

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Caio Cristovão Carvalho

**EFEITOS DO NITRITO DE SÓDIO SOBRE A CONTRAÇÃO α 1-ADRENÉRGICA
EM AORTAS DE RATOS WISTAR**

Ribeirão Preto - SP

2016

Caio Cristovão Carvalho

**EFEITOS DO NITRITO DE SÓDIO SOBRE A CONTRAÇÃO α 1-ADRENÉRGICA
EM AORTAS DE RATOS WISTAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel(a) em Ciências Biomédicas.

Área de habilitação: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos
Co-Orientador: Gustavo Henrique Oliveira de Paula

Ribeirão Preto - SP

2016

SUMÁRIO

1 RESUMO	3
2 INTRODUÇÃO	4
2.1 Hipertensão	4
2.2 Via Nitrato-Nitrito-NO	5
2.3 S-nitrosilação e S-nitrosotiois	9
2.4 Receptor $\alpha 1$ -adrenérgico	11
2.5 Objetivo	12
3. METODOLOGIA	13
3.1 Reagentes e fármacos	13
3.2 Síntese da S-nitroso-glutationa	13
3.3 Preparação da solução Krebs-KCl	13
3.4 Preparação dos anéis de aorