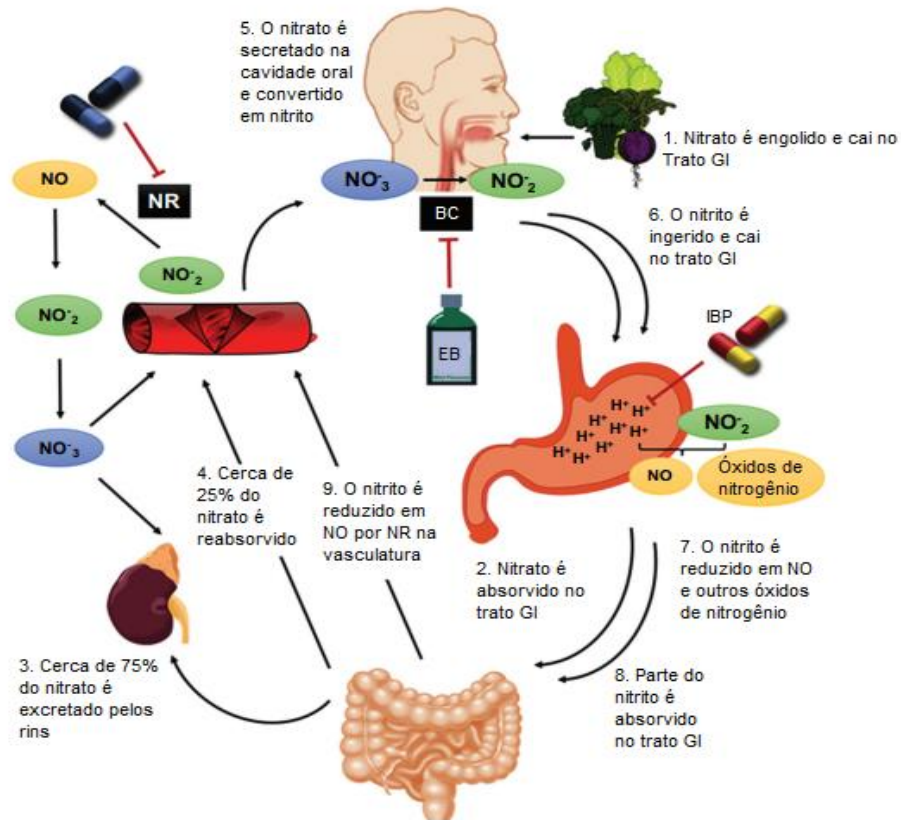
O nitrato ainda exerce a função de depósito de NO nos tecidos, o que garante alta biodisponibilidade (PELELI et al., 2020). Em especial, a suplementação de nitrato eleva a formação de RSNO e produtos de nitrosação bioativa, com potencial de mediar efeitos que explicam a redução da PA em níveis mais expressivos (ABU-ALGHAYTH et al., 2021). Assim, os efeitos reportados do nitrito no tônus vascular elevam a perspectiva de que a suplementação com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NO}_2^-$  tenha utilidade terapêutica na HAS. Estudos recentes realizados em humanos com HAS indicam que possivelmente o nitrito aja como vasodilatador em pacientes com esta condição (HUGHAN et al., 2020; LING et al., 2018a; LU et al., 2008).

Estudos experimentais com  $\text{NO}_2^-$  mostraram uma ressuscitação cardiopulmonar reestabelece as concentrações de NO tecidual e vascular, sendo associado a efeitos benéficos na função cardíaca (MINAMISHIMA et al., 2009, 2011). Contudo, os mecanismos de NO independentes de cGMP e relacionados à S-nitrosação de proteínas são numerosas e merecem ser estudados (STOMBERSKI; HESS; STAMLER, 2019). As proteínas que sofrem S-nitrosação estão envolvidas em muitos mecanismos biológicos, como a contratilidade muscular (BELCASTRO et al., 2017), apoptose (FENG et al., 2013) e circulação sanguínea (JONES et al., 2021). O reconhecimento da S-nitrosação como mecanismo de sinalização celular necessita de uma regulação espacial e temporal da formação de RSNO, para que não seja considerado somente como um subproduto do estresse nitrosativo. O NO demonstra reatividade indefinida no que diz respeito aos tióis *in vitro*, porém os alvos *in vivo* nitrosados possuem mais seletividade, o que sugere que existem mecanismos celulares que regulam a geração de RSNO proteicos (KAPIL et al., 2014; KAPIL; WEBB; AHLUWALIA, 2010)

Após os RSNO serem formados, geralmente são deslocados para tióis livres através de reações de transnitrosação (reações reversíveis de segunda ordem envolvendo um RSNO e um tiol livre) (CHEN et al., 2002). A transnitrosação não abrange o NO livre ou ions nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ) como mediador. Em contraste, a transnitrosação sucede a via de ataque nucleofílico do nitrogênio do RSNO por um tiolato, o que gera um estado transitório do dissulfeto de nitroxila ou mediador (BRONIEWSKA; HOGG, 2012; GAUCHER et al., 2013). A nitrosação de proteínas é representada pela adição de um grupamento NO em centros ativos, a exemplo da fosforilação e a glicosilação, que consiste na modificação translacional de proteínas específicas, elevando as concentrações plasmáticas de RSNO, resultando em sinalização intracelular e modulação de atividade enzimáticas (WYNIA-SMITH; SMITH, 2017). Os RSNO funcionam como doadores de NO e podem resultar no aumento da biodisponibilidade de NO, resultando em efeitos cardiovasculares, como a diminuição da PA por regular negativamente o tônus vascular (LIU et al., 2018).

**Figura 04.** Ciclo do nitrito e nitrato enterosalivar





Fonte: Oliveira-Paula & Tanus-Santos, 2019.

## 1.6 Tipos de nitrosotíóis e seus efeitos S-nitrosantes no sistema cardiovascular

O NO é caracterizado por uma meia-vida ( $t_{1/2}$ ) muito curta, por isso é definida como pró-droga. No entanto, os doadores clássicos de NO exibem algumas deficiências como a liberação rápida de NO, distribuição relativamente pobre para o MLV, estresse oxidativo induzido e uma formação do fenômeno de tolerância (CHATTERJI; SENGUPTA, 2021). A resolução para estes problemas se resume no desenvolvimento de doadores de NO por meio de RSNO fisiológicos, como S-nitrosoalbumina (AlbNO) e o S-nitrosoglutathiona (GSNO) sendo os principais, e o S-Nitroso N-Acetilcisteína (SNAC) e o S-nitroso N-acetilpenicilamina como os principais exógenos (GAUCHER et al., 2013).

Alguns dos RSNO endógenos possuem alto peso molecular, como o AlbNO e o S-nitrosohemoglobina. Por outro lado, alguns possuem peso molecular baixo, como o GSNO e funcionam como um recipiente fisiológico de NO, de modo que se tornam potenciais doadores de NO para doenças cardiovasculares e tratamento de doenças (CHOI; TOSTES; WEBB, 2011). Pelo fato de a albumina ser a proteína plasmática mais prevalente, não é novidade que o AlbNO seja um dos principais RSNO e recipiente de NO ideal para a circulação e transporte de NO no vaso (GFP et al., 2019).

As proteínas nitrosadas, incluindo o AlbNO circulante são equilibrados por meio de reações de transnitrosação espontânea com a glutathiona reduzida (GSH), resultando no GSNO, isto é, em peso molecular reduzido e tradutor da bioatividade do NO (KUMAR et al., 2018). A denitrosação de RSNO acontece por meio de reações não enzimáticas por transnitrosação rápida no sangue entre a molécula da Albumina e GSNO ou GSH (JOURD'HEUIL et al., 2010). Contudo, existem diferenças na taxa de denitrosação de RSNO individuais, o que implica no desenvolvimento de fatores estruturais complementares. Essa transferência pode acontecer de forma natural também, sugerindo a formação de tióis celulares na membrana. Sabe-se que os RSNO vasoativos são formados *in vivo* pela via da L-arginina (LIU et al., 2018) e pelo ciclo enterosalivar (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008), embora as concentrações reais dessas espécies no sangue sejam discutidas. Como os RSNO possuem estabilidade considerável, liberam NO uma vez que sofrem ação de metais de transição ou por agentes redutores. Desse jeito, regulam a atividade do NO no meio intra e extracelular e elevam a amplitude dos seus efeitos. Após o RSNO ser formado e levado a circulação, o NO é liberado através de mecanismos intrínsecos ou por transferência direta do nitrosil do  $\text{NO}^+$  para um grupo tiol através da reação de transnitrosação, gerando ao RSNO um estado dinâmico *in vivo* (VANIN, 2019). A S-

nitroação dos resíduos cis e livres de proteínas são responsáveis por controlar as ações de diversos fatores moduladores e de enzimas que representam um evento de sinalização disseminada. A adição de NO aos grupos sulfidrilas resulta na formação da ligação nitrosotiol (S-NO) (OLIVEIRA-PAULA; TANUS-SANTOS, 2018).

A estabilidade da ligação pelo nitrosotiol depende das diferenças de graus na formação da ligação S–N primária (MEYER et al., 2016). Esta ligação tem estabilidade menor em relação a uma ligação S–N terciária. A  $t^{1/2}$  é um fator qualitativo eminente que indica o tempo necessário para o valor inicial de uma molécula ser reduzida ou cair à metade. A  $t^{1/2}$  está intrinsecamente ligada à estabilidade das biomoléculas (HORNYK et al., 2012). Os RSNO formados endogenamente devem ser estáveis aceitavelmente para promover a resposta bioativa. O status de RSNO, no entanto, depende da atividade das sintases de óxido nítrico endógenas (NOSs), que repetidamente se alteram com o estado redox das mitocôndrias que acomodam um grande pool de radicais livres, como  $O_2^-$ , peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), NO e Peroxinitrito ( $OONO^-$ ) (STAMLER; LAMAS; FANG, 2001). Isso sugere um contexto claro de que os RSNO são estáveis satisfatoriamente na célula para promoverem efeitos pós transducionais proteicos (PTM) (STOMBERSKI; HESS; STAMLER, 2019).

A principal modificação no que diz respeito a funções de sinalização fisiológica é a S-nitroação, uma modificação covalente, onde um grupo derivado de NO é ligado a um Cystiol para formar um RSNO, provendo um mecanismo para sinalização (PC et al., 2006). O NO foi identificado inicialmente como o fator relaxante derivado do endotélio e mostrou promover vasodilatação por meio da ativação da guanilil ciclase e produzir o segundo mensageiro cGMP (DAWSON; DAWSON; SNYDER, 1992; ZEMBOWICZ et al., 1992). Contudo, sabe-se agora que O NO fornece grande influência biológica na nitroação da proteína S, diversos processos celulares,

incluindo o controle de atividade da sGC (CORBALÁN et al., 2002; LLORENS; JORDÁN; NAVA, 2002; REID; CHIU, 1995; WYNIA-SMITH; SMITH, 2017).

Embora haja um crescimento na função dos RSNO em meios bioativos, existe ainda dúvidas sobre como agem e se formam de forma *in vivo*. Na falta de um destinatário de elétrons, o NO é inapto de reagir com agentes imunológicos em situações livres de oxigênio, resultando em metabólitos oxidativos de NO, como o  $N_2O_3$ , por sua vez, capazes de gerar ações nitrosantes (LIU et al., 2016a; NEDOSPASOV, 2002). O NO uma vez liberado do endotélio ou oriundo do metabolismo dos nitrovasodilatadores ativa a sGC e eleva a formação de cGMP, culminando em uma cadeia de mecanismos relaxantes do MLV. Embora a função prevalente do cGMP no controle do tônus arterial, alinhando os mecanismos moleculares paralelos à vasodilatação dependente da via NO/cGMPC, mostrando ser um desafio, pois existem muitos eventos intracelulares para a vasodilatação a partir do cGMP (LIU et al., 2018). O NO e cGMPC estimulam a ação de  $Ca^{2+}$  ATPase em miócitos arteriais, além da diminuição da concentração de  $[Ca^{2+}]_i$  pela inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  por meio dos canais de  $Ca^{2+}$  voltagens dependentes. Ademais, as concentrações de cGMP aumentados pelo NO podem aumentar a atividade da  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase para gerar o vasorrelaxamento (KWAN; HUANG; YAO, 2000). Contudo, o NO também pode estimular essa enzima de forma direta, sem afetar o cGMP (LIU et al., 2016b).

O entendimento que a principal proteína receptora para cGMP no MLV é a PKG está cada vez mais claro, uma vez que a PKG é amplamente presente no MLV e entende-se que realiza uma função essencial no vasorrelaxamento (CARRIER et al., 1997). Apesar de evidências que fortalecem a função principal para PKG na regulação da reatividade vascular, a natureza dos mecanismos mediados pela fosforilação

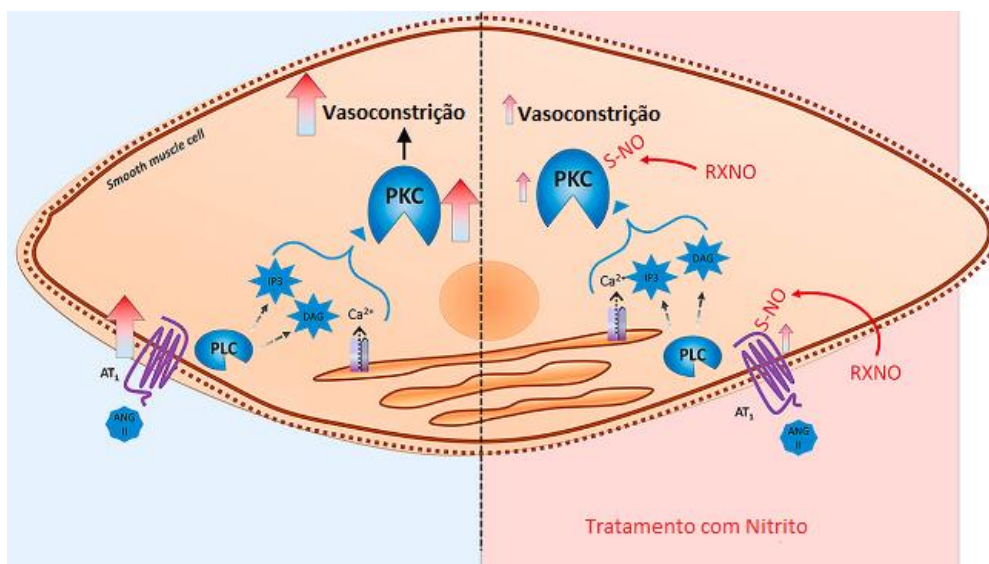
dependente de cGMP não são conhecidos em sua totalidade. A ativação da PKG suprime a sua excitação celular devido a abertura dos canais de alta condutância para  $\text{Ca}^{2++}$  e  $\text{K}^+$  voltagem dependente (BKca) (MITROKHIN et al., 2019). Como o MLV expressa diversas classes de canais de  $\text{K}^+$  em densidades distintas, o BKca, pode ser uma proteína essencial para desempenhar ação efetora ativada por vasodilatadores endógenos ou exógenos e podem gerar uma função vasodilatadora em microvasos induzido por NO (CARRIER et al., 1997).

Além disso, foi relatado que os canais de  $\text{Ca}^{2++}$  do tipo L pode ser ativado pelos doadores de NO, os RSNO, de uma forma independente do cGMP (ABI-GERGES et al., 2002). Entretanto, os RSNO aparentemente inibem os canais do tipo L que são expressos em sistemas distintos. O mecanismo inibitório abrange desde a diminuição probabilística de aberturas de canais únicos até a diminuição de sua condutância (HU et al., 1997). A S-nitrosação promove efeitos independentes de cGMP. O canal tipo L também é controlado pela via cGMP-PKG e, possivelmente, por fosforilação, levando à redução do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (SANDOVAL et al., 2017).

Foi visto que os RSNO elevam a S-nitrosação de forma mais específica por transnitrosação, agindo como doador de NO (RAFIKOVA; RAFIKOV; NUDLER, 2002). Ademais, os RSNO são transportados para o interior da célula com eficiência maior, indicando que a fonte de RSNO pode não ser apenas NO (NAGABABU; RIFKIND, 2013). A PKC é ativada uma vez que os segundos mensageiros ou agentes efetores se acoplam ao seu domínio modulatório (C1 e C2), localizados na membrana plasmática (GIORGIONE et al., 2006). A S-nitrosação modifica estes resíduos de cisteína da proteína alvo e afetar o seu domínio C1 da PKC nitrosada, culminando em ativação diminuída da PKC, assim como é conhecido que o NO reduz a atividade da PKC (LC et al., 2021). É definido que a S-nitrosação da atividade da  $\text{PKC}\alpha$ , pois a

PKC $\alpha$  é pertencente à subfamília da PKC habitual (CHOI; TOSTES; WEBB, 2011). Ela possui sítios de ligação para o Ca<sup>2+</sup> e diacilglicerol (DAG), caracterizando, desse modo, um modulador importante na transdução de sinal vascular (LENZ et al., 2002). Além disso, a PKC $\alpha$  eleva a vasoconstrição através de eventos de sensibilização ao Ca<sup>2+</sup> que, por sua vez, transporta a enzima para a membrana citosólica. Para definir a modulação de proteínas alvo por bloqueio funcional de PKC, é necessário avaliar a expressão de CPI-17 (WOODSOME et al., 2001). Esta é uma das proteínas alvo mais importantes para a PKC exercer seus efeitos contráteis do MLV. A fosforilação da CPI-17 induzida pela PKC inibe a fosfatase da MLC, gerando a desfosforilação da Cadeia leve de miosina (CLM), culminando na contração vascular (SUN et al., 2019). O aumento da S-nitrosação dessa proteína sugere a ideia de inativação pela via de sinalização da PKC, o que indica essa proteína tem função importante na sinalização da PKC e os seus efeitos constritores (ARCHER et al., 1994).

**Figura 05.** Nitrosação da Proteína quinase C



**Fonte:** Pinheiro et al., 2021.

Do exposto acima, podemos constatar, resumidamente, que vários efeitos cardiovasculares do nitrito de sódio podem ser devidos à formação de NO e de outros compostos derivados do NO, especialmente os RSNO, que são responsáveis por mecanismos nitrosativos. Entretanto, mesmo sabendo que tanto o nitrito de sódio quanto os RSNO podem ser usados como agentes farmacológicos em doenças cardiovasculares, geralmente não se leva em consideração que o uso de nitrito de sódio por via oral gera RSNO no estômago. Assim seria interessante comparar os efeitos cardiovasculares do nitrito de sódio administrado por via oral com aqueles observados após a administração de um nitrosotiol também por via oral, ambos administrados em doses equimolares. Esta avaliação permitiria comparar duas moléculas (nitrito e nitrosotiol) muito relacionadas quanto às suas capacidades de produzir efeitos farmacológicos desejáveis.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo geral deste projeto é testar a hipótese de que a S-nitroso-N-acetilcisteína, comparada em dose equimolar ao nitrito de sódio, causaria maiores reduções de pressão arterial por promover maiores aumentos nas concentrações de nitrosotióis (e não de nitrito no plasma), aumentando assim o grau de nitrosação proteica nos vasos, o que explicaria os mais intensos efeitos anti-hipertensivos do que os causados pelo nitrito de sódio.



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Abordagem experimental**

Nesta abordagem experimental foram utilizados ratos normotensos divididos em quatro grupos experimentais, que receberam: a) Veículo (água destilada); b) L-NAME 100mg/kg; c) L-NAME 100mg/kg + NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 72 μmol/kg; d) L-NAME 100mg/kg + SNAC 72 μmol/kg. Todos os tratamentos foram realizados por via oral (gavagem), uma única vez, e após dez min foram avaliados os parâmetros discutidos abaixo. O estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. Ratos wistar machos com peso entre 130g e 180g foram obtidos da colônia da USP e mantidos em períodos de 12h de luz a 25°C, com acesso livre a comida e água.

#### **3.2 Avaliações hemodinâmicas dos animais acordados**

Para realizar este experimento, os animais normotensos tratados com veículo, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ou SNAC foram submetidos à canulação da artéria femoral, o cateter é conectado a um transdutor de pressão (para aferição da PA), sendo que o sinal captado é convertido em sinal gráfico no *Biopac Systems* e então avaliado. Os animais foram avaliados acordado 4-6 horas após a cirurgia visando não ter mais efeito dos anestésicos sobre os parâmetros de pressão. Para a indução de HAS nos animais, foi feita a gavagem de L-NAME (100mg/kg V.O.; inibidor da NOS). Após 30 minutos de administração de L-NAME e com a elevação sustentada da PA, as drogas foram testadas.

#### **3.3 Coleta e homogeneização de tecidos**

Antes da coleta do tecido em cada momento, os ratos foram anestesiados com cetamina (100 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg) (MONTENEGRO et al., 2011). O sangue foi coletado em tubos contendo heparina por punção do ventrículo esquerdo e centrifugado por 4 min a 1000 × g a 4°C. O plasma foi separado, aliquotado em tubos âmbar contendo N-etilmaleimida (NEM) 10 mM e ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 2 mM (BRYAN et al., 2004) para a conservação das espécies nitrosadas. A aorta foi coletada e todas as amostras foram congeladas imediatamente e armazenadas a -80°C para posterior análise bioquímica. Para as análises bioquímicas, as aortas foram maceradas em macerador de vidro com PBS pH 7,4 com NEM (10 mM) e DTPA (2 mM) (M et al., 2002). A suspensão resultante foi centrifugada por 4 min a 3000 × g e o sobrenadante foi usado para análise bioquímica.

### **3.4 Determinação das concentrações plasmáticas de nitrito e nitrato e espécies nitrosadas**

As amostras de plasma foram analisadas pelo método de quimiluminescência através de ozônio. Resumidamente, 100 µl de amostra do plasma foram injetados no *purge vessel* (vidraria do analisador de NO que constitui de um sistema fechado, livre de qualquer interferência externa) contendo solução de iodo acidificada. O NO formado então é carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (Sievers Modelo 280 NO analyzer, Boulder, CO). Para a quantificação de espécies nitrosadas, as amostras foram previamente tratadas com sulfanilamida ácida 5% em solução de água milli-Q, na proporção de 10% do volume da amostra. Os dados obtidos foram analisados pelo programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA)(M et al., 2002; PINHEIRO et al., 2012).

### **3.5 Avaliação da nitrosação proteica**

Foram utilizadas as aortas dos animais tratados como descrito acima, além de aortas incubadas com veículo, SNAC e  $\text{NO}_2^-$  por 30 min. O total de proteínas nitrosadas foi determinado usando a técnica SNO-RAC com modificações (LC et al., 2016). Para quantificar a proporção de proteínas nitrosadas, ambos controles inputs (i) e output (o), foram corridos em gel 3,9% SDS/PAGE. A corrida foi finalizada quando as amostras alcançarem a metade do gel, e então os géis foram corados com Coomassie Blue 0,05% e as proteínas nitrosadas quantificadas usando o programa ImageJ (NIH, USA). Devido à baixa concentração de proteínas no output, o mesmo foi carregado no gel com um volume 3 vezes maior, em relação ao input. A porcentagem de nitrosação foi calculada como da seguinte forma, corrigimos o output dividindo a sua quantificação por 3. Na sequência temos que input é 100% das proteínas e calculamos quanto o output corrigido corresponde deste total, assim temos:

$$\% \text{nitrosilação} = (100 * (\text{output}/3))/\text{input}$$

### **3.6 Avaliação do potencial antioxidante reativo e total (TRAP)**

Demonstra a capacidade antioxidante não enzimática do plasma, determinada através da medida da intensidade de quimiluminescência do luminol induzida pela adição de 2, 2'-azo-bis (2-amidinopropano) (ABAP) à temperatura ambiente. Foi adicionada nas amostras de plasma a solução de reação e foram colocadas no luminômetro para serem feitas as leituras a cada 3-5 minutos durante 4-5 horas (LISSI et al., 1995).

### **3.7 Avaliação da produção de Espécies reativas de oxigênio vascular (EROs)**

Para avaliar o estresse oxidativo vascular, a produção de EROs aórtica foi medida usando dihidroetídio (DHE), que é um corante fluorescente sensível a EROs. Criossecções aórticas (5  $\mu\text{m}$  de espessura) foram incubadas com DHE (10 $\mu\text{mol/l}$ ) durante 30 min à 37°C. Os cortes foram examinados por microscopia de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, Inglaterra) em campo de visão de x400, usando excitação  $\lambda=525\text{nm}$  e emissão  $\lambda=605\text{nm}$ , detector independente de superóxido. As imagens foram quantificadas usando o software de imageJ (<http://rsbweb-nih.ez67.gov.ij/>), onde mensuramos a intensidade de fluorescência de 20 campos, conforme descrito anteriormente (OLIVEIRA-PAULA et al., 2016). Em alguns experimentos, as aortas foram pré-tratadas por 1h, ou difenil iodônio (DPI 10  $\mu\text{mol/l}$ , um inibidor de flavoproteína), ou Tiron (1 $\text{mmol/l}$ , um eliminador de superóxido).

### **3.8 Medição da produção de EROs dependente de NADPH vascular**

Foi usado um ensaio de quimiluminescência derivado de lucigenina para avaliar a produção de EROs, conforme descrito anteriormente (AMARAL et al., 2015; RIZZI et al., 2019). Resumidamente, os anéis aórticos foram transferidos para frascos de luminescência contendo 1mL de tampão Hank, pH 7.2. Após o equilíbrio, uma concentração de ciclo não redox de lucigenina (5  $\mu\text{mol/L}$ ) foi adicionada e as contagens de luminescência foram medidas continuamente por 5 min em um luminômetro de tubo único Berthold FB12 a 37°C. Depois disso,  $\beta$ -NADPH (12  $\mu\text{mol}$ ) foi adicionado automaticamente e as contagens de luminescência foram medidas por 15 min. Os sinais de fundo dos anéis aórticos foram subtraídos dos sinais acionados por  $\beta$ -NADPH e os resultados foram normalizados para o peso seco e relatados como quimiluminescência de lucigenina/mg de tecido seco.

### **3.9. Medição dos níveis teciduais de cGMP na aorta**

A amostra foi congelada rapidamente em nitrogênio líquido, após a coleta. Pesou-se o tecido congelado e foi colocado em 5-10 volumes (ml de solução/grama de tecido) de ácido tricloroacético (TCA) a 5% em água. Foi feita a homogeneização da amostra em gelo (0-4°C) usando macerador de vidro (A amostra congelada foi pulverizada antes da adição de TCA). Foi removido o precipitado por centrifugação a 1.500 x g por 10 minutos. Foi transferido cuidadosamente o sobrenadante para um tubo de ensaio limpo. O TCA foi extraído da amostra usando éter saturado de água. Foi removido o éter residual da camada aquosa, aquecendo a amostra a 70°C por cinco minutos. Os sobrenadantes da extração do tecido podem ser ensaiados diretamente sem diluição, desde que a curva padrão seja preparada na mesma matriz das amostras. Para preparar a solução matriz de curva padrão, foi extraído cerca de 20 ml da preparação de TCA a 5% com éter da mesma maneira usada para a extração da amostra. Foi removido o éter residual por aquecimento e usado a solução restante para preparar a curva padrão. Foi usado o kit de ensaio disponível comercialmente (Kit Cayman cGMP eia ELISA).

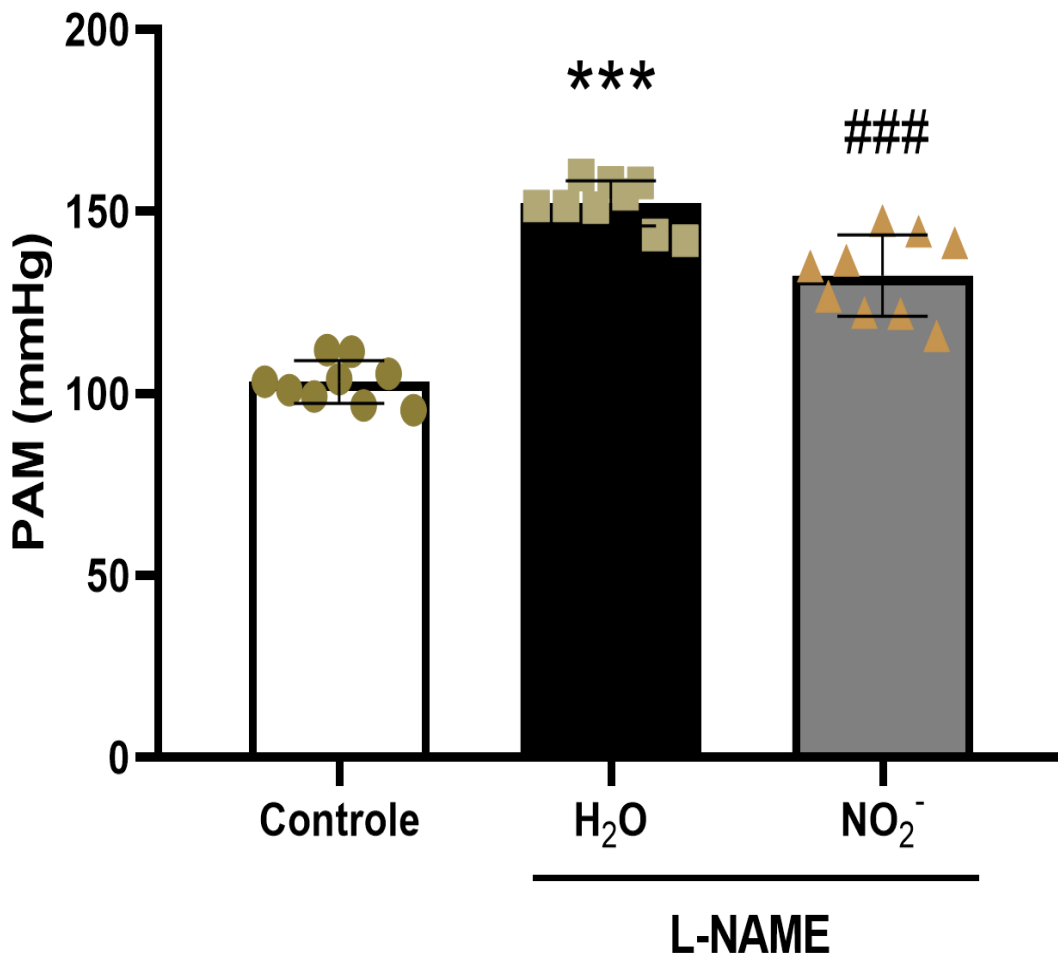
### **3.10 Análise estatística**

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

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeitos do tratamento com nitrito sobre a pressão arterial média em animais com Hipertensão L-NAME:

A PAM foi analisada em grupos Controle, L-NAME e Nitrito, como é mostrado na figura 6. Após a administração de L-NAME, é mostrado um aumento na PAM de 49.07 mmHg em relação ao grupo controle ( $P=0,0001$ ), após a administração de L-NAME. Em seguida, os animais tratados com Nitrito tiveram uma redução na PAM de 19.83 mmHg em relação ao grupo que recebeu L-NAME ( $P=0,0001$ ). No entanto, apesar da redução pressórica significativa observada, os valores basais não foram restabelecidos após o tratamento com nitrito.

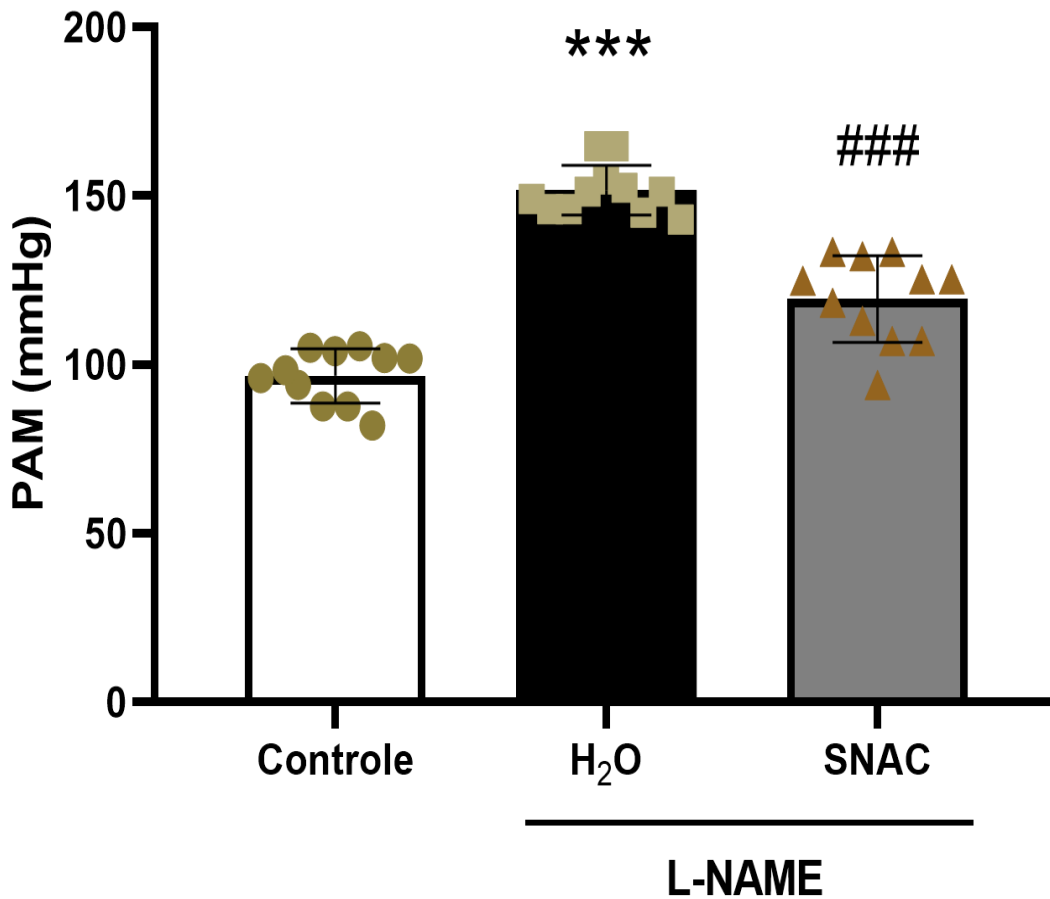


**Figura 6** - Pressão arterial média em ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos. A PA com foi medida após 10 minutos de tratamento com nitrito. \*\*\*  $p < 0.05$  versus ao grupo Controle (n = 9). ###  $p < 0.05$  versus ao grupo L-NAME + água (n=9). Controle: (Água destilada); NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : Nitrito; L-NAME: L-Nitroarginina metil éster.

## **4.2 Efeitos do tratamento com SNAC sobre a pressão arterial média em animais com Hipertensão L-NAME:**

A figura 7 exibe dados da PAM em resposta aos diferentes grupos experimentais Controle (água destilada), L-NAME e SNAC. A administração de L-NAME, como esperado, proporcionou um aumento na PA de 54.95 mmHg, em relação ao grupo controle (151.7 mmHg vs 96.71 mmHg,  $p=0,0001$ ). Contudo, após o tratamento com SNAC, os valores pressóricos tiveram uma redução de 32.22 mmHg em relação ao grupo L-NAME (151.7 mmHg vs 119.4 mmHg,  $p=0,0001$ ). O tratamento com SNAC também não foi capaz de restaurar os valores basais de PA (96.71 mmHg vs 119.4mmHg,  $p=0,0001$ ).

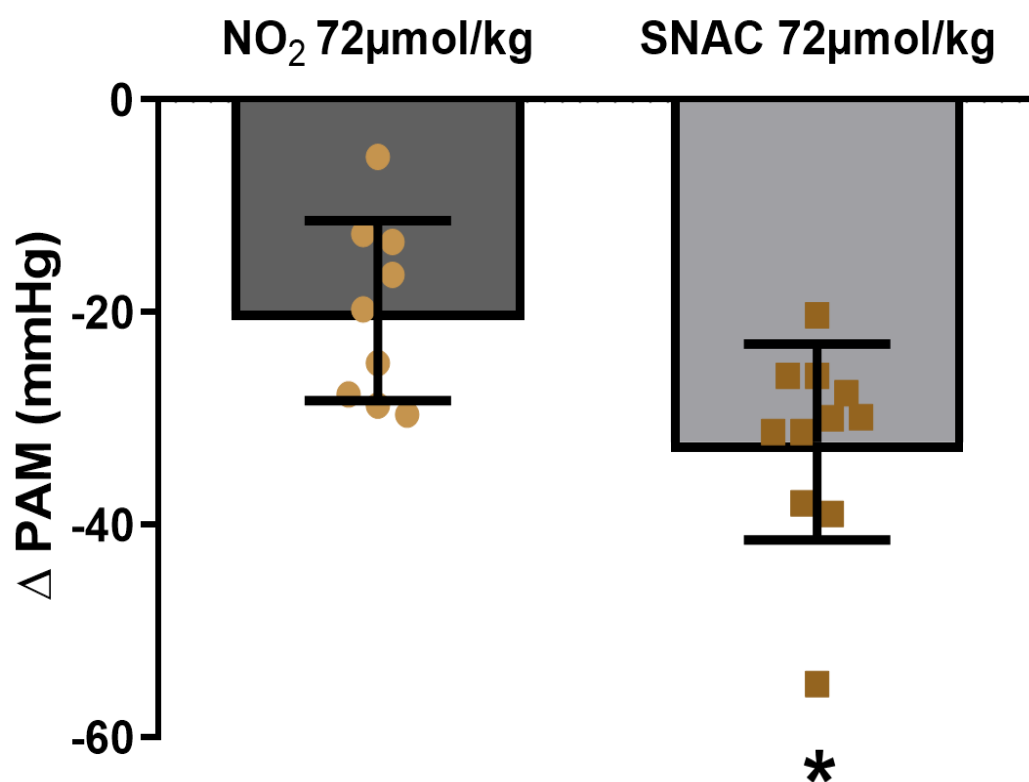




**Figura - 7.** Pressão arterial média em ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos. A PA com foi medida após 10 minutos de tratamento com SNAC. \*\*\*  $p < 0.05$  versus ao grupo Controle (n=11). ###  $p < 0.05$  versus ao grupo L-NAME + água (n=11). PAM: Pressão arterial média. Controle: Água destilada. SNAC: S-nitroso N-acetilcisteína.

#### **4.3 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre a pressão arterial média em animais com Hipertensão L-NAME:**

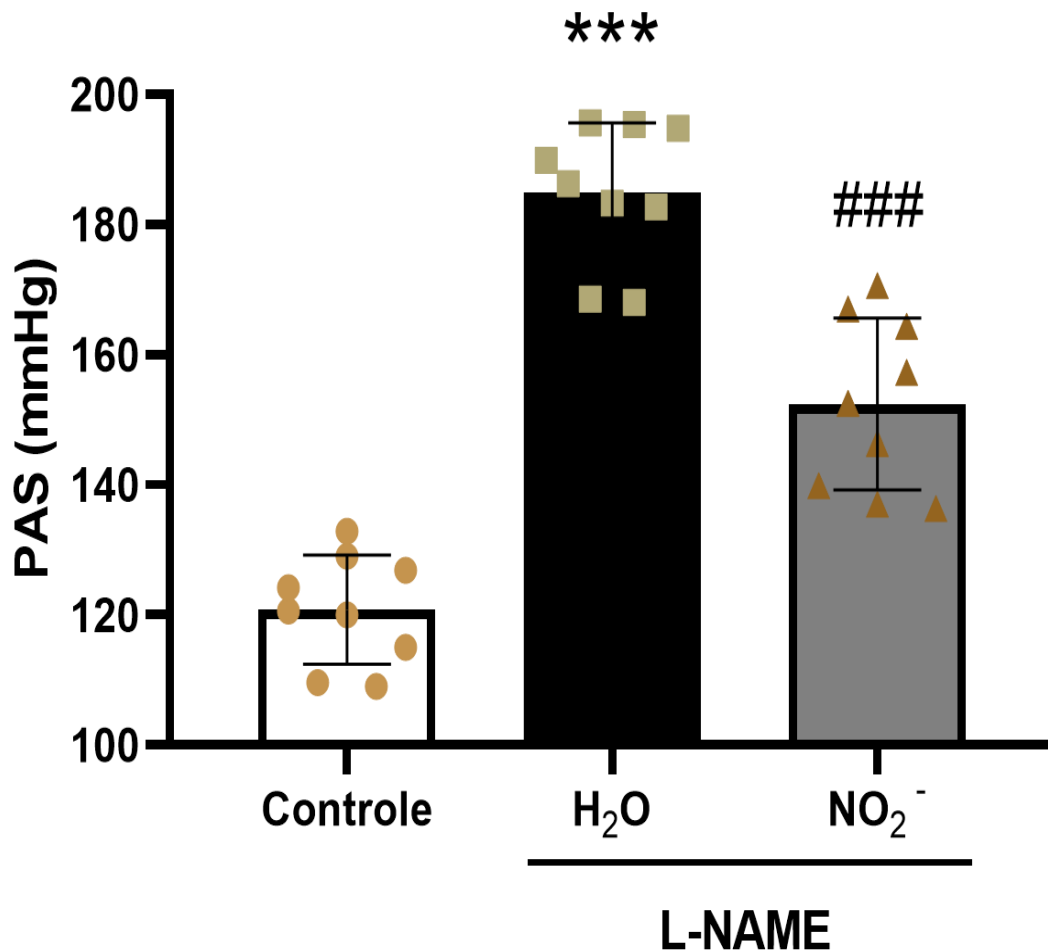
Em reflexo aos resultados anteriores (Fig.6 e Fig.7), o resultado da Figura 8 mostra que os animais do grupo L-NAME tiveram redução significativa da PAM após ambos os tratamentos com  $\text{NO}_2^-$  e SNAC. No entanto, como observado no gráfico abaixo, a redução foi mais expressiva no grupo tratado com SNAC (n=18), mostrando uma média de redução em 32.2 mmHg ( $\Delta$ ) do que no grupo tratado com Nitrito (n=11), com uma média de redução em 20 mmHg ( $\Delta$ ). Assim, a redução pressórica evidenciada no tratamento com SNAC comparada a redução evidenciada no tratamento com Nitrito, foi maior 12.4 mmHg (p=0,01).



**Figura - 8.** Queda da pressão arterial média de ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos + tratamentos por 10 minutos. \*p<0.0428 versus ao grupo Nitrito (12.4 mmHg). NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrito. SNAC: S-nitroso N-acetilcisteína. PAM: Pressão arterial média.

#### **4.4 Efeitos do tratamento com nitrito sobre a pressão arterial sistólica em animais com Hipertensão L-NAME:**

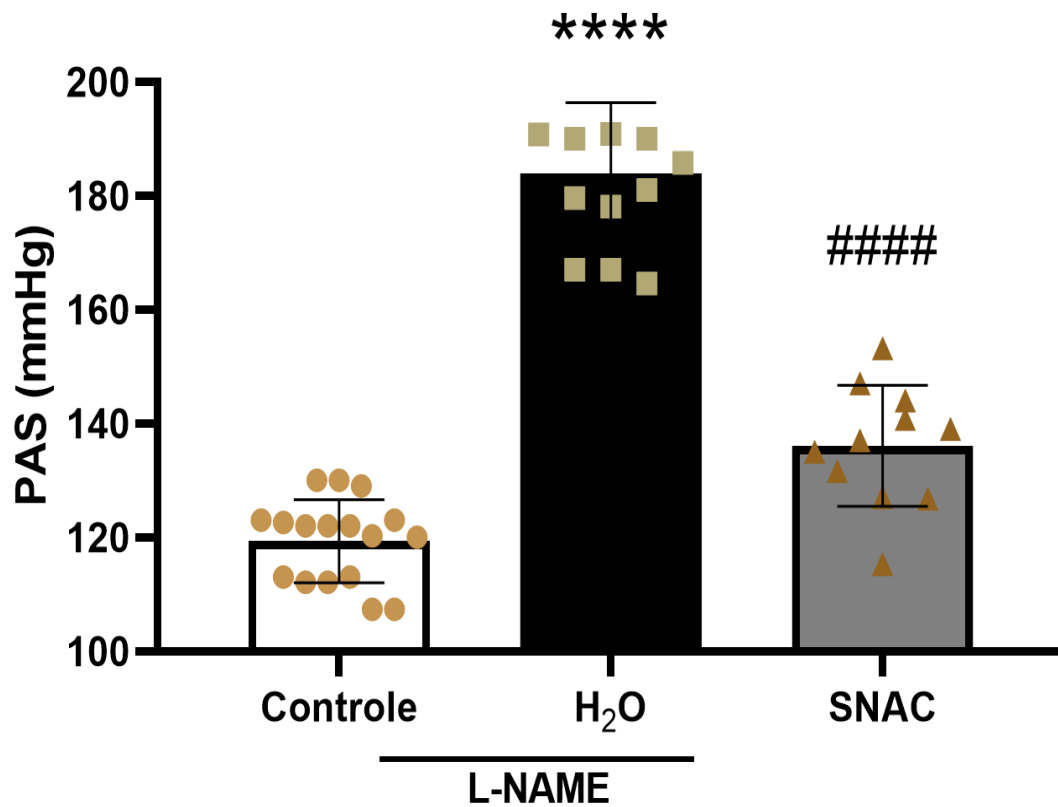
Os valores da PAS em resposta ao tratamento com Nitrito foram medidos em ratos após a indução de hipertensão de L-NAME. O grupo com hipertensão L-NAME provocou um aumento nos valores sistólicos de 64.14 mmHg em relação ao grupo controle (120.8 mmHg vs 184.9 mmHg,  $p=0,0001$ ) Contudo, os valores sistólicos do grupo hipertenso foram reduzidos em 32.56 mmHg após o tratamento com o Nitrito (184.9 mmHg vs 152.4 mmHg,  $p=0,0001$ ). No entanto, o tratamento com nitrito não restaurou os valores sistólicos ao basal (120.8 mmHg vs 152.4 mmHg,  $p=0,0001$ ).



**Figura - 9.** Pressão arterial sistólica em ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos. A pressão arterial sistólica foi medida após 10 minutos de tratamento com Nitrito. \*\*\* $p < 0.05$  versus ao grupo Controle (n=9). ### $p < 0.05$  versus ao grupo L-NAME + água (n=9). PAS: Pressão arterial sistólica. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : Nitrito. L-NAME: L-Nitro arginina metil éster.

#### **4.5 Efeitos do tratamento com SNAC sobre a pressão arterial sistólica em animais com Hipertensão L-NAME:**

Os valores da PAS em resposta ao tratamento com SNAC foram medidos em ratos após a indução de hipertensão de L-NAME. A elevação observada na PAS pelo grupo hipertenso foi de 64.51 mmHg, em relação ao grupo controle (119.3 mmHg vs 183.9 mmHg,  $p=0,0001$ ). Em seguida, o tratamento com SNAC ( $n=11$ ) reduziu os valores sistólicos elevados da PA em 47.79 mmHg (183.9 vs 136.1 mmHg,  $p=0,0001$ ). O tratamento com SNAC não reduziu os valores pressóricos ao basal (119.3 mmHg vs 136.1 mmHg,  $p=0,004$ ).

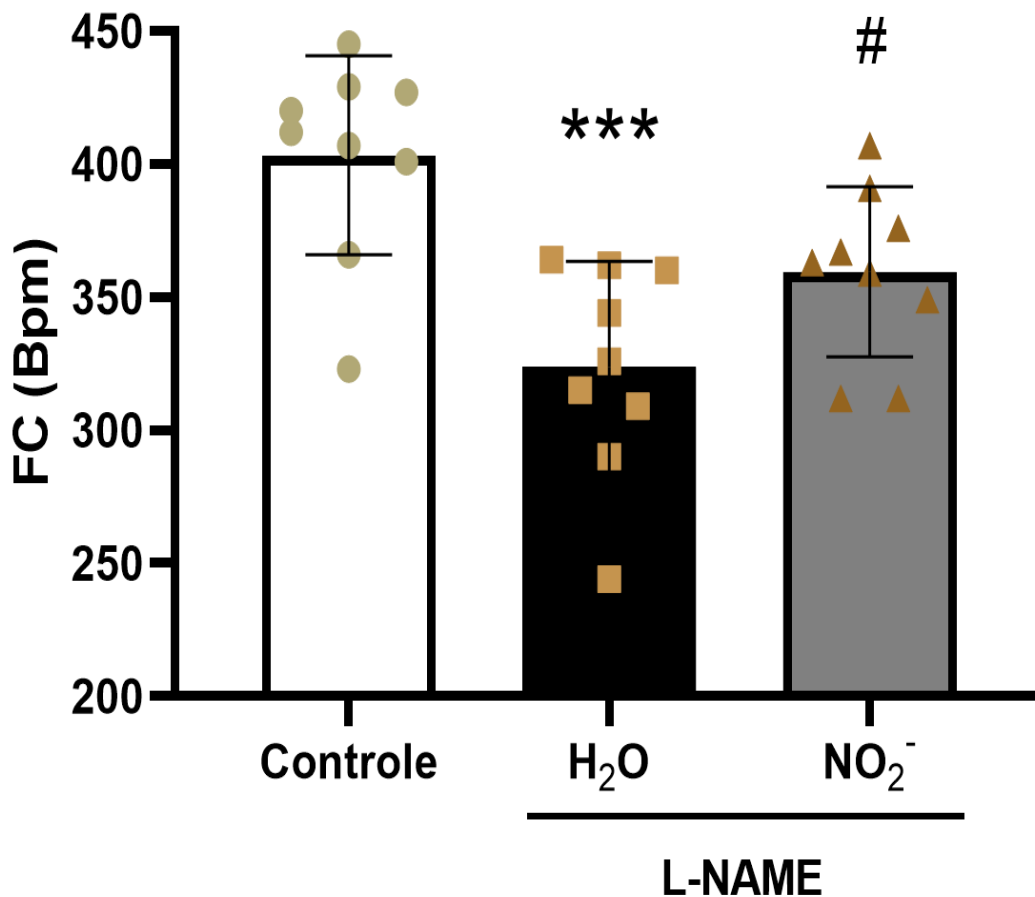


**Figura - 10.** Pressão arterial sistólica em ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos. A pressão arterial sistólica foi medida após 10 minutos de tratamento com SNAC (n=11). \*\*\*\*p<0.05 versus ao grupo controle (n=17). #####p<0.05 versus ao grupo L-NAME (n=13). PAS: Pressão arterial sistólica.

#### **4.6 Efeitos do tratamento com nitrito sobre a frequência cardíaca (FC) em animais com Hipertensão L-NAME:**

A FC de grupos experimentais controle, L-NAME e nitrito foram medidos. A indução de hipertensão através do L-NAME atenuou os valores de FC em relação ao grupo controle em 79.56 Bpm (403.3 Bpm vs 323.8 Bpm,  $p=0,0003$ ). No entanto, após o tratamento com nitrito, os valores de FC não mostraram alterações significativas em relação ao grupo L-NAME (359.6 Bpm vs 323.8 Bpm,  $p=0,1156$ ) com  $\Delta$  (delta) de 35.78 Bpm. Semelhantemente ao grupo L-NAME, mas com menos destaque, o grupo nitrito também reduziu os batimentos cardíacos da FC em relação ao controle em 43.78 Bpm (403.3 Bpm vs 359.6 Bpm,  $p=0,0453$ ).

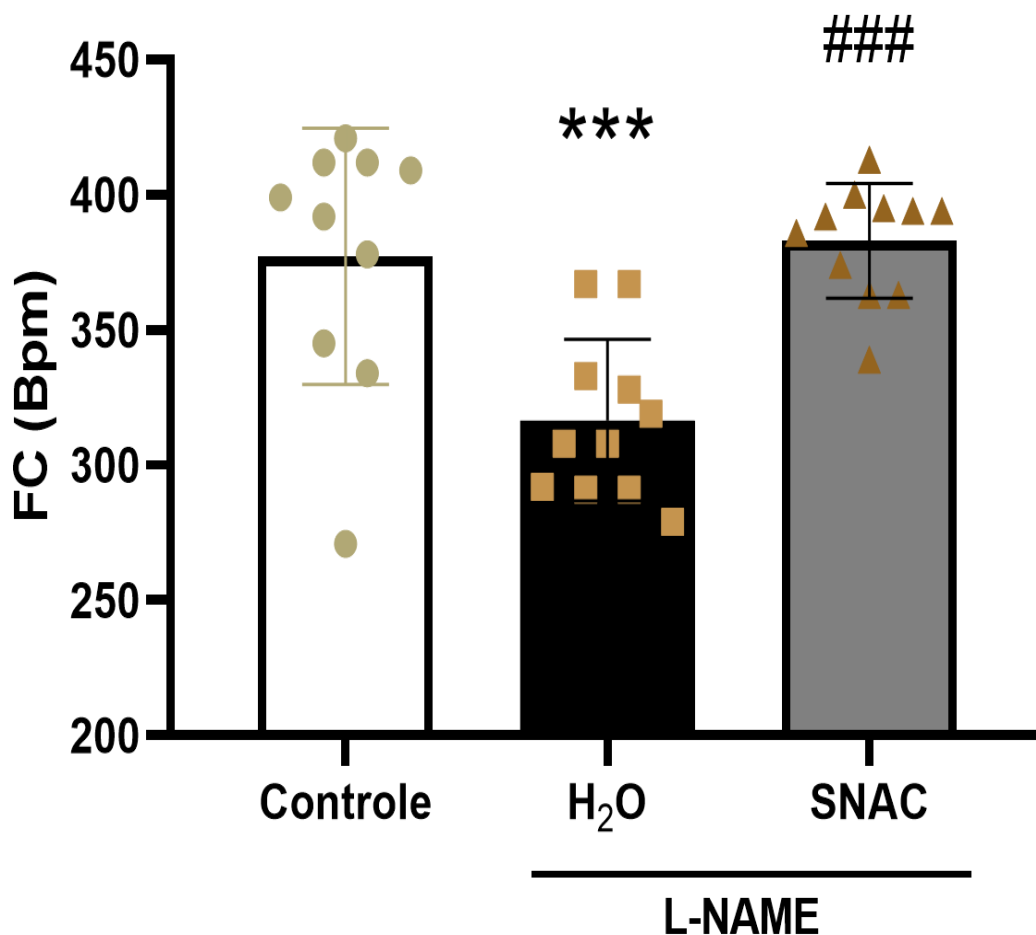




**Figura - 11.** Frequência cardíaca de ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos. A pressão arterial sistólica foi medida após 10 minutos de tratamento com Nitrito. \*\*\* $p < 0.05$  versus ao grupo controle. \* $p < 0.05$  versus ao grupo controle.  $p < 0.05$  comparado aos respectivos grupos L-NAME e nitrito. Todos os respectivos grupos tiveram o mesmo n° de animais (n=9).

#### **4.7 Efeitos do tratamento com SNAC sobre a frequência cardíaca em animais com Hipertensão L-NAME:**

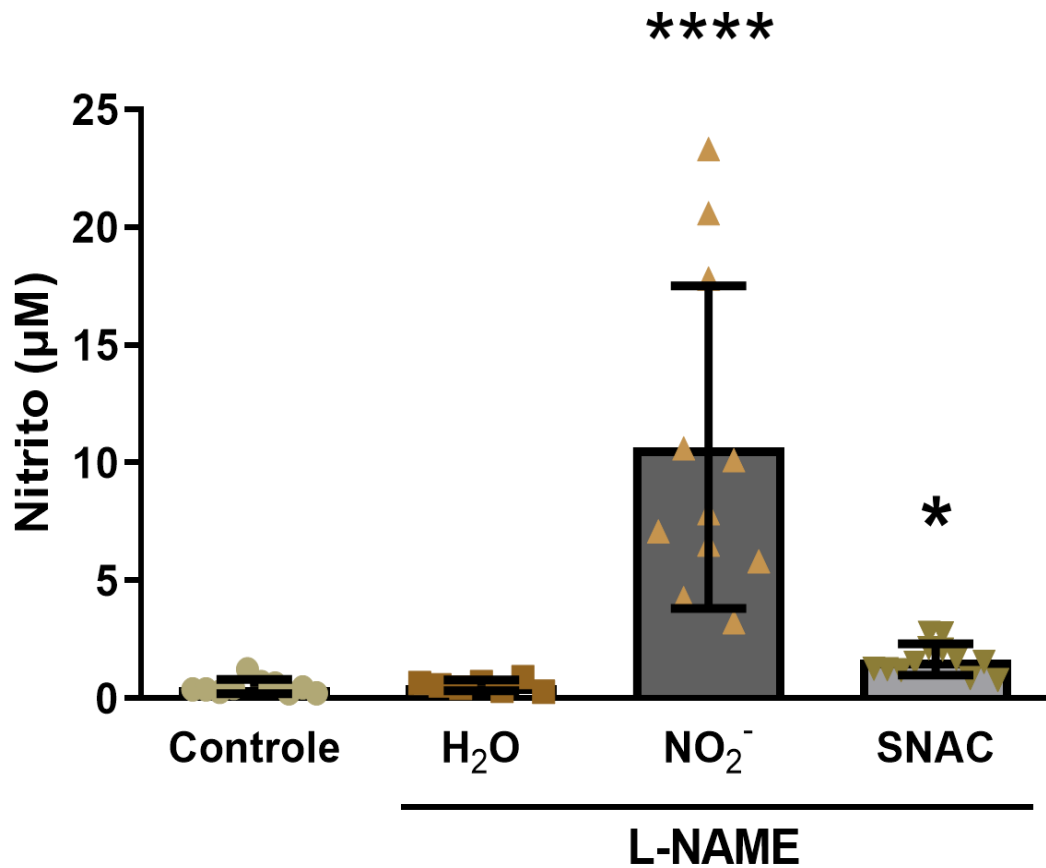
Os efeitos dos grupos experimentais Controle, L-NAME e SNAC foram medidos. Uma diminuição de 60.65 Bpm na frequência cardíaca foi evidenciada após a administração de L-NAME em relação aos valores basais do controle (377.3 Bpm vs 316.6 Bpm,  $p=0,0009$ ). No entanto, a FC foi reestabelecida aos valores basais (controle) após o tratamento com SNAC ( $p=0,9224$ ), mostrando um aumento nos batimentos cardíacos de 66.36 Bpm em relação ao grupo L-NAME (316.6 Bpm vs 383 Bpm,  $p=0,0002$ ).



**Figura - 12.** Frequência cardíaca de ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos. A pressão arterial sistólica foi medida após 10 minutos de tratamento com SNAC (n=11). \*\*\* $p < 0.05$  versus ao grupo controle (n=10). #### $p < 0.05$  versus ao grupo L-NAME (n=11). H<sub>2</sub>O: Água destilada. L-NAME: L-Nitroarginina metil éster. BPM: Batimentos por minuto. SNAC: S-nitroso N-acetilcisteína.

#### **4.8 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações plasmáticas de nitrito em animais com Hipertensão L-NAME:**

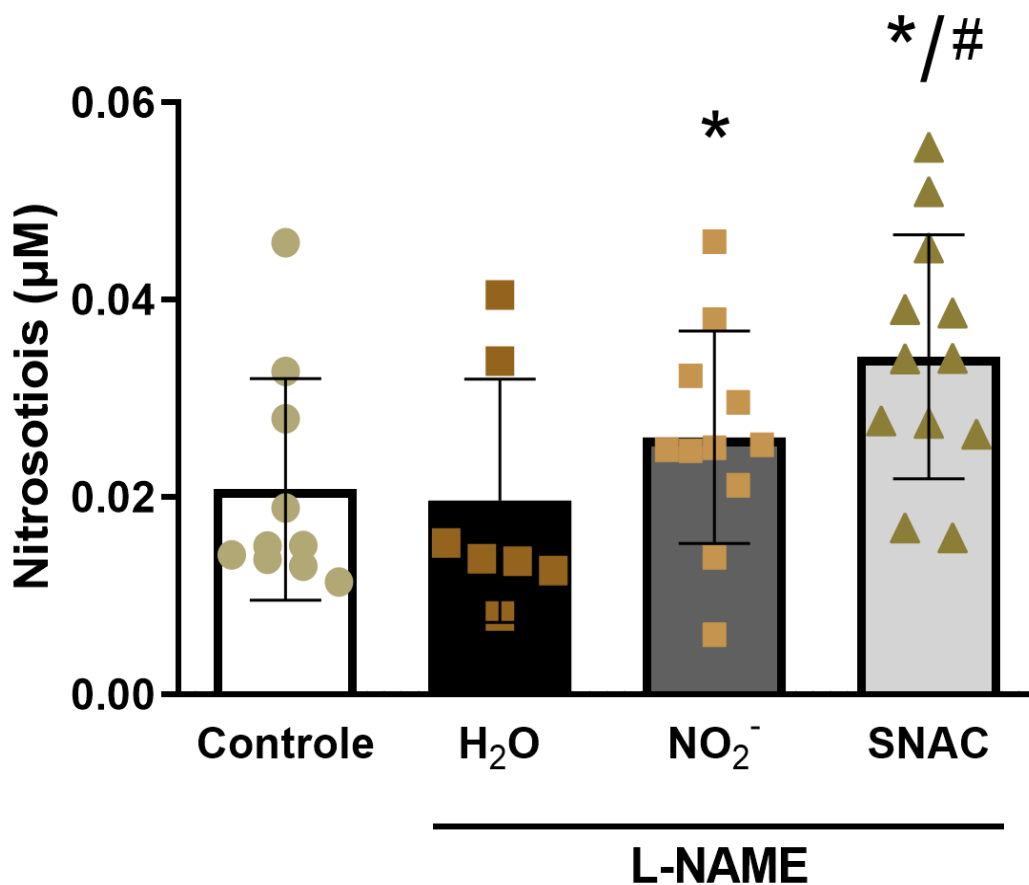
As concentrações plasmáticas de Nitrito foram medidas nos grupos experimentais controle, L-NAME + Água destilada, L-NAME + nitrito e L-NAME + SNAC. A administração de L-NAME não afetou as concentrações plasmáticas de nitrito em relação ao controle ( $p=0,9999$ ). Por outro lado, como esperado, o nitrito elevou consideravelmente os níveis plasmáticos de nitrito ( $10.16 \mu\text{M}$ ) em relação aos valores basais ( $0.4986 \mu\text{M}$  vs  $10.66 \mu\text{M}$ ,  $p=0,0001$ ). Além disso, o grupo que recebeu o tratamento com SNAC mostrou um aumento sutil de  $1.154 \mu\text{M}$  nas concentrações de nitrito no plasma ( $0.4986 \mu\text{M}$  vs  $1.653 \mu\text{M}$ ,  $p=0241$ ) em relação aos valores basais.



**Figura - 13.** Dosagem de nitrito plasmático de ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos + tratamentos por 10 minutos. \*\*\*\* $p < 0.05$  versus ao grupo L-NAME (n = 7-12). \* $p < 0.05$  versus ao grupo L-NAME (n= 7-12). Controle (Água destilada). SNAC: S-nitroso N-acetilcisteína. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : Nitrito.

#### **4.9 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações plasmáticas da S-nitroso N-acetilcisteína em animais com Hipertensão L-NAME:**

As concentrações plasmáticas de RSNO também foram dosadas. À exemplo do resultado anterior (fig.13), o grupo que foi administrado L-NAME também não foi capaz de alterar os valores basais das concentrações de RSNO no plasma (0.02075  $\mu$ M vs 0.01960  $\mu$ M,  $p=0,9971$ ). Por outro lado, ambos os grupos tratados com nitrito (0.02075  $\mu$ M vs 0.02605,  $p=0.05$ ) e SNAC (0.02075  $\mu$ M vs 0.03421,  $p=0.0497$ ) conseguiram levar os níveis plasmáticos de RSNO relação ao grupo controle. Além disso, o tratamento com SNAC mostrou um aumento ligeiramente superior nas concentrações plasmáticas de RSNO do que no grupo tratado com nitrito (0.02605  $\mu$ M vs 0.03421  $\mu$ M,  $p=0.0259$ ).

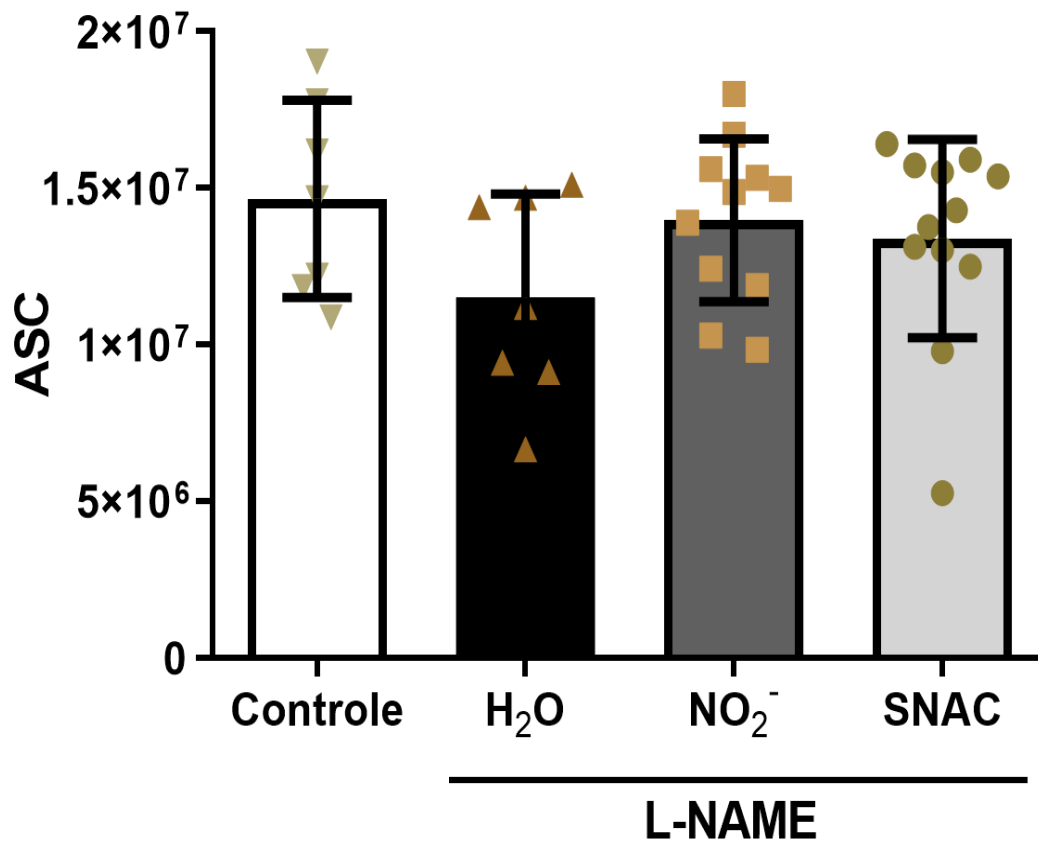


**Figura - 14.** Dosagem de nitrosotiois plasmático de ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos + tratamentos por 10 minutos. \* $p < 0.05$  versus ao grupo L-NAME (n=7-12). # $p < 0,05$  versus ao grupo L-NAME + Nitrito (n = 7-12). Entre os grupos L-NAME + nitrito e L-NAME + SNAC foi utilizado o teste *t* pareado para obter as diferenças estatísticas entre os dois grupos. RSNO: Nitrosotiois.

#### **4.10 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre o potencial antioxidante reativo e total (TRAP) em animais com Hipertensão L-NAME:**

A dosagem da capacidade antioxidante total foi medida no plasma nos grupos experimentais controle, L-NAME + água destilada, L-NAME + nitrito e L-NAME + SNAC. Contudo, os três grupos experimentais L-NAME, nitrito e SNAC (1.151 vs 1.398 vs 1339) não foram capazes de provocar alterações significativas da área sobre a curva dos valores basais (1.465) da capacidade antioxidante total.

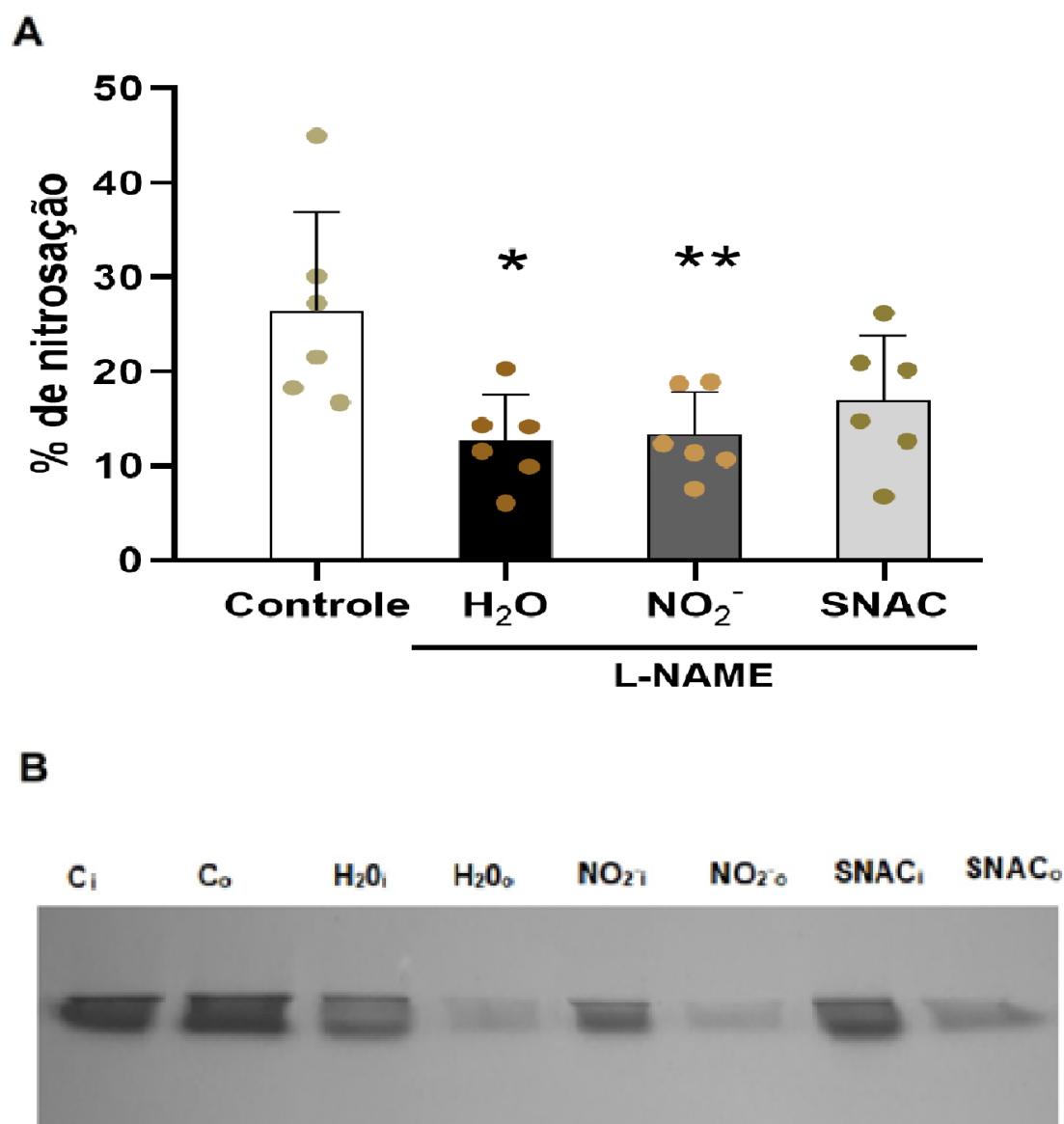




**Figura - 15.** Dosagem do potencial antioxidante reativo e total (TRAP) de plasma de ratos tratados com L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos + tratamentos por 10 minutos. (n = 7-12)  $p > 0.2487$  comparado aos respectivos grupos controle, L-NAME, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SNAC. ASC: Área sobre a curva.

#### **4.11 Relação percentual das concentrações teciduais aórtica de proteínas nitrosadas em ratos tratados com nitrito e SNAC e hipertensão L-NAME:**

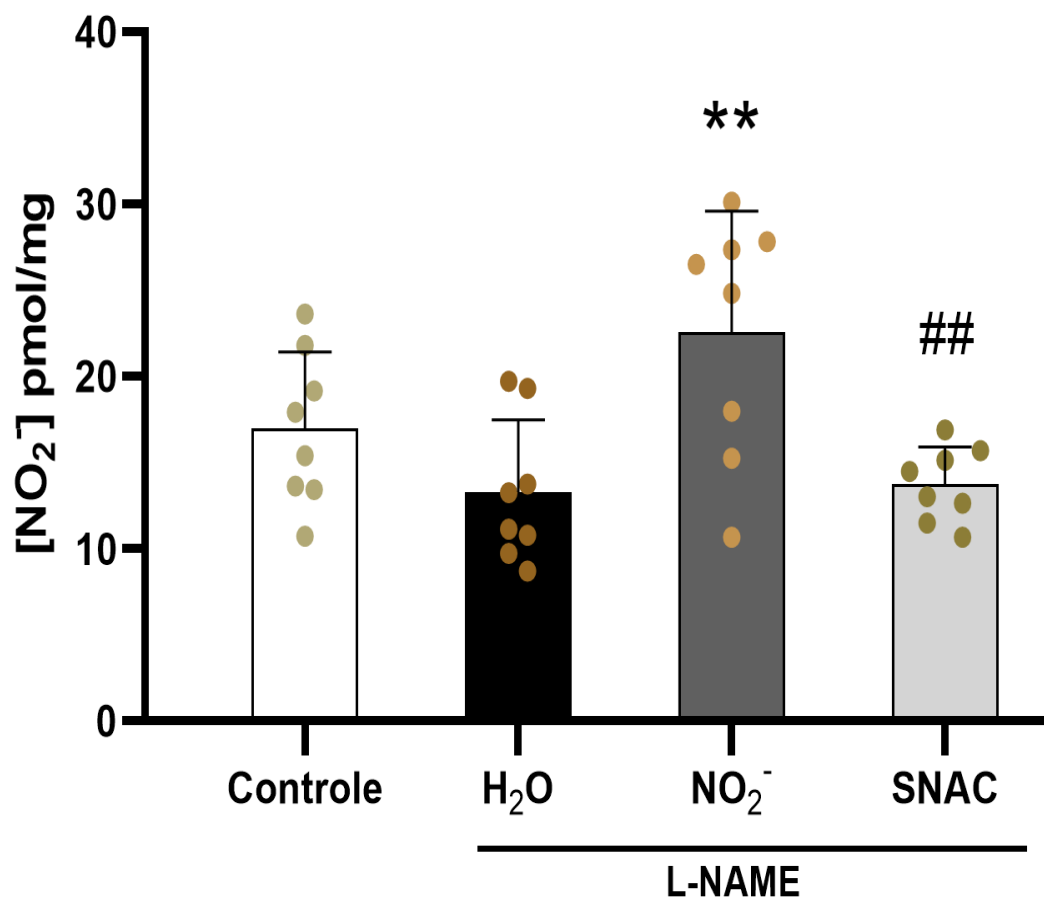
A fim de mostrar a nitroação proteica no tecido aórtico de ratos, foi medido o percentual de proteínas nitrosadas, que é um mecanismo chave na atenuação da vasoconstrição. O grupo que recebeu L-NAME atenuou a nitroação proteica em >50% (P=0,01) comparado aos percentuais basais. De maneira similar, o tratamento com nitrito oral também reduziu a nitroação protéica em >50% (P=0,01), enquanto o SNAC atenuou >38% (P=0,04) em relação ao grupo controle. Por fim, os grupos que receberam tratamento não mostraram diferenças significativas entre si (P=0,68).



**Figura - 16.** Percentual de proteínas nitrosadas de aorta pelo método SNORAC com  $\text{NO}_2^-$  ou SNAC em comparação ao controle ( $n= 6/\text{por grupo}$ ), em anéis aórticos de ratos com hipertensão L-NAME.  $\text{NO}_2^-$ : Nitrito; SNAC= S-nitroso N-acetilcisteína; C= controle. O *Painel A* – mostra a quantificação de proteínas nitrosadas totais nas amostras aórticas.  $*p<0,05$  versus ao grupo controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. *Painel B* – Gel representativo de SDS/PAGE corado com Coomassie Blue para quantificar a nitrosação de proteína total em amostras aórticas dos quatro grupos experimentais usando o método SNO-RAC ("I" corresponde à entrada: proteína total (input); "O" corresponde à saída: proteína nitrosada (output)). As amostras de output (o) são 3x mais concentradas que as de input (i), sendo esta diluição corrigida na quantificação.

#### **4.12 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no tecido aórtico em animais com Hipertensão L-NAME:**

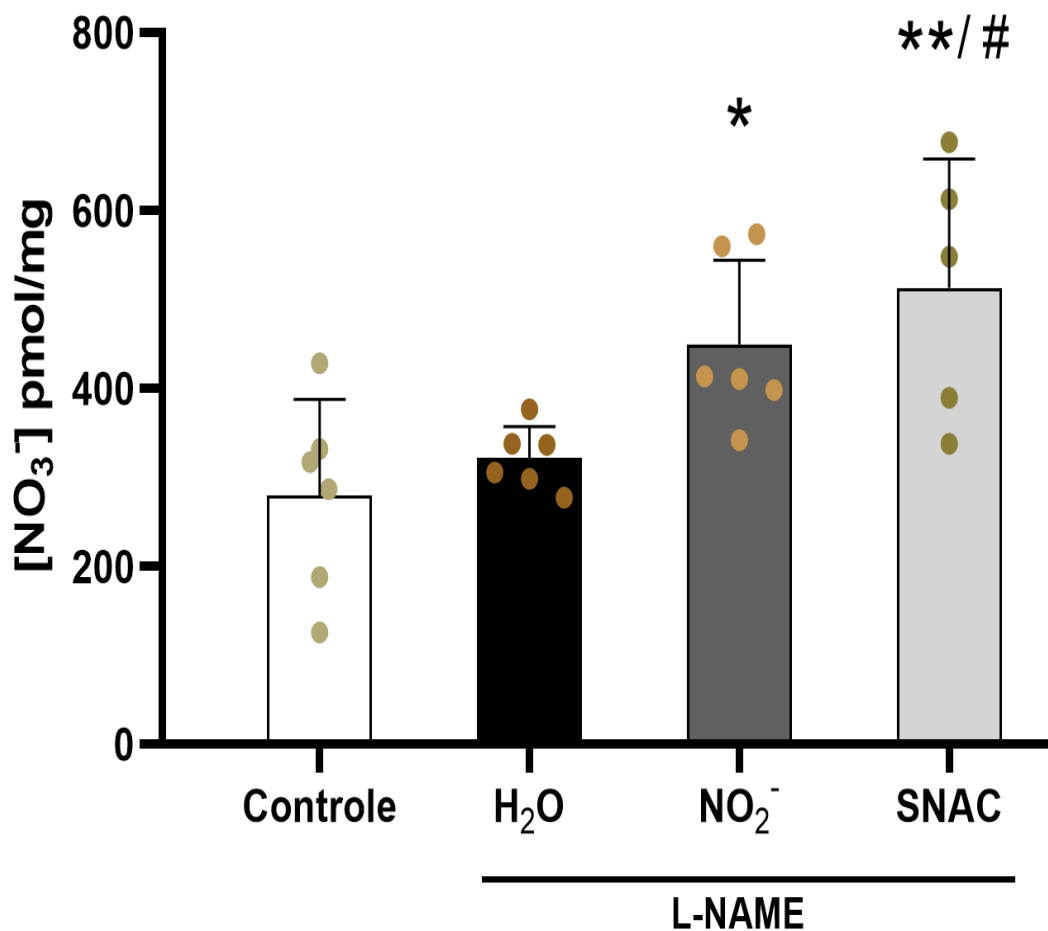
As concentrações de  $\text{NO}_2^-$  na aorta foram medidas nos grupos experimentais controle (água destilada), L-NAME + Água destilada, L-NAME +  $\text{NO}_2^-$  e L-NAME + SNAC. A administração de L-NAME não afetou os valores basais de nitrito tecidual ( $p > 0,3533$ ). Por sua vez, como esperado, o tratamento com  $\text{NO}_2^-$  provocou um aumento considerável (9.27 pmol/mg) nas concentrações teciduais de  $\text{NO}_2^-$  aórtico ( $p = 0,003$ ) em relação ao grupo que recebeu L-NAME. Além disso, o tratamento com SNAC mostrou diferenças significativas entre o tratamento com o  $\text{NO}_2^-$  ( $p = 0,004$ ) frente aos níveis de nitrito no tecido aórtico, mostrando predominância no tratamento com  $\text{NO}_2^-$  (22.57 pmol/mg vs 13.76 pmol/mg). Dessa forma, o SNAC não afetou significativamente as concentrações de nitrito tecidual aórtico em relação ao controle ( $p = 0,35$ ).



**Figura – 17.** Dosagem de nitrito tecidual aórtico de ratos com hipertensão L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos + tratamentos por 10 minutos. \*\* $p < 0,05$  versus ao grupo L-NAME + Água destilada. ## $p < 0,05$  versus ao grupo nitrito + L-NAME. L-NAME: L-Nitroarginina Metilester; SNAC: S-nitroso N-acetilcisteína; pmol: picomolar; mg: miligramas; H<sub>2</sub>O: Água. (n= 8/por grupo).

#### **4.13 Efeito comparativo do tratamento com nitrito e SNAC sobre as concentrações de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no tecido aórtico em animais com Hipertensão L-NAME:**

As concentrações de  $\text{NO}_3^-$  na aorta foram medidas nos grupos experimentais controle (água destilada), L-NAME + Água destilada, L-NAME +  $\text{NO}_2^-$  e L-NAME + SNAC. A administração de L-NAME não provocou alterações sobre os valores basais de nitrito tecidual ( $p=0,89$ ). Por outro lado, como era previsto, o tratamento com  $\text{NO}_2^-$  resultou em um aumento significativo (170 pmol/mg) nas concentrações teciduais de  $\text{NO}_3^-$  aórtico ( $p=0,04$ ) em relação ao grupo que recebeu apenas água (controle). Assim como o  $\text{NO}_2^-$ , o tratamento com SNAC também evidenciou uma elevação nos níveis teciduais de  $\text{NO}_3^-$  em relação ao controle, no entanto, exibe uma elevação mais evidente (233.4 pmol/mg,  $p=0,0058$ ) do que no grupo  $\text{NO}_2^-$ . Contudo, não existe diferença significativa entre ambos os grupos tratamento ( $p=0,73$ ).

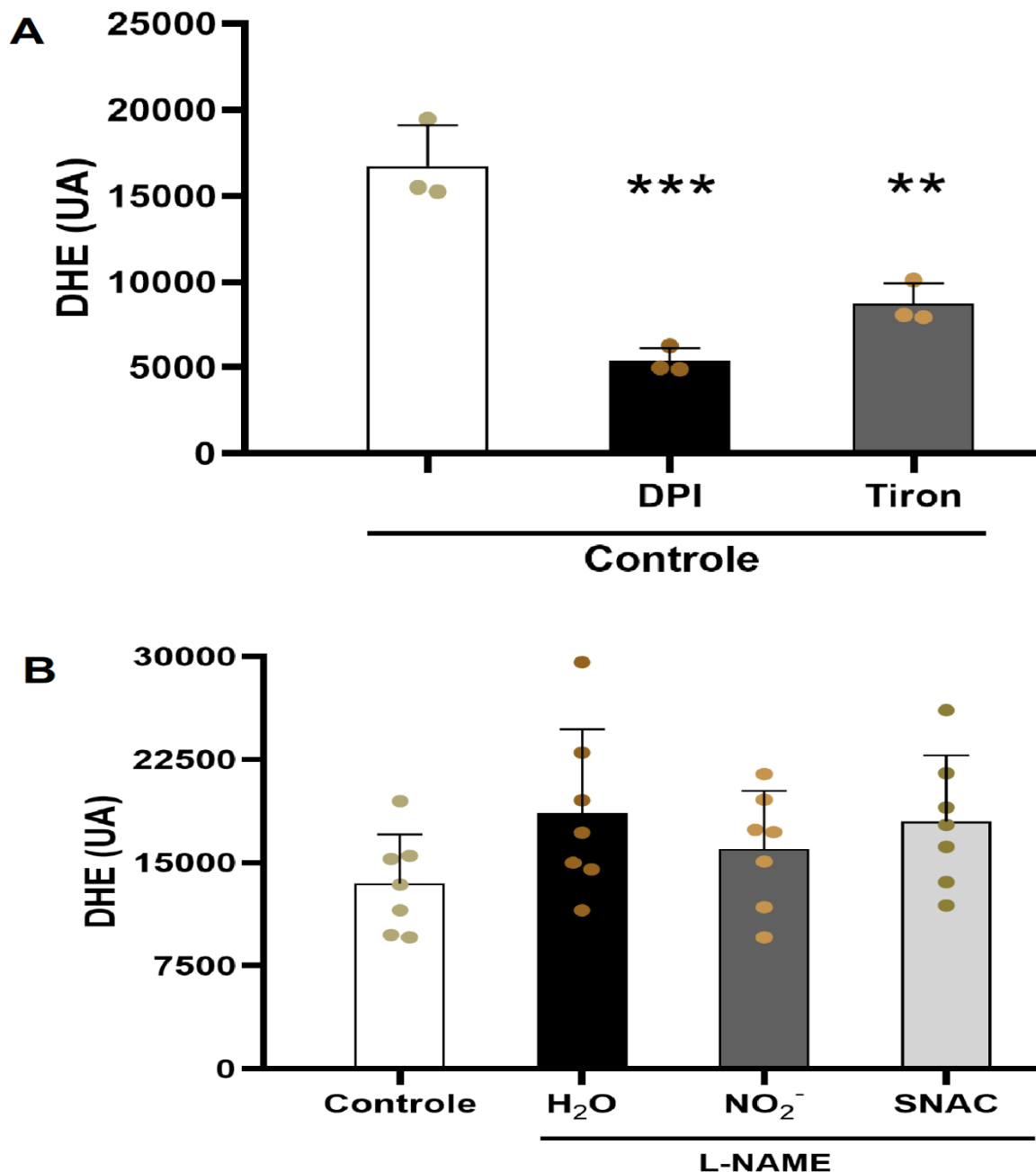


**Figura – 18.** Dosagem de nitrato tecidual de aorta de ratos com hipertensão L-NAME (100mg/kg) por 30 minutos + tratamentos por 10 minutos. \* $p < 0,05$  versus ao grupo controle. (n=6/por grupo) \*\* $p < 0,05$  versus ao grupo nitrato. # $p < 0,05$  versus ao grupo L-NAME + Água destilada. L-NAME: L-Nitroarginina Metilester; SNAC: S-nitroso N-acetilcisteína; pmol: picomolar; mg: miligramas; H<sub>2</sub>O: Água. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: Nitrito; NO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Nitrato.

#### **4.14 Avaliação comparativa do tratamento com nitrito e SNAC sobre a produção de espécies reativas de oxigênio vascular por meio do DHE em animais com hipertensão L-NAME:**

A figura 19A mostra resultados de experimentos da aorta de ratos tratados com as seguintes substâncias controle positivo (DPI e Tiron), isto é, traz a validação do método. Desse modo, a administração de ambas substâncias mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle. No entanto, a administração de DPI ( $p=0,0003$ ) provocou uma redução mais acentuada na intensidade fluorescente do DHE do que o Tiron ( $p=0,002$ ) em relação ao controle. A produção de espécie reativas de oxigênio na aorta foi medida usando o DHE nos grupos controle, L-NAME, Nitrito e SNAC (Figura 19B). O grupo que recebeu a administração de L-NAME não apresentou diferença estatística em relação ao controle ( $p=0,21$ ). Assim como ambos os tratamentos com nitrito ( $p=0,76$ ) e SNAC ( $p=0,31$ ) também não exibiram diferença significativa em relação aos valores basais, não mostrando estatística na sensibilidade representada pela intensidade fluorescente do DHE.

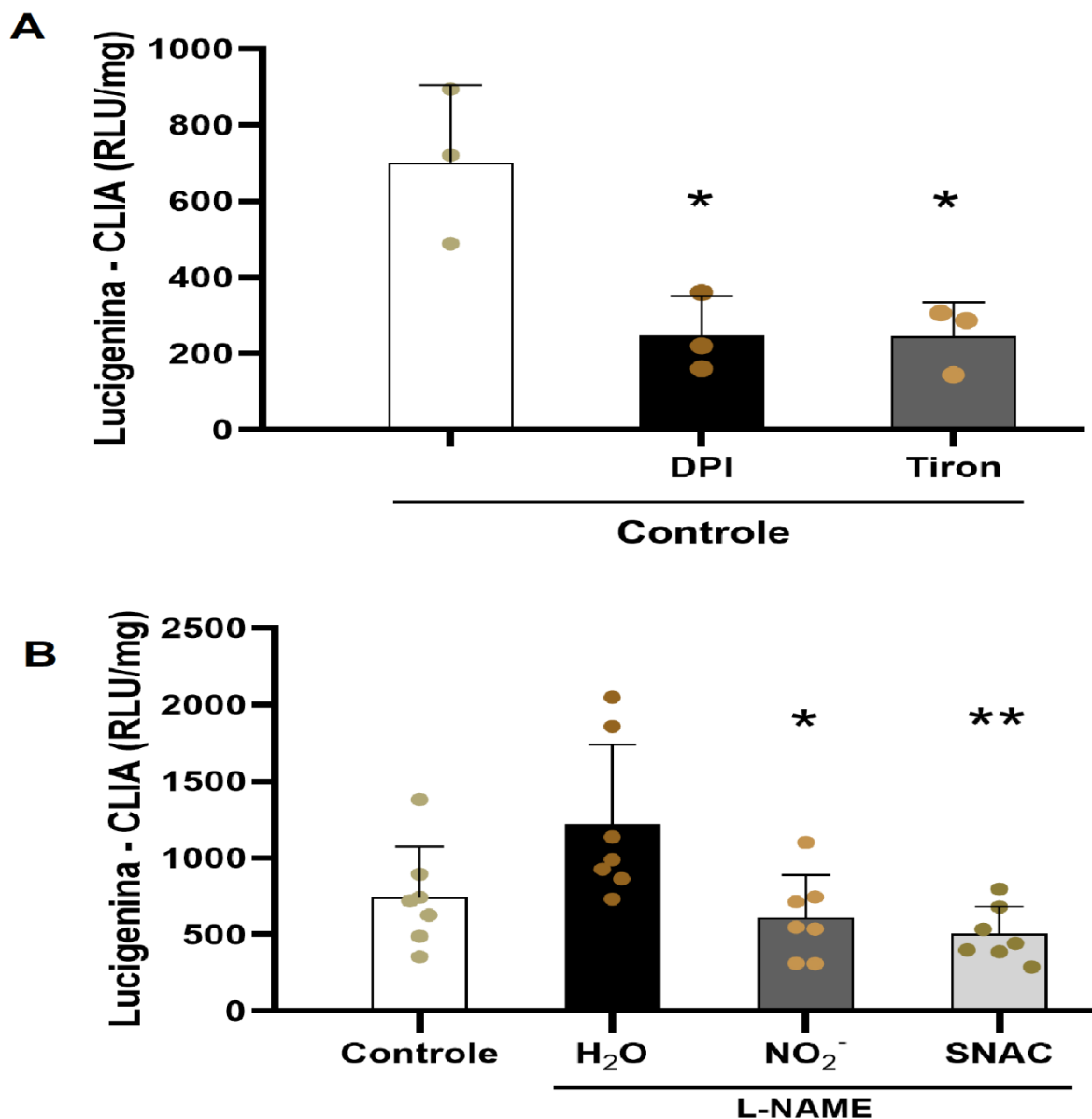




**Figura – 19.** Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em anéis aórticos de ratos com hipertensão L-NAME por fluorescência de dihidroetídio (DHE) e tratados com Nitrito e S-nitroso N-acetilcisteína (SNAC). O *Painel A* mostra a quantificação da fluorescência do DHE aórtico em experimentos de controle positivo usando aortas de ratos L-NAME na presença de difenil iodônio (DPI 10  $\mu$ mol/l, um inibidor de flavoproteína) e Tiron (1mmol/l, um eliminador de superóxido). Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM (n=3-7/grupo). \*\*\*P<0,05 versus ao grupo Controle (L-NAME); \*\*P<0,05 versus Controle (L-NAME) – *Painel A*. UA: Unidades arbitrárias.

#### **4.15 Avaliação da produção de EROs dependente de NADPH vascular em ratos com hipertensão L-NAME tratados com Nitrito e SNAC:**

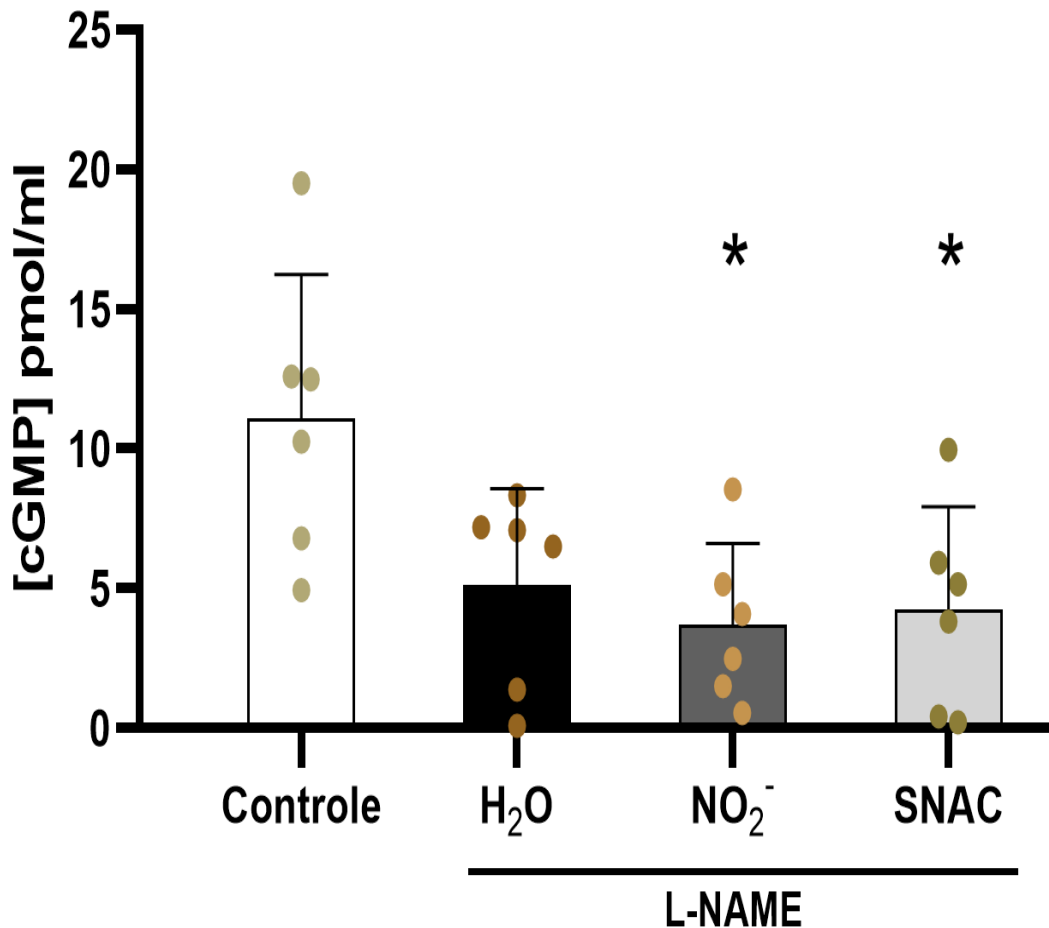
A NOX é uma importante enzima pró-oxidante, especialmente na hipertensão. Por isso, nesse estudo para determinar os efeitos do tratamento do nitrito e SNAC sobre a produção de EROs dependente de NADPH vascular em ratos com hipertensão L-NAME, foram utilizados anéis aórticos de animais sacrificados (n= 3-7 /grupo). A produção de EROs aórtica foi avaliada através da intensidade quimiluminescente por lucigenina. A quantificação quimiluminescente por lucigenina em experimentos controle positivo utilizando aortas de ratos com hipertensão L-NAME mostrou que o DPI e/ou Tiron embotou o sinal de lucigenina em >65% (fig. 20 A;  $p=0,01$  e  $p=0,01$ , respectivamente). Embora não tenha exibido diferença significativa, o sinal de lucigenina mostrou uma tendência de aumento após receber L-NAME ( $P=0,07$ ) em relação ao controle (água). Por outro lado, o tratamento com nitrito reverteu em >50% (fig. 20 B;  $p=0,01$ ) o sinal quimiluminescente por lucigenina, enquanto o tratamento com SNAC reverteu em >59% (fig. 20 B;  $p= 0,004$ ), em relação ao grupo com hipertensão L-NAME.



**Figura - 20.** Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) dependentes de NADPH vascular em anéis aórticos de ratos com hipertensão L-NAME por quimiluminescência por lucigenina (RLU/mg) e tratados com Nitrito e S-nitroso N-acetilcisteína (SNAC). O *Painel A* mostra a quantificação quimioluminescente por lucigenina de anéis aórticos em experimentos de controle positivo usando aortas de ratos L-NAME na presença de difenil iodônio (DPI 10  $\mu$ mol/l, um inibidor de flavoproteína) e Tiron (1mmol/l, um eliminador de superóxido). Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM (n=3-7/grupo). \*P<0,05 versus Controle (L-NAME) – *Painel A*. \*P<0,05 versus L-NAME + água; \*\*P<0,05 versus L-NAME + água – *Painel B*. CLIA: Quimiluminescente:

#### **4.16 Avaliação dos níveis teciduais de cGMP em ratos com hipertensão L-NAME tratados com Nitrito e SNAC:**

A cGMP é um segundo mensageiro envolvido nas funções do sistema cardiovascular, dentre as funções, os processos que envolvem o controle da hipertensão. A fim de obter resposta da participação cGMP neste processo, foi medido seus níveis no tecido aórtico frente ao tratamento com nitrito e SNAC em ratos com hipertensão L-NAME. É importante ressaltar que este grupo que recebeu o análogo da L-arginina apresentou uma forte tendência estatística ( $P=0,06$ ) em relação ao grupo controle. Por outro lado, o grupo tratado com nitrito reduziu em  $>66\%$  ( $P=0,01$ ) os níveis basais de cGMP apresentados no grupo controle, enquanto, o tratamento com SNAC reduziu em  $>62\%$  ( $P=0,02$ ) os níveis de cGMP em relação ao grupo controle. Não houve diferenças significativas na redução dos níveis de cGMP entre os grupos tratados ( $P=0,99$ ).



**Figura – 21.** Avaliação das concentrações teciduais de cGMP em anéis aórticos de ratos com hipertensão L-NAME e tratados com nitrito e S-nitroso N-acetilcisteína (SNAC). A figura 16 mostra a expressão dos níveis de cGMP no tecido aórtico em resposta a hipertensão L-NAME e ao tratamento com drogas de potencial anti-hipertensivo. Os dados são apresentados como média±SEM (n=6/grupo). \**P*<0,05 versus ao grupo controle.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que Nitrito de Sódio e o S-nitroso N-Acetilcisteína reduzem os valores pressóricos provocados pela hipertensão arterial induzida pelo L-NAME. O L-NAME é um análogo competitivo pelo sítio de ligação da L-arginina, responsável por inibir a formação de NO pela eNOS e outras isoformas, resultando no aumento da PA (ZATZ; BAYLIS, 1998), como mostrado no estudo. O uso de L-NAME neste estudo visou primariamente aumentar a PA para que fosse possível evidenciar diferenças de respostas anti-hipertensivas entre a SNAC e o nitrito de sódio administrados por via oral.

Observamos maiores diminuições de PA nos animais tratados com SNAC do que nos animais tratados com nitrito. Em paralelo a estes achados, houve maiores aumentos de RSNO plasmáticos nos animais tratados com SNAC do que nos tratados com nitrito. Contrariamente, houve maior aumento das concentrações de nitrito nos animais tratados com nitrito do que nos animais tratados com SNAC. Conjuntamente, estes achados sugerem haver diminuição da PA proporcionalmente ao aumento das concentrações de RSNO, e não de nitrito plasmático. Inicialmente, este é o principal achado deste estudo.

Embora bastante estudados, os mecanismos pelos quais os produtos do NO reduzem a PA não são totalmente definidos. O mecanismo mais óbvio diz respeito ao aumento da biodisponibilidade de NO ao MLV, promovendo vasodilatação por meio da ativação da guanilato ciclase solúvel (sGC), que produz o GMPc (DENNINGER; MARLETTA, 1999; LIU et al., 2016b) um segundo mensageiro intracelular, mediador do feedback negativo ao tônus vascular através da proteína quinase G (PKG) (FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010; GUIMARAES; BATISTA; TANUS-SANTOS, 2021). Claramente, tanto o nitrito quanto os RSNO podem causar vasodilatação por

promoverem aumentos da formação vascular de NO. No presente estudo, foi avaliada as concentrações vasculares de GMP cíclico, as quais poderiam nos indicar qual das duas drogas testadas poderiam ter ativado mais intensamente esta via NO-GMPc. Nossos resultados mostraram que o nitrito de sódio e o SNAC não conseguiram reverter as reduções de concentrações vasculares de cGMP induzidas pelo tratamento com L-NAME, um inibidor da NOS. O cGMP é um indicador sensível à bioatividade do NO (DERBYSHIRE; MARLETTA, 2012; GEWALTIG; KOJDA, 2002). Além disso, o tônus do tecido do MLV é modulado pelo NO, pois é responsável pela ativação da guanilil ciclase, que produz o cGMP, enzima ativadora da proteína quinase G, que realiza processos contráteis favoráveis ao aumento da PA e redução da biodisponibilidade de NO (LING et al., 2018a). Assim, o aumento de nitrato e nitrito circulante podem levar à formação de RSNO e, conseqüentemente, o aumento na biodisponibilidade de NO, podendo reverter deficiência de NO produzido endogenamente e melhorando o relaxamento dependente do endotélio, como é mostrado na figura 16. Entretanto, este não parece ser o caso do presente estudo, pois observamos redução da pressão arterial com ambas drogas (nitrito e SNAC), porém sem que tenhamos observado aumentos das concentrações de GMPc com ambas as drogas. Estes resultados, em conjunto, sugerem que a ativação da via da Guanilil-ciclase não parece explicar as reduções de pressão arterial induzidas por ambas drogas em estudo.

Um fator que pode ter contribuído para maior diminuição da pressão com SNAC quando comparado com o nitrito talvez seja relacionado às propriedades físico-químicas do SNAC em comparação com os RSNO formados após administração de nitrito de sódio. Isto se justifica porque o SNAC possui maior estabilidade e coeficiente de partição (óleo/água) em relação ao nitrito, o que provavelmente garante efeitos

mais prolongados, degradação mais lenta e melhor permeabilidade entre as membranas biológicas (DE SOUZA et al., 2019; GAUCHER et al., 2012).

Além da via mencionada acima (NO-GMP cíclico), sabe-se que os RSNO podem provocar nitrosação de proteínas contrateis envolvidas no controle da PA, resultando de inibição de enzimas envolvidas em mecanismos contráteis das células musculares lisas vasculares, em particular a proteína quinase C (CHOI; TOSTES; WEBB, 2011; PINHEIRO et al., 2021). Assim, decidimos examinar o grau de nitrosação proteica após tratamento com ambas drogas e observamos que não houve aumento significativo de nitrosação proteica após ambos tratamentos. Isto nos surpreendeu, pois observamos aumentos das concentrações de RSNO circulantes, especialmente com SNAC, sem que pudéssemos observar aumentos da nitrosação proteica vascular. Muito provavelmente, o curto período de tempo de exposição aos aumentos circulantes de RSNO podem não ter sido suficiente para aumentar a nitrosação proteica vascular significativamente. Sugerimos que estudos com exposição mais prolongada a estas drogas possa resultar em aumentos significativos da nitrosação proteica.

Como era esperado, a figura 8 mostra que apenas o Nitrito provoca o aumento das suas concentrações plasmáticas, havendo apenas pequenos aumentos nas concentrações de nitrito plasmático quando tratamos os animais com SNAC. Isso se deve pelo motivo de os RSNO serem produtos formados a partir do Nitrito, e não o contrário (FERREIRA et al., 2021). Por outro lado, o Nitrito é responsável por aumentar a formação de RSNO, pois quando o nitrito é protonado à  $\text{HNO}_2$ , pode ocorrer S-nitrosação de proteínas e de compostos que tenham radicais sulfidríla (S-H) (CACANYIOVA; BERENYIOVA; KRISTEK, 2016). Estes podem, de alguma maneira, causar aumentos das concentrações plasmáticas de RSNO talvez por mecanismos



que envolvam várias espécies químicas relacionadas ao NO no estômago, capazes de nitrosar proteínas no estômago ou até proteínas contidas no sangue perfundindo o estômago, bem como por mecanismos de transnitroação, que envolvem transferência de NO de um composto nitrosotiólico para outro que tenha grupos tióis livres para receber o NO (KÖHLER; OLIVÁN-VIGUERA; WULFF, 2016; SATIN; SCHRODER; CRUMP, 2011)

De fato, nossos resultados sugerem que os efeitos anti-hipertensivos mostrados nesse estudo estejam atrelados a mecanismos oriundos da formação de RSNO e não aos aumentos das concentrações de nitrito plasmático, uma vez que esses efeitos são mais evidentes após receber SNAC. Apoiando esta ideia, é possível sugerir que o Nitrito possa exercer um efeito potencializador aos efeitos vasodilatadores apresentados por RSNO, como sugerem os estudos recentes (LIU et al., 2018; SHPAIZER; KANNER; TIROSH, 2021). Como houve maiores aumentos das concentrações de RSNO após uso de SNAC, pode ter acontecido maior diminuição da PA neste grupo por ter havido maior potencialização das respostas aos RSNO (no caso SNAC) por pequenos aumentos das concentrações de nitrito observadas neste grupo. Em contraste, o oposto foi observado no grupo de animais tratados com nitrito, que mostrou menores diminuições de PA após tratamento (LC et al., 2021). O tempo de tratamento ou falta de sensibilidade do método podem ter limitado e levado a ausência dessa atividade. Contudo, os efeitos hipotensores foram obtidos, mostrando que os outros mecanismos já mencionados possivelmente são os responsáveis por reduzir a PA por meio do SNAC, fortalecido pelos efeitos do Nitrito.

Nossos achados experimentais sobre o grau de nitroação proteica vascular são negativos, pois não houve aumento de nitroação nos grupos tratados. Porém, estes resultados devem ser interpretados com cautela, pois enfocam somente na

nitrosação proteico total das proteínas vasculares. Isto não descarta a possibilidade de ter havido diferença no grau de nitrosação de proteínas específicas quando os dois tratamentos são comparados. Existem estudos que mostram que os RSNO sejam capazes de causar S-nitrosação da PKC, enzima responsável por fosforilar proteínas contráteis e aumentar a biodisponibilidade de Cálcio ( $Ca^{2++}$ ). Ao sofrer S-nitrosação, a PKC tem sua atividade diminuída, podendo explicar os efeitos anti-hipertensivos mais intensos com SNAC do que com nitrito, como já mostrado por (PINHEIRO et al., 2021) e (CHOI; TOSTES; WEBB, 2011).

Nosso estudo mostrou que os tratamentos com nitrito ou com SNAC não diferenciam quanto a capacidade destas drogas de produzir efeitos antioxidantes. Embora a hipertensão por L-NAME não tenha provocado aumento significativo do estresse oxidativo avaliado pelo DHE ou pela capacidade antioxidante total, estudos prévios mostram que o nitrito possui efeitos antioxidantes ao inibir as NOXs, o que diminui as concentrações exacerbadas de EROs, causando melhora da hipertensão renovascular (2R1C) (MONTENEGRO et al., 2011). Também demonstrou-se que o SNAC pode nitrosar a NOX e reduzir o estresse oxidativo (QIAN et al., 2012). Com isso, nossos experimentos focando em medidas de estresse oxidativo vascular foram expandidos com medidas de formação de  $O^2$  e de atividade NOX para examinar mais detalhadamente possíveis efeitos antioxidantes das duas drogas testadas. Isto se justifica as possíveis limitações do método DHE utilizado inicialmente, que pode não revelar adequadamente alterações de estresse oxidativo vascular, como sugerido pela falta de efeitos do tratamento com L-NAME, claramente hipertensor, mas sem efeitos no estresse oxidativo (MONTENEGRO et al., 2014). Nossos resultados são consistentes com essa ideia, como mostrado na figura 15, onde o tratamento nitrito de sódio e SNAC exercem efeitos antioxidantes ao reduzir a produção de EROs ( $O^2$ )

dependente de NOX por meio do ensaio com lucigenina. Em resumo, podemos suspeitar que o tempo curto do nosso modelo experimental possa explicar a falta de alterações significativas nos experimentos realizados com a técnica do DHE, bem como as diminuições similares observadas com ambas drogas (nitrito e SNAC) quanto à atividade de lucigenina. Apesar dos mecanismos não serem ainda totalmente elucidados, há relatos de que o Nitrito age regulando negativamente a NOX, através de mecanismos inibitórios de suas subunidades, além da formação de NO por meio da XOR (LING et al., 2018b; ZOLLBRECHT et al., 2016). Por outro lado, nosso estudo mostrou que o tratamento com nitrito de sódio e SNAC não desempenha ação sobre os mecanismos de EROs independentes avaliada através da técnica de DHE. Podemos imaginar que estes ensaios não tenham sido adequados para evidenciar possíveis diferenças de efeitos antioxidantes produzidos pelas duas drogas em exame, de forma e contribuir para a explicação das diferenças de efeitos hipotensor observas com estas drogas.

## 6 CONCLUSÃO

Enfim, nossos resultados finais permitem sugerir que a diminuição da pressão arterial parece ocorrer em proporção aos aumentos das concentrações de RSNO, e não de nitrito plasmático, sendo mais intensa com SNAC do que com o nitrito de sódio comparados em doses equimolares.

Não pudemos evidenciar mecanismos associados diferenças na formação de GMPc ou mecanismos antioxidantes, nem quanto a diferenças de nitrosação proteica vascular induzidos pelas duas drogas testadas que poderiam explicar a diferença observada quanto ao efeito hipotensor destas drogas. É possível que aumentos das concentrações de nitrito possam potencializar os efeitos vasodilatadores apresentados por RSNO, como sugerem estudos recentes (LIU et al., 2018; SHPAIZER; KANNER; TIROSH, 2021), explicando assim os achados do presente estudo.

## REFERÊNCIAS

ABI-GERGES, Najah; SZABO, Gabor; OTERO, Angela S.; FISCHMEISTER, Rodolphe; MÉRY, Pierre François. NO donors potentiate the beta-adrenergic stimulation of I(Ca,L) and the muscarinic activation of I(K,ACh) in rat cardiac myocytes. **The Journal of physiology**, [S. l.], v. 540, n. Pt 2, p. 411–424, 2002. DOI: 10.1113/JPHYSIOL.2001.012929. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11956332/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

ABU-ALGHAYTH, Mohammed et al. S-nitrosothiols, and other products of nitrate metabolism, are increased in multiple human blood compartments following ingestion of beetroot juice. **Redox biology**, [S. l.], v. 43, 2021. DOI: 10.1016/J.REDOX.2021.101974. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33940546/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

AHERN, Brooke M.; SATIN, Jonathan. The L-type calcium channel current modulation mechanism: the plot thickens and fogs. **The Journal of clinical investigation**, [S. l.], v. 129, n. 2, p. 496–498, 2019. DOI: 10.1172/JCI125958. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30614816/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

AMARAL, Jefferson H.; FERREIRA, Grazielle C.; PINHEIRO, Lucas C.; MONTENEGRO, Marcelo F.; TANUS-SANTOS, Jose E. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. **Redox Biology**, [S. l.], v. 5, p. 340, 2015. DOI: 10.1016/J.REDOX.2015.06.009. Disponível em: </pmc/articles/PMC4491646/>. Acesso em: 21 jun. 2022.

AMARAL, Jefferson H.; MONTENEGRO, Marcelo F.; PINHEIRO, Lucas C.; FERREIRA, Grazielle C.; BARROSO, Rafael P.; COSTA-FILHO, Antonio J.; TANUS-SANTOS, Jose E. TEMPOL enhances the antihypertensive effects of sodium nitrite by mechanisms facilitating nitrite-derived gastric nitric oxide formation. **Free radical biology & medicine**, [S. l.], v. 65, p. 446–455, 2013. DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.07.032. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23892053/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

APOSTOLI, G. L.; SOLOMON, A.; SMALLWOOD, M. J.; WINYARD, P. G.; EMERSON, M. Role of inorganic nitrate and nitrite in driving nitric oxide-cGMP-mediated inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo. **Journal of thrombosis and haemostasis: JTH**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 1880–1889, 2014. DOI: 10.1111/JTH.12711. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25163536/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

ARCHER, Stephen L.; HUANG, James M. C.; HAMPL, Václav; NELSON, Daniel P.; SHULTZ, Pamela J.; WEIR, E. Kenneth. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **PNAS**, [S. l.], v. 91, n. 16, p. 7583–7587, 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.16.7583.

BARRETTO-DE-SOUZA, Lucas; ADAMI, Mariane B.; OLIVEIRA, Leandro A.; GOMES-DE-SOUZA, Lucas; DUARTE, Josiane O.; ALMEIDA, Jeferson; CRESTANI, Carlos C. Nitric oxide-cGMP-PKG signaling in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the cardiovascular responses to stress in male rats. **European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 75–84, 2018. DOI: 10.1016/J.EURONEURO.2017.11.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29169825/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

BELCASTRO, E.; WU, W.; FRIES-RAETH, I.; CORTI, A.; POMPELLA, A.; LEROY, P.; LARTAUD, I.; GAUCHER, C. Oxidative stress enhances and modulates protein S-nitrosation in smooth muscle cells exposed to S-nitrosoglutathione. **Nitric oxide: biology and chemistry**, [S. l.], v. 69, p. 10–21, 2017. DOI: 10.1016/J.NIOX.2017.07.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28743484/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

BENJAMIN, Emelia J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, [S. l.], v. 137, n. 12, p. E67–E492, 2018. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000558. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/cir.0000000000000558>. Acesso em: 26 abr. 2022.

BENJAMIN, N.; VANE, J. Nitric oxide and hypertension. **Circulation**, [S. l.], v. 94, n. 6, p. 1197–1198, 1996. DOI: 10.1161/01.CIR.94.6.1197. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8822966/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

BOHLEN, Harold Glenn. Nitric oxide and the cardiovascular system. **Comprehensive Physiology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 803–828, 2015. DOI: 10.1002/CPHY.C140052. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25880514/>. Acesso em: 12 maio. 2022.

BOLAÑOS, Juan P.; ALMEIDA, Angeles. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1411, n. 2–3, p. 415–436, 1999. DOI: 10.1016/S0005-2728(99)00030-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10320673/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

BRONIOWSKA, Katarzyna A.; HOGG, Neil. The chemical biology of S-nitrosothiols. **Antioxidants & redox signaling**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. 969–980, 2012. DOI: 10.1089/ARS.2012.4590. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22468855/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

BROSNAN, Margaret E.; BROSNAN, John T. Renal arginine metabolism. **The Journal of nutrition**, [S. l.], v. 134, n. 10 Suppl, 2004. DOI: 10.1093/JN/134.10.2791S. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15465786/>. Acesso em: 26 abr. 2022.

BRYAN, Nathan S.; CALVERT, John W.; ELROD, John W.; GUNDEWAR, Susheel; SANG, Yong Ji; LEFER, David J. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 104, n. 48, p. 19144–19149, 2007. DOI: 10.1073/PNAS.0706579104. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18025468/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

BRYAN, Nathan S.; RASSAF, Tienush; MALONEY, Ronald E.; RODRIGUEZ, Cynthia M.; SAIJO, Fumito; RODRIGUEZ, Juan R.; FEELISCH, Martin. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

**America**, [S. l.], v. 101, n. 12, p. 4308–4313, 2004. DOI: 10.1073/PNAS.0306706101. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15014175/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

CABANDUGAMA, Peminda K.; GARDNER, Michael J.; SOWERS, James R. The Renin Angiotensin Aldosterone System in Obesity and Hypertension: Roles in the Cardiorenal Metabolic Syndrome. **Medical Clinics**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 129–137, 2017. DOI: 10.1016/J.MCNA.2016.08.009. Disponível em: <http://www.medical.theclinics.com/article/S002571251637328X/fulltext>. Acesso em: 26 abr. 2022.

CACANYIOVA, S.; BERENYIOVA, A.; KRISTEK, F. The role of hydrogen sulphide in blood pressure regulation. **Physiological research**, [S. l.], v. 65, n. Suppl 3, p. S273–S289, 2016. DOI: 10.33549/PHYSIOLRES.933438. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27775417/>. Acesso em: 29 nov. 2021.

CARNICER, Ricardo; CRABTREE, Mark J.; SIVAKUMARAN, Vidhya; CASADEI, Barbara; KASS, David A. Nitric oxide synthases in heart failure. **Antioxidants & redox signaling**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 1078–1099, 2013. DOI: 10.1089/ARS.2012.4824. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22871241/>. Acesso em: 9 maio. 2022.

CARR, Anitra C.; FREI, Balz. The nitric oxide congener nitrite inhibits myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup>-mediated modification of low density lipoprotein. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 276, n. 3, p. 1822–1828, 2001. DOI: 10.1074/JBC.M009082200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11054430/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

CARRIER, Gerald O.; FUCHS, Leslie C.; WINECOFF, Allison P.; GIULUMIAN, Ararat D.; WHITE, Richard E. Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of Ca-activated K channels. **The American journal of physiology**, [S. l.], v. 273, n. 1 Pt 2, 1997. DOI: 10.1152/AJPHEART.1997.273.1.H76. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9249477/>. Acesso em: 22 abr. 2022.

CASTIGLIONE, Nicoletta; RINALDO, Serena; GIARDINA, Giorgio; STELITANO, Valentina; CUTRUZZOLÀ, Francesca. Nitrite and nitrite reductases: from molecular



mechanisms to significance in human health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 684–716, 2012. DOI: 10.1089/ARS.2011.4196. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22304560/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

CAUWELS, A. Nitric oxide in shock. **Kidney International**, [S. l.], v. 72, n. 5, p. 557–565, 2007. DOI: 10.1038/SJ.KI.5002340.

CHATTERJI, Ajanta; SENGUPTA, Rajib. Stability of S-nitrosothiols and S-nitrosylated proteins: A struggle for cellular existence! **Journal of cellular biochemistry**, [S. l.], v. 122, n. 11, p. 1579–1593, 2021. DOI: 10.1002/JCB.30139. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34472139/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

CHEN, Yu; IRIE, Yoshifumi; KEUNG, Wing Ming; MARET, Wolfgang. S-nitrosothiols react preferentially with zinc thiolate clusters of metallothionein III through transnitrosation. **Biochemistry**, [S. l.], v. 41, n. 26, p. 8360–8367, 2002. DOI: 10.1021/bi020030+. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12081484/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

CHILDERS, Kenneth C.; GARCIN, Elsa D. Structure/function of the soluble guanylyl cyclase catalytic domain. **Nitric oxide : biology and chemistry**, [S. l.], v. 77, p. 53–64, 2018. DOI: 10.1016/J.NIOX.2018.04.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29702251/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

CHOI, Hyehun; TOSTES, Rita C.; WEBB, R. Clinton. S-nitrosylation Inhibits protein kinase C-mediated contraction in mouse aorta. **Journal of cardiovascular pharmacology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 65–71, 2011. DOI: 10.1097/FJC.0B013E3181FEF9CB. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20966762/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

CINELLI, Maris A.; DO, Ha T.; MILEY, Galen P.; SILVERMAN, Richard B. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. **Medicinal research reviews**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 158–189, 2020. DOI: 10.1002/MED.21599. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31192483/>. Acesso em: 9 maio. 2022.

COLES, Leah T.; CLIFTON, Peter M. Effect of beetroot juice on lowering blood pressure in free-living, disease-free adults: a randomized, placebo-controlled trial. **Nutrition journal**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2012. DOI: 10.1186/1475-2891-11-106. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23231777/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

CORBALÁN, R.; MONTOLIU, C.; MIÑANA, M. D.; DEL OLMO, J. A.; SERRA, M. A.; APARISI, L.; RODRIGO, J. M.; FELIPO, V. Altered modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in patients with liver disease. **Metabolic brain disease**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 295–301, 2002. DOI: 10.1023/A:1021953717331. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12602506/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

COSBY, Kenyatta et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature medicine**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1498–1505, 2003. DOI: 10.1038/NM954. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14595407/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

CUI, Hao; FENG, Yuanyong; SHU, Chuanliang; YUAN, Rongtao; BU, Lingxue; JIA, Muyun; PANG, Baoxing. Dietary Nitrate Protects Against Skin Flap Ischemia-Reperfusion Injury in Rats via Modulation of Antioxidative Action and Reduction of Inflammatory Responses. **Frontiers in pharmacology**, [S. l.], v. 10, 2020. DOI: 10.3389/FPHAR.2019.01605. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32038262/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

CYR, Anthony R.; HUCKABY, Lauren V.; SHIVA, Sruti S.; ZUCKERBRAUN, Brian S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Critical care clinics**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 307–321, 2020. DOI: 10.1016/J.CCC.2019.12.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32172815/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

DAMACENA-ANGELIS, Célio; OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H.; PINHEIRO, Lucas C.; CREVELIN, Eduardo J.; PORTELLA, Rafael L.; MORAES, Luiz Alberto B.; TANUS-SANTOS, Jose E. Nitrate decreases xanthine oxidoreductase-mediated nitrite reductase activity and attenuates vascular and blood pressure responses to nitrite.

**Redox biology**, [S. l.], v. 12, p. 291–299, 2017. DOI: 10.1016/J.REDOX.2017.03.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28285190/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; SNYDER, S. H. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. **Annals of neurology**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 297–311, 1992. DOI: 10.1002/ANA.410320302. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1384420/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

DE SOUZA, Gabriela Freitas P.; DENADAI, Jaqueline Priscilla; PICHETH, Guilherme F.; DE OLIVEIRA, Marcelo Ganzarolli. Long-term decomposition of aqueous S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine: Influence of concentration, temperature, pH and light. **Nitric oxide : biology and chemistry**, [S. l.], v. 84, p. 30–37, 2019. DOI: 10.1016/J.NIOX.2019.01.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30630056/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

DENNINGER, John W.; MARLETTA, Michael A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1411, n. 2–3, p. 334–350, 1999. DOI: 10.1016/S0005-2728(99)00024-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10320667/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

DENNIS LEO, M.; BULLEY, Simon; BANNISTER, John P.; KURUVILLA, Korah P.; NARAYANAN, Damodaran; JAGGAR, Jonathan H. Angiotensin II stimulates internalization and degradation of arterial myocyte plasma membrane BK channels to induce vasoconstriction. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [S. l.], v. 309, n. 6, p. C392–C402, 2015. DOI: 10.1152/ajpcell.00127.2015.

DERBYSHIRE, Emily R.; MARLETTA, Michael A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. **Annual Review of Biochemistry**, [S. l.], v. 81, p. 533–559, 2012. DOI: 10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-050410-100030.

DIKALOVA, Anna; ASCHNER, Judy L.; KAPLOWITZ, Mark R.; CUNNINGHAM, Gary; SUMMAR, Marshall; FIKE, Candice D. Combined L-citrulline and tetrahydrobiopterin therapy improves NO signaling and ameliorates chronic hypoxia-induced pulmonary

hypertension in newborn pigs. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, [S. l.], v. 318, n. 4, p. L762–L772, 2020. DOI: 10.1152/AJPLUNG.00280.2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32073878/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

DINARTI, Lucia Kris; HARTOPO, Anggoro Budi; ANGGRAHINI, Dyah Wulan; SADEWA, Ahmad Hamim; SETIANTO, Budi Yuli; WAHAB, Abdus Samik. Profile of Endothelin-1, Nitric Oxide, and Prostacyclin Levels in Pulmonary Arterial Hypertension Related to Uncorrected Atrial Septal Defect: Results from a Single Center Study in Indonesia. **Cardiology research and practice**, [S. l.], v. 2020, 2020. DOI: 10.1155/2020/7526508. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32377429/>. Acesso em: 4 maio. 2022.

ECKERS, A.; ALTSCHMIED, J.; HAENDELER, J. [Oxidative stress in endothelial cells and in diabetes type 2]. **Zeitschrift fur Gerontologie und Geriatrie**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 90–94, 2012. DOI: 10.1007/S00391-011-0277-Z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22262415/>. Acesso em: 4 maio. 2022.

FARAH, C.; NASCIMENTO, A.; BOLEA, G.; MEYER, G.; GAYRARD, S.; LACAMPAGNE, A.; CAZORLA, O.; REBOUL, C. Key role of endothelium in the eNOS-dependent cardioprotection with exercise training. **Journal of molecular and cellular cardiology**, [S. l.], v. 102, p. 26–30, 2017. DOI: 10.1016/J.YJMCC.2016.11.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27866931/>. Acesso em: 9 maio. 2022.

FARAH, Charlotte; MICHEL, Lauriane Y. M.; BALLIGAND, Jean Luc. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, [S. l.], v. 15, n. 5, p. 292–316, 2018. DOI: 10.1038/NRCARDIO.2017.224.

FENG, Xiujing; SUN, Tingzhe; BEI, Yuncheng; DING, Sen; ZHENG, Wei; LU, Yan; SHEN, Pingping. S-nitrosylation of ERK inhibits ERK phosphorylation and induces apoptosis. **Scientific reports**, [S. l.], v. 3, 2013. DOI: 10.1038/SREP01814. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23657295/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

FERREIRA, Grazielle C.; PINHEIRO, Lucas C.; OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H.;

ANGELIS, Célio D.; PORTELLA, Rafael L.; TANUS-SANTOS, Jose E. Antioxidant tempol modulates the increases in tissue nitric oxide metabolites concentrations after oral nitrite administration. **Chemico-biological interactions**, [S. l.], v. 349, 2021. DOI: 10.1016/J.CBI.2021.109658. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34543659/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

FÖRSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, [S. l.], v. 33, n. 7, 2012. DOI: 10.1093/EURHEARTJ/EHR304. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21890489/>. Acesso em: 9 maio. 2022.

FÖRSTERMANN, Ulrich; XIA, Ning; LI, Huige. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Circulation research**, [S. l.], v. 120, n. 4, p. 713–735, 2017. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28209797/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

FRANCIS, Sharron H.; BUSCH, Jennifer L.; CORBIN, Jackie D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological reviews**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 525–563, 2010. DOI: 10.1124/PR.110.002907. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20716671/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

GANGULY, Paul; ALAM, Sreyoshi Fatima. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. **Nutrition journal**, [S. l.], v. 14, n. 1, 2015. DOI: 10.1186/1475-2891-14-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25577237/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

GAUCHER, Caroline; BOUDIER, Ariane; DAHBOUL, Fatima; PARENT, Marianne; LEROY, Pierre. S-nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and Concepts for the Rational Design of S-nitrosothiols. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 458–472, 2012. DOI: 10.2174/13816128130312.

GAUCHER, Caroline; BOUDIER, Ariane; DAHBOUL, Fatima; PARENT, Marianne; LEROY, Pierre. S-nitrosation/Denitrosation in Cardiovascular Pathologies: Facts and

Concepts for the Rational Design of S-nitrosothiols. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 458–472, 2013. DOI: 10.2174/1381612811306030458.

GAZYAKAN, Emre; HIRCHE, Christoph; REICHENBERGER, Matthias A.; URBACH, Olena; GERMANN, Günter; ENGEL, Holger. Modulation of Nitric Oxide Bioavailability Attenuates Ischemia-Reperfusion Injury in Type II Diabetes. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 183–191, 2021. DOI: 10.1016/J.BJPS.2020.08.021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32893152/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

GEWALTIG, Michael T.; KOJDA, Georg. Vasoprotection by nitric oxide: Mechanisms and therapeutic potential. **Cardiovascular Research**, [S. l.], v. 55, n. 2, p. 250–260, 2002. DOI: 10.1016/S0008-6363(02)00327-9.

GIERHARDT, Mareike; PAK, Oleg; WALMRATH, Dieter; SEEGER, Werner; GRIMMINGER, Friedrich; GHOFrani, Hossein A.; WEISSMANN, Norbert; HECKER, Matthias; SOMMER, Natascha. Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in acute respiratory distress syndrome. **European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society**, [S. l.], v. 30, n. 161, 2021. DOI: 10.1183/16000617.0059-2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34526314/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

GIMBRONE, Michael A.; GARCÍA-CARDEÑA, Guillermo. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. **Circulation research**, [S. l.], v. 118, n. 4, p. 620–636, 2016. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26892962/>. Acesso em: 12 maio. 2022.

GIORGIONE, Jennifer R.; LIN, Jung Hsin; MCCAMMON, J. Andrew; NEWTON, Alexandra C. Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase Cdelta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 281, n. 3, p. 1660–1669, 2006. DOI: 10.1074/JBC.M510251200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16293612/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

GLADWIN, Mark T. et al. The emerging biology of the nitrite anion. **Nature chemical biology**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 308–314, 2005. DOI: 10.1038/NCHEMBIO1105-308. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16408064/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

GONÇALVES, Diego Assis; JASIULIONIS, Miriam Galvonas; DE MELO, Fabiana Henriques Machado. The Role of the BH4 Cofactor in Nitric Oxide Synthase Activity and Cancer Progression: Two Sides of the Same Coin. **International journal of molecular sciences**, [S. l.], v. 22, n. 17, 2021. DOI: 10.3390/IJMS22179546. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34502450/>. Acesso em: 9 maio. 2022.

GONG, Xun; MA, Yi; RUAN, Yunjun; FU, Guohua; WU, Saizhu. Long-term atorvastatin improves age-related endothelial dysfunction by ameliorating oxidative stress and normalizing eNOS/iNOS imbalance in rat aorta. **Experimental gerontology**, [S. l.], v. 52, p. 9–17, 2014. DOI: 10.1016/J.EXGER.2014.01.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24463049/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

GONZALEZ, Daniel R.; TREUER, Adriana; SUN, Qi An; STAMLER, Jonathan S.; HARE, Joshua M. S-nitrosylation of cardiac ion channels. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [S. l.], v. 54, n. 3, p. 188, 2009. DOI: 10.1097/FJC.0B013E3181B72C9F. Disponível em: </pmc/articles/PMC3390783/>. Acesso em: 22 abr. 2022.

GOSSE, Philippe; CREMER, Antoine; VIRCOULON, Marion; COULON, Paul; JAN, Emilie; PAPAIOANNOU, Georgios; YEIM, Sunthareth. Prognostic value of the extent of left ventricular hypertrophy and its evolution in the hypertensive patient. **Journal of Hypertension**, [S. l.], v. 30, n. 12, p. 2403–2409, 2012. DOI: 10.1097/HJH.0B013E3283593029. Disponível em: [https://journals.lww.com/jhypertension/Fulltext/2012/12000/Prognostic\\_value\\_of\\_the\\_extent\\_of\\_left\\_ventricular.23.aspx](https://journals.lww.com/jhypertension/Fulltext/2012/12000/Prognostic_value_of_the_extent_of_left_ventricular.23.aspx). Acesso em: 25 abr. 2022.

GRASSI, Guido; MARK, Allyn; ESLER, Murray. The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. **Circulation Research**, [S. l.], v. 116, n. 6, p. 976–990, 2015. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303604. Disponível em:

<https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.116.303604>. Acesso em: 25 abr. 2022.

GRAY, Stephen P.; SHAH, Ajay M.; SMYRNIAS, Ioannis. NADPH oxidase 4 and its role in the cardiovascular system. **Vascular biology (Bristol, England)**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. H59–H66, 2019. DOI: 10.1530/VB-19-0014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32923955/>. Acesso em: 9 maio. 2022.

GROSS, P. L.; AIRD, W. C. The endothelium and thrombosis. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 463–478, 2000. DOI: 10.1055/S-2000-13202. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11129402/>. Acesso em: 4 maio. 2022.

GUIMARAES, Danielle A.; BATISTA, Rose I. M.; TANUS-SANTOS, Jose E. Nitrate and nitrite-based therapy to attenuate cardiovascular remodelling in arterial hypertension. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, [S. l.], v. 128, n. 1, p. 9–17, 2021. DOI: 10.1111/BCPT.13474. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32772466/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

HELD, Kara F.; DOSTMANN, Wolfgang R. Sub-Nanomolar Sensitivity of Nitric Oxide Mediated Regulation of cGMP and Vasomotor Reactivity in Vascular Smooth Muscle. **Frontiers in pharmacology**, [S. l.], v. 3, 2012. DOI: 10.3389/FPHAR.2012.00130. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22807915/>. Acesso em: 12 maio. 2022.

HESS, Douglas T.; MATSUMOTO, Akio; KIM, Sung Oog; MARSHALL, Harvey E.; STAMLER, Jonathan S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2005 6:2**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 150–166, 2005. DOI: 10.1038/nrm1569. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm1569>. Acesso em: 22 abr. 2022.

HILGERS, Rob H. P.; KUNDUMANI-SRIDHARAN, Venkatesh; SUBRAMANI, Jaganathan; CHEN, Leon C.; CUELLO, Luis G.; RUSCH, Nancy J.; DAS, Kumuda C. Thioredoxin reverses age-related hypertension by chronically improving vascular



redox and restoring eNOS function. **Science translational medicine**, [S. l.], v. 9, n. 376, 2017. DOI: 10.1126/SCITRANSLMED.AAF6094. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28179506/>. Acesso em: 9 maio. 2022.

HORNYK, Istvn; MAROSI, Krisztina; KISS, Levente; GRÓF, Pál; LACZA, Zsombor. Increased stability of S-nitrosothiol solutions via pH modulations. **Free radical research**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 214–225, 2012. DOI: 10.3109/10715762.2011.647692. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22149535/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

HORTON, Austin; SCHIEFER, Isaac T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nitric oxide mimetic agents. **Nitric oxide : biology and chemistry**, [S. l.], v. 84, p. 69–78, 2019. DOI: 10.1016/J.NIOX.2019.01.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30641123/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

HU, Hai; CHIAMVIMONVAT, Nipavan; YAMAGISHI, Toshio; MARBAN, Eduardo. Direct inhibition of expressed cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels by S-nitrosothiol nitric oxide donors. **Circulation research**, [S. l.], v. 81, n. 5, p. 742–752, 1997. DOI: 10.1161/01.RES.81.5.742. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9351448/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

HUGHAN, Kara S.; LEVINE, Andrea; HELBLING, Nicole; ANTHONY, Steven; DELANY, James P.; STEFANOVIC-RACIC, Maja; GOODPASTER, Bret H.; GLADWIN, Mark T. Effects of Oral Sodium Nitrite on Blood Pressure, Insulin Sensitivity, and Intima-Media Arterial Thickening in Adults With Hypertension and Metabolic Syndrome. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, [S. l.], v. 76, n. 3, p. 866–874, 2020. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.14930. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32755471/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

IDIGO, Winifred O.; REILLY, Svetlana; ZHANG, Mei Hua; ZHANG, Yin Hua; JAYARAM, Raja; CARNICER, Ricardo; CRABTREE, Mark J.; BALLIGAND, Jean Luc; CASADEI, Barbara. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase (NOS) S-glutathionylation by neuronal NOS: evidence of a functional interaction between myocardial constitutive NOS isoforms. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 287, n. 52, p. 43665–43673, 2012. DOI: 10.1074/JBC.M112.412031. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23091050/>. Acesso em: 9 maio. 2022.

INCALZA, Maria Angela; D'ORIA, Rossella; NATALICCHIO, Annalisa; PERRINI, Sebastio; LAVIOLA, Luigi; GIORGINO, Francesco. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular pharmacology**, [S. l.], v. 100, p. 1–19, 2018. DOI: 10.1016/J.VPH.2017.05.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28579545/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

INFANTE, Teresa; COSTA, Dario; NAPOLI, Claudio. Novel Insights Regarding Nitric Oxide and Cardiovascular Diseases. **Angiology**, [S. l.], v. 72, n. 5, p. 411–425, 2021. DOI: 10.1177/0003319720979243. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33478246/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

JELANI, Qurat UI Ain; NORCLIFFE-KAUFMANN, Lucy; KAUFMANN, Horacio; KATZ, Stuart D. Vascular endothelial function and blood pressure regulation in afferent autonomic failure. **American journal of hypertension**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 166–172, 2015. DOI: 10.1093/AJH/HPU144. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25128693/>. Acesso em: 4 maio. 2022.

JONES, Andrew M.; VANHATALO, Anni; SEALS, Douglas R.; ROSSMAN, Matthew J.; PIKNOVA, Barbora; JONVIK, Kristin L. Dietary Nitrate and Nitric Oxide Metabolism: Mouth, Circulation, Skeletal Muscle, and Exercise Performance. **Medicine and science in sports and exercise**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 280–294, 2021. DOI: 10.1249/MSS.0000000000002470. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32735111/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

JOURD'HEUIL, Frances L. et al. Redox-sensitivity and site-specificity of S- and N-denitrosation in proteins. **PloS one**, [S. l.], v. 5, n. 12, 2010. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0014400. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21203591/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

KAPIL, V.; WEBB, A. J.; AHLUWALIA, Amrita. Inorganic nitrate and the cardiovascular system. **Heart (British Cardiac Society)**, [S. l.], v. 96, n. 21, p. 1703–1709, 2010. DOI:

10.1136/HRT.2009.180372.

Disponível

em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20736204/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

KAPIL, V.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O.; AHLUWALIA, A. Clinical evidence demonstrating the utility of inorganic nitrate in cardiovascular health. **Nitric Oxide**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 45–57, 2014. DOI: 10.1016/J.NIOX.2014.03.162.

KAPIL, Vikas; KHAMBATA, Rayomand S.; ROBERTSON, Amy; CAULFIELD, Mark J.; AHLUWALIA, Amrita. Dietary nitrate provides sustained blood pressure lowering in hypertensive patients: a randomized, phase 2, double-blind, placebo-controlled study. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 320–327, 2015. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04675.

Disponível

em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25421976/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

KEMP-HARPER, Barbara K.; VELAGIC, Anida; PAOLOCCI, Nazareno; HOROWITZ, John D.; RITCHIE, Rebecca H. Cardiovascular Therapeutic Potential of the Redox Siblings, Nitric Oxide (NO•) and Nitroxyl (HNO), in the Setting of Reactive Oxygen Species Dysregulation. **Handbook of experimental pharmacology**, [S. l.], v. 264, p. 311–337, 2021. DOI: 10.1007/164\_2020\_389.

Disponível

em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32813078/>. Acesso em: 12 maio. 2022.

KHAMMY, Makhala Michell et al. PDE1A inhibition elicits cGMP-dependent relaxation of rat mesenteric arteries. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 174, n. 22, p. 4186–4198, 2017. DOI: 10.1111/BPH.14034.

Disponível

em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28910498/>. Acesso em: 12 maio. 2022.

KÖHLER, R.; OLIVÁN-VIGUERA, A.; WULFF, H. Endothelial Small- and Intermediate-Conductance K Channels and Endothelium-Dependent Hyperpolarization as Drug Targets in Cardiovascular Disease. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, [S. l.], v. 77, p. 65–104, 2016. DOI: 10.1016/BS.APHA.2016.04.002.

Disponível

em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27451095/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

KUMAR, Murugaeson R.; CLOVER, Tara; OLAITAN, Abayomi D.; BECKER, Christopher; SOLOUKI, Touradj; FARMER, Patrick J. The reaction between GSNO

and H<sub>2</sub>S: On the generation of NO, HNO and N<sub>2</sub>O. **Nitric oxide: biology and chemistry**, [S. l.], v. 77, p. 96–105, 2018. DOI: 10.1016/J.NIOX.2018.04.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29704568/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

KUMAR, Sarwareddy Kartik; MANI, Krishna Priya. Endocan alters nitric oxide production in endothelial cells by targeting AKT/eNOS and NFκB/iNOS signaling. **Nitric oxide: biology and chemistry**, [S. l.], v. 117, p. 26–33, 2021. DOI: 10.1016/J.NIOX.2021.09.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34592471/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

KWAN, Hiu Yee; HUANG, Yu; YAO, Xiaoqiang. Store-operated calcium entry in vascular endothelial cells is inhibited by cGMP via a protein kinase G-dependent mechanism. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 275, n. 10, p. 6758–6163, 2000. DOI: 10.1074/JBC.275.10.6758. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10702231/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

KWON, Nyoun Soo; NATHAN, Carl F.; GILKER, Charles; GRIFFITH, Owen W.; MATTHEWS, Dwight E.; STUEHRE, Dennis J. L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 265, n. 23, p. 13442–13445, 1990. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)77366-3.

LABARTHE, Darwin R.; DUNBAR, Sandra B. Global cardiovascular health promotion and disease prevention: 2011 and beyond. **Circulation**, [S. l.], v. 125, n. 21, p. 2667–2676, 2012. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087726. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087726>. Acesso em: 25 abr. 2022.

LC, Pinheiro; GC, Ferreira; JH, Amaral; RL, Portella; SOC, Tella; MA, Passos; JE, Tanus-Santos. Oral nitrite circumvents antiseptic mouthwash-induced disruption of enterosalivary circuit of nitrate and promotes nitrosation and blood pressure lowering effect. **Free radical biology & medicine**, [S. l.], v. 101, p. 226–235, 2016. DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.10.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27769921/>. Acesso em: 8 ago. 2021.

LC, Pinheiro; GH, Oliveira-Paula; GC, Ferreira; T, Dal-Cin de Paula; DA, Duarte; CM, Costa-Neto; JE, Tanus-Santos. Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II. **Redox biology**, [S. l.], v. 38, 2021. DOI: 10.1016/J.REDOX.2020.101769. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33126056/>. Acesso em: 8 ago. 2021.

LEI, Yen Ping; LIU, Cheng Tzu; SHEEN, Lee Yan; CHEN, Haw Wen; LII, Chong Kuei. Diallyl disulfide and diallyl trisulfide protect endothelial nitric oxide synthase against damage by oxidized low-density lipoprotein. **Molecular nutrition & food research**, [S. l.], v. 54 Suppl 1, n. SUPPL. 1, 2010. DOI: 10.1002/MNFR.200900278. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20229525/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

LENZ, Johannes C.; PETER REUSCH, H.; ALBRECHT, Nadine; SCHULTZ, Günter; SCHAEFER, Michael. Ca<sup>2+</sup>-controlled competitive diacylglycerol binding of protein kinase C isoenzymes in living cells. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 159, n. 2, p. 291–301, 2002. DOI: 10.1083/JCB.200203048. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12391024/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

LEVY, Finn Olav. Cardiac PDEs and crosstalk between cAMP and cGMP signalling pathways in the regulation of contractility. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [S. l.], v. 386, n. 8, p. 665–670, 2013. DOI: 10.1007/S00210-013-0874-Z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23649864/>. Acesso em: 12 maio. 2022.

LING, Wei Chih; MUSTAFA, Mohd Rais; VANHOUTTE, Paul M.; MURUGAN, Dharmani Devi. Chronic administration of sodium nitrite prevents hypertension and protects arterial endothelial function by reducing oxidative stress in angiotensin II-infused mice. **Vascular pharmacology**, [S. l.], v. 102, p. 11–20, 2018. a. DOI: 10.1016/J.VPH.2017.05.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28552746/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

LISSI, Eduardo; SALIM-HANNA, Marta; PASCUAL, Carlos; DEL CASTILLO, Maria D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from

luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 153–158, 1995. DOI: 10.1016/0891-5849(94)00117-3.

LIU, Taiming et al. Nitrite potentiates the vasodilatory signaling of S-nitrosothiols. **Nitric oxide: biology and chemistry**, [S. l.], v. 75, p. 60–69, 2018. DOI: 10.1016/J.NIOX.2018.01.011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29428841/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

LIU, Taiming; SCHROEDER, Hobe J.; ZHANG, Meijuan; WILSON, Sean M.; TERRY, Michael H.; LONGO, Lawrence D.; POWER, Gordon G.; BLOOD, Arlin B. S-nitrosothiols dilate the mesenteric artery more potently than the femoral artery by a cGMP and L-type calcium channel-dependent mechanism. **Nitric Oxide**, [S. l.], v. 58, p. 20–27, 2016. b. DOI: 10.1016/J.NIOX.2016.05.006.

LIU, Yang et al. **Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. The European respiratory journal** NLM (Medline), , 2020. DOI: 10.1183/13993003.01112-2020.

LLORENS, S.; JORDÁN, J.; NAVA, Eduardo. The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. **Journal of physiology and biochemistry**, [S. l.], v. 58, n. 3, p. 179–188, 2002. DOI: 10.1007/BF03179855. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12603012/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

LOHMEIER, Thomas E.; IRWIN, Eric D.; ROSSING, Martin A.; SERDAR, David J.; KIEVAL, Robert S. Prolonged Activation of the Baroreflex Produces Sustained Hypotension. *In*: HYPERTENSION 2004, **Anais [...]**. : Lippincott Williams & Wilkins , 2004. p. 306–311. DOI: 10.1161/01.HYP.0000111837.73693.9b.

LU, Hongbin; QIN, Ling; CHEUNG, Winghoi; LEE, Kwongman; WONG, Wannar; LEUNG, Kwoksui. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Accelerated Bone-Tendon Junction Healing Through Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Cartilage Formation. **Ultrasound in Medicine and Biology**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1248–1260, 2008. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2008.01.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18378382/>. Acesso em: 12 dez. 2020.

LUNDBERG, Jon O. et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. **Nature chemical biology**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 865–869, 2009. DOI: 10.1038/NCHEMBIO.260. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19915529/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

LUNDBERG, Jon O.; GLADWIN, Mark T.; WEITZBERG, Eddie. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature reviews. Drug discovery**, [S. l.], v. 14, n. 9, p. 623–641, 2015. DOI: 10.1038/NRD4623. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26265312/>. Acesso em: 21 jun. 2022.

LUNDBERG, Jon O.; WEITZBERG, Eddie; GLADWIN, Mark T. Th[1] Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:156–67. <https://doi.org/10.1038/NRD2466.e> nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature reviews. Drug discovery**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 156–167, 2008. DOI: 10.1038/NRD2466. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18167491/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

LV, Man Hua; LI, Shi; JIANG, Yong Jia; ZHANG, Wei. The Sphk1/SIP pathway regulates angiogenesis via NOS/NO synthesis following cerebral ischemia-reperfusion. **CNS neuroscience & therapeutics**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 538–548, 2020. DOI: 10.1111/CNS.13275. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31814336/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

MANCIA, Giuseppe; GRASSI, Guido. The autonomic nervous system and hypertension. **Circulation Research**, [S. l.], v. 114, n. 11, p. 1804–1814, 2014. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302524. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/abs/10.1161/CIRCRESAHA.114.302524>. Acesso em: 25 abr. 2022.

MANDRAS, Stacy; KOVACS, Gabor; OLSCHIEWSKI, Horst; BRODERICK, Meredith; NELSEN, Andrew; SHEN, Eric; CHAMPION, Hunter. Combination Therapy in Pulmonary Arterial Hypertension-Targeting the Nitric Oxide and Prostacyclin

Pathways. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 453–462, 2021. DOI: 10.1177/10742484211006531. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33836637/>. Acesso em: 4 maio. 2022.

MEYER, Benjamin; GENONI, Alessandro; BOUDIER, Ariane; LEROY, Pierre; RUIZ-LOPEZ, Manuel F. Structure and Stability Studies of Pharmacologically Relevant S-Nitrosothiols: A Theoretical Approach. **The journal of physical chemistry. A**, [S. l.], v. 120, n. 24, p. 4191–4200, 2016. DOI: 10.1021/ACS.JPCA.6B02230. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27249061/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

MINAMISHIMA, Shizuka et al. Inhaled nitric oxide improves outcomes after successful cardiopulmonary resuscitation in mice. **Circulation**, [S. l.], v. 124, n. 15, p. 1645–1653, 2011. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.025395. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21931083/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

MINAMISHIMA, Shizuka; BOUGAKI, Masahiko; SIPS, Patrick Y.; DE YU, Jia; MINAMISHIMA, Yoji Andrew; ELROD, John W.; LEFER, David J.; BLOCH, Kenneth D.; ICHINOSE, Fumito. Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. **Circulation**, [S. l.], v. 120, n. 10, p. 888–896, 2009. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.833491. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19704099/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

MIRABITO COLAFELLA, Katrina M.; BOVÉE, Dominique M.; DANSER, A. H. Ja. The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. **Experimental eye research**, [S. l.], v. 186, 2019. DOI: 10.1016/J.EXER.2019.05.020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31129252/>. Acesso em: 26 abr. 2022.

MITROKHIN, M. V.; KALSIN, V.; KAMKINA, O.; BABKINA, I.; ZOTOV, A.; TROITSKIY, V. A.; MLADENOV, M. I.; KAMKIN, G. A. Participation of PKG and PKA-related pathways in the IFN- $\gamma$  induced modulation of the BK Ca channel activity in human cardiac fibroblasts. **Journal of pharmacological sciences**, [S. l.], v. 141, n. 1, p. 25–31, 2019. DOI: 10.1016/J.JPHS.2019.08.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31533896/>. Acesso em: 8 maio. 2022.



MÖLLER, Matías N.; RIOS, Natalia; TRUJILLO, Madia; RADÍ, Rafael; DENICOLA, Ana; ALVAREZ, Beatriz. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 294, n. 40, p. 14776–14802, 2019. DOI: 10.1074/JBC.REV119.006136. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31409645/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

MONTENEGRO, Marcelo F.; AMARAL, Jefferson H.; PINHEIRO, Lucas C.; SAKAMOTO, Eliana K.; FERREIRA, Grazielle C.; REIS, Rosana Inacio; MARÇAL, Diogo M. O.; PEREIRA, Romaiana P.; TANUS-SANTOS, Jose E. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. **Free radical biology & medicine**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 144–152, 2011. DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2011.04.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21530643/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

MONTENEGRO, Marcelo F.; PINHEIRO, Lucas C.; AMARAL, Jefferson H.; FERREIRA, Grazielle C.; PORTELLA, Rafael L.; TANUS-SANTOS, Jose E. Vascular xanthine oxidoreductase contributes to the antihypertensive effects of sodium nitrite in L-NAME hypertension. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [S. l.], v. 387, n. 6, p. 591–598, 2014. DOI: 10.1007/S00210-014-0970-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24658348/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

MONTENEGRO, Marcelo F.; PINHEIRO, Lucas C.; AMARAL, Jefferson H.; MARÇAL, Diogo M. O.; PALEI, Ana C. T.; COSTA-FILHO, Antonio J.; TANUS-SANTOS, Jose E. Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [S. l.], v. 385, n. 5, p. 509–517, 2012. DOI: 10.1007/S00210-011-0712-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22262021/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

NAGABABU, Enika; RIFKIND, Joseph M. Routes for formation of S-nitrosothiols in blood. **Cell biochemistry and biophysics**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 385–398, 2013. DOI: 10.1007/S12013-011-9321-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22161622/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

NAVAR, L. G. THE KIDNEY IN BLOOD PRESSURE REGULATION AND DEVELOPMENT OF HYPERTENSION. **Medical Clinics of North America**, [S. l.], v. 81, n. 5, p. 1165–1198, 1997. DOI: 10.1016/S0025-7125(05)70573-3.

NEDOSPASOV, Andrei A. Is N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> the main nitrosating intermediate in aerated nitric oxide (NO) solutions in vivo? If so, where, when, and which one? **Journal of biochemical and molecular toxicology**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 109–120, 2002. DOI: 10.1002/JBT.10029. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12112710/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

NTESSALEN, Maria et al. Inorganic nitrate and nitrite supplementation fails to improve skeletal muscle mitochondrial efficiency in mice and humans. **The American journal of clinical nutrition**, [S. l.], v. 111, n. 1, p. 79–89, 2020. DOI: 10.1093/AJCN/NQZ245. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31599928/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H.; PINHEIRO, Lucas C.; GUIMARAES, Danielle A.; TELLA, Sandra O. Cond.; BLANCO, Ana L. Furla.; ANGELIS, Celio D.; SCHECHTER, Alan N.; TANUS-SANTOS, Jose E. Tempol improves xanthine oxidoreductase-mediated vascular responses to nitrite in experimental renovascular hypertension. **Redox Biology**, [S. l.], v. 8, p. 398–406, 2016. DOI: 10.1016/J.REDOX.2016.04.001.

OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H.; TANUS-SANTOS, Jose E. Nitrite-stimulated Gastric Formation of S-nitrosothiols As An Antihypertensive Therapeutic Strategy. **Current Drug Targets**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 431–443, 2018. DOI: 10.2174/1389450119666180816120816.

OMAR, S. A.; WEBB, A. J.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. Therapeutic effects of inorganic nitrate and nitrite in cardiovascular and metabolic diseases. **Journal of internal medicine**, [S. l.], v. 279, n. 4, p. 315–336, 2016. DOI: 10.1111/JOIM.12441. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26522443/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

PARDUE, Sibile; KOLLURU, Gopi K.; SHEN, Xinggui; LEWIS, Sara E.; SAFFLE, Courtney B.; KELLEY, Eric E.; KEVIL, Christopher G. Hydrogen sulfide stimulates xanthine oxidoreductase conversion to nitrite reductase and formation of NO. **Redox biology**, [S. l.], v. 34, 2020. DOI: 10.1016/J.REDOX.2020.101447. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32035920/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

PC, Leclerc; PM, Lanctot; M, Auger-Messier; E, Escher; R, Leduc; G, Guillemette. S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 148, n. 3, p. 306–313, 2006. DOI: 10.1038/SJ.BJP.0706725. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16565729/>. Acesso em: 8 ago. 2021.

PELELI, M. et al. Dietary nitrate attenuates high-fat diet-induced obesity via mechanisms involving higher adipocyte respiration and alterations in inflammatory status. **Redox biology**, [S. l.], v. 28, 2020. DOI: 10.1016/J.REDOX.2019.101387. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31765889/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

PELELI, Maria; FLACKER, Peter; ZHUGE, Zhengbing; GOMEZ, Cristina; WHEELLOCK, Craig E.; PERSSON, A. Erik G.; CARLSTROM, Mattias. Renal denervation attenuates hypertension and renal dysfunction in a model of cardiovascular and renal disease, which is associated with reduced NADPH and xanthine oxidase activity. **Redox biology**, [S. l.], v. 13, p. 522–527, 2017. DOI: 10.1016/J.REDOX.2017.06.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28734244/>. Acesso em: 9 maio. 2022.

PHILLIPS, Lauren; TOLEDO, Alexander H.; LOPEZ-NEBLINA, Fernando; ANAYA-PRADO, Roberto; TOLEDO-PEREYRA, Luis H. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. **Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 46–55, 2009. DOI: 10.1080/08941930802709470. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19191157/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

PINHEIRO, Lucas C.; MONTENEGRO, Marcelo F.; AMARAL, Jefferson H.;

FERREIRA, Grazielle C.; OLIVEIRA, Alisson M.; TANUS-SANTOS, Jose E. Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 701–709, 2012. DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2012.06.001.

PINHEIRO, Lucas C.; OLIVEIRA-PAULA, Gustavo H.; FERREIRA, Grazielle C.; DALCIN DE PAULA, Tiago; DUARTE, Diego A.; COSTA-NETO, Claudio M.; TANUS-SANTOS, Jose E. Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II. **Redox Biology**, [S. l.], v. 38, 2021. DOI: 10.1016/J.REDOX.2020.101769. Disponível em: /pmc/articles/PMC7596338/. Acesso em: 21 nov. 2021.

QIAN, Jin et al. Nitric oxide reduces NADPH oxidase 5 (Nox5) activity by reversible S-nitrosylation. **Free radical biology & medicine**, [S. l.], v. 52, n. 9, p. 1806–1819, 2012. DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2012.02.029. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22387196/>. Acesso em: 21 nov. 2021.

RAFIKOVA, Olga; RAFIKOV, Ruslan; NUDLER, Evgeny. Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: The mechanism and implication in vascular control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 99, n. 9, p. 5913–5918, 2002. DOI: 10.1073/PNAS.092048999/ASSET/82BB63C0-DE09-40F5-9338477B402BF521/ASSETS/GRAPHIC/PQ0920489005.JPEG. Disponível em: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073pnas.092048999](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073pnas.092048999). Acesso em: 22 abr. 2022.

REID, IA; CHIU, YJ. Nitric oxide and the control of renin secretion. **Fundamental & clinical pharmacology**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 309–323, 1995. DOI: 10.1111/J.1472-8206.1995.TB00505.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8566930/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

REMINGTON, Jennifer; WINTERS, Karen. Effectiveness of dietary inorganic nitrate for lowering blood pressure in hypertensive adults: a systematic review. **JBI database of systematic reviews and implementation reports**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 365–389, 2019. DOI: 10.11124/JBISRIR-2017-003842. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30870330/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

RIZZI, Elen; AMARAL, Jefferson H.; GUIMARÃES, Danielle A.; CONDE-TELLA, Sandra O.; PINHEIRO, Lucas C.; GERLACH, Raquel F.; CASTRO, Michele M.; TANUS-SANTOS, Jose E. Nitrite treatment downregulates vascular MMP-2 activity and inhibits vascular remodeling in hypertension independently of its antihypertensive effects. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 130, p. 234–243, 2019. DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.11.002.

ROCHETTE, Luc; LORIN, Julie; ZELLER, Marianne; GUILLAND, Jean Claude; LORGIS, Luc; COTTIN, Yves; VERGELY, Catherine. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? **Pharmacology & therapeutics**, [S. l.], v. 140, n. 3, p. 239–257, 2013. DOI: 10.1016/J.PHARMTHERA.2013.07.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23859953/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

SANDOVAL, Alejandro; DURAN, Paz; GANDINI, María A.; ANDRADE, Arturo; ALMANZA, Angélica; KAJA, Simon; FELIX, Ricardo. Regulation of L-type Ca V 1.3 channel activity and insulin secretion by the cGMP-PKG signaling pathway. **Cell calcium**, [S. l.], v. 66, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1016/J.CECA.2017.05.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28807144/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

SATIN, Jonathan; SCHRODER, Elizabeth A.; CRUMP, Shawn M. L-type calcium channel auto-regulation of transcription. **Cell calcium**, [S. l.], v. 49, n. 5, p. 306–313, 2011. DOI: 10.1016/J.CECA.2011.01.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21295347/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

SCHEIB, Ulrike et al. Rhodopsin-cyclases for photocontrol of cGMP/cAMP and 2.3 Å structure of the adenylyl cyclase domain. **Nature communications**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2018. DOI: 10.1038/S41467-018-04428-W. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29799525/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

SCHULTZ, Harold D.; LI, Yu Long. Carotid body function in heart failure. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, [S. l.], v. 157, n. 1, p. 171–185, 2007. DOI:

10.1016/J.RESP.2007.02.011.

SELLAK, Hassan; CHOI, Chung Sik; DEY, Nupur B.; LINCOLN, Thomas M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of cGMP-dependent protein kinase (PKG-I): pathophysiological significance. **Cardiovascular research**, [S. l.], v. 97, n. 2, p. 200–207, 2013. DOI: 10.1093/CVR/CVS327. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23139241/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

SHAMSALDEEN, Yousif A.; LIONE, Lisa A.; BENHAM, Christopher D. Dysregulation of TRPV4, eNOS and caveolin-1 contribute to endothelial dysfunction in the streptozotocin rat model of diabetes. **European journal of pharmacology**, [S. l.], v. 888, 2020. DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2020.173441. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32810492/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

SHPAIZER, Adi; KANNER, Joseph; TIROSH, Oren. S-Nitroso-N-acetylcysteine (NAC-SNO) vs. nitrite as an anti-clostridial additive for meat products. **Food & function**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 2012–2019, 2021. DOI: 10.1039/D0FO02839H. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33544107/>. Acesso em: 28 nov. 2021.

SIERVO, M.; CORANDER, M.; STRANGES, S.; BLUCK, L. Post-challenge hyperglycaemia, nitric oxide production and endothelial dysfunction: the putative role of asymmetric dimethylarginine (ADMA). **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–10, 2011. DOI: 10.1016/J.NUMECD.2010.10.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21159496/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

SIES, Helmut; JONES, Dean P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature reviews. Molecular cell biology**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 363–383, 2020. DOI: 10.1038/S41580-020-0230-3. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32231263/>. Acesso em: 12 maio. 2022.

STAMLER, Jonathan S.; LAMAS, Santiago; FANG, Ferric C. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell**, [S. l.], v. 106, n. 6, p. 675–683, 2001. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00495-0. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11572774/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

STOKES, Karen Y.; DUGAS, Tammy R.; TANG, Yaoping; GARG, Harsha; GUIDRY, Eric; BRYAN, Nathan S. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, [S. l.], v. 296, n. 5, 2009. DOI: 10.1152/AJPHEART.01291.2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19252084/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

STOMBERSKI, Colin T.; HESS, Douglas T.; STAMLER, Jonathan S. Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**, [S. l.], v. 30, n. 10, p. 1331–1351, 2019. DOI: 10.1089/ARS.2017.7403.

STUEHR, Dennis J.; SANTOLINI, Jerome; WANG, Zhi Qiang; WEI, Chin Chuan; ADAK, Subrata. Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 279, n. 35, p. 36167–36170, 2004. DOI: 10.1074/JBC.R400017200. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15133020/>. Acesso em: 24 abr. 2022.

SUN, Jie et al. CPI-17-mediated contraction of vascular smooth muscle is essential for the development of hypertension in obese mice. **Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao**, [S. l.], v. 46, n. 3, p. 109–118, 2019. DOI: 10.1016/J.JGG.2019.02.005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30948334/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

SURYAVANSHI, Santosh V.; JADHAV, Shweta M.; ANDERSON, Kody L.; KATSONIS, Panagiotis; LICHTARGE, Olivier; MCCONNELL, Bradley K. Human muscle-specific A-kinase anchoring protein polymorphisms modulate the susceptibility to cardiovascular diseases by altering cAMP/PKA signaling. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, [S. l.], v. 315, n. 1, p. H109–H121, 2018. DOI: 10.1152/AJPHEART.00034.2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29600899/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

TANNENBAUM, Steven R.; CORREA, Pelayo. Nitrate and gastric cancer risks. **Nature**, [S. l.], v. 317, n. 6039, p. 675–676, 1985. DOI: 10.1038/317675B0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4058577/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

TE RIET, Luuk; VAN ESCH, Joep H. M.; ROKS, Anton J. M.; VAN DEN MEIRACKER, Anton H.; DANSER, A. H. Ja. Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations. **Circulation Research**, [S. l.], v. 116, n. 6, p. 960–975, 2015. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303587.

TM, Coffman. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. **Nature medicine**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 1402–1409, 2011. DOI: 10.1038/NM.2541. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22064430/>. Acesso em: 7 ago. 2021.

TOUSOULIS, Dimitris; KAMPOLI, Anna-Maria; TENTOLOURIS NIKOLAOS PAPAGEORGIOU, Costas; STEFANADIS, Christodoulos. The role of nitric oxide on endothelial function. **Current vascular pharmacology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 4–18, 2012. DOI: 10.2174/157016112798829760. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22112350/>. Acesso em: 8 maio. 2022.

TOUYZ, Rhian M.; ALVES-LOPES, Rheure; RIOS, Francisco J.; CAMARGO, Livia L.; ANAGNOSTOPOULOU, Aikaterini; ARNER, Anders; MONTEZANO, Augusto C. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. **Cardiovascular research**, [S. l.], v. 114, n. 4, p. 529–539, 2018. DOI: 10.1093/CVR/CVY023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29394331/>. Acesso em: 4 maio. 2022.

TROPEA, Teresa et al. Beetroot juice lowers blood pressure and improves endothelial function in pregnant eNOS  $-/-$  mice: importance of nitrate-independent effects. **The Journal of physiology**, [S. l.], v. 598, n. 18, p. 4079–4092, 2020. DOI: 10.1113/JP279655. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32368787/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

TSIKAS, Dimitrios; BÖHMER, Anke. S-Transnitrosation reactions of hydrogen sulfide ( $H_2S/HS^-/S^{2-}$ ) with S-nitrosated cysteinyl thiols in phosphate buffer of pH 7.4:



Results and review of the literature. **Nitric oxide : biology and chemistry**, [S. l.], v. 65, p. 22–36, 2017. DOI: 10.1016/J.NIOX.2017.02.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28185882/>. Acesso em: 12 maio. 2022.

VANIN, Anatoly F. What is the Mechanism of Nitric Oxide Conversion into Nitrosonium Ions Ensuring S-Nitrosating Processes in Living Organisms. **Cell biochemistry and biophysics**, [S. l.], v. 77, n. 4, p. 279–292, 2019. DOI: 10.1007/S12013-019-00886-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31586291/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

VERESH, Zoltan; DEBRECZENI, Bela; HAMAR, Janos; KAMINSKI, Pawel M.; WOLIN, Michael S.; KOLLER, Akos. Asymmetric dimethylarginine reduces nitric oxide donor-mediated dilation of arterioles by activating the vascular renin-angiotensin system and reactive oxygen species. **Journal of vascular research**, [S. l.], v. 49, n. 4, p. 363–372, 2012. DOI: 10.1159/000337485. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22652896/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

VIELMA, Alejandra Z.; LEÓN, Luisa; FERNÁNDEZ, Ignacio C.; GONZÁLEZ, Daniel R.; BORIC, Mauricio P. Nitric Oxide Synthase 1 Modulates Basal and  $\beta$ -Adrenergic-Stimulated Contractility by Rapid and Reversible Redox-Dependent S-Nitrosylation of the Heart. **PloS one**, [S. l.], v. 11, n. 8, 2016. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0160813. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27529477/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

VILLMOW, Marten; KLÖCKNER, Udo; HEYMES, Christophe; GEKLE, Michael; RUECKSCHLOSS, Uwe. NOS1 induces NADPH oxidases and impairs contraction kinetics in aged murine ventricular myocytes. **Basic research in cardiology**, [S. l.], v. 110, n. 5, 2015. DOI: 10.1007/S00395-015-0506-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26173391/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

WADEI, Hani M.; TEXTOR, Stephen C. The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. **Nature reviews. Nephrology**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 602–609, 2012. DOI: 10.1038/NRNEPH.2012.191. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22926246/>. Acesso em: 10 jun. 2022.

WANG, Honglan; KOHR, Mark J.; TRAYNHAM, Christopher J.; ZIOLO, Mark T.

Phosphodiesterase 5 restricts NOS3/Soluble guanylate cyclase signaling to L-type Ca<sup>2+</sup> current in cardiac myocytes. **Journal of molecular and cellular cardiology**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 304–314, 2009. DOI: 10.1016/J.YJMCC.2009.03.021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19345227/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

WILKINSON-BERKA, Jennifer L.; AGROTIS, Alex; DELIYANTI, Devy. The retinal renin-angiotensin system: roles of angiotensin II and aldosterone. **Peptides**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 142–150, 2012. DOI: 10.1016/J.PEPTIDES.2012.04.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22537944/>. Acesso em: 26 abr. 2022.

WOODSOME, Terence P.; ETO, Masumi; EVERETT, Allen; BRAUTIGAN, David L.; KITAZAWA, Toshio. Expression of CPI-17 and myosin phosphatase correlates with Ca<sup>(2+)</sup> sensitivity of protein kinase C-induced contraction in rabbit smooth muscle. **The Journal of physiology**, [S. l.], v. 535, n. Pt 2, p. 553–564, 2001. DOI: 10.1111/J.1469-7793.2001.T01-1-00553.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11533144/>. Acesso em: 5 jun. 2022.

WYNIA-SMITH, Sarah L.; SMITH, Brian C. Nitrosothiol formation and S-nitrosation signaling through nitric oxide synthases. **Nitric oxide : biology and chemistry**, [S. l.], v. 63, p. 52–60, 2017. DOI: 10.1016/J.NIOX.2016.10.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27720836/>. Acesso em: 1 jun. 2022.

ZATZ, Roberto; BAYLIS, Christine. **Chronic nitric oxide inhibition model six years on.** **Hypertension** Lippincott Williams and Wilkins, , 1998. DOI: 10.1161/01.HYP.32.6.958.

ZEMBOWICZ, Artur; SWIERKOSZ, Tomasz A.; SOUTHAN, Garry J.; HECKER, Markus; VANE, John R. Potentiation of the vasorelaxant activity of nitric oxide by hydroxyguanidine: implications for the nature of endothelium-derived relaxing factor. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 107, n. 4, p. 1001–1007, 1992. DOI: 10.1111/J.1476-5381.1992.TB13398.X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1281716/>. Acesso em: 4 jun. 2022.

ZHANG, Xinbo et al. Cav-1 (Caveolin-1) Deficiency Increases Autophagy in the

Endothelium and Attenuates Vascular Inflammation and Atherosclerosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 1510–1522, 2020. DOI: 10.1161/ATVBAHA.120.314291. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32349535/>. Acesso em: 25 maio. 2022.

ZHOU, Bin et al. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. **The Lancet**, [S. l.], v. 389, n. 10064, p. 37–55, 2017. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31919-5.

ZHU, Shu Guang; KUKREJA, Rakesh C.; DAS, Anindita; CHEN, Qun; LESNEFSKY, Edward J.; XI, Lei. Dietary nitrate supplementation protects against Doxorubicin-induced cardiomyopathy by improving mitochondrial function. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 57, n. 21, p. 2181–2189, 2011. DOI: 10.1016/J.JACC.2011.01.024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21596234/>. Acesso em: 30 maio. 2022.

ZOLLBRECHT, Christa; PERSSON, A. Erik G.; LUNDBERG, Jon O.; WEITZBERG, Eddie; CARLSTRÖM, Mattias. Nitrite-mediated reduction of macrophage NADPH oxidase activity is dependent on xanthine oxidoreductase-derived nitric oxide but independent of S-nitrosation. **Redox Biology**, [S. l.], v. 10, p. 119–127, 2016. DOI: 10.1016/J.REDOX.2016.09.015.

ZUCKER, Irving H.; PATEL, Kaushik P.; SCHULTZ, Harold D. Neurohumoral Stimulation. **Heart Failure Clinics**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 87–99, 2012. DOI: 10.1016/J.HFC.2011.08.007.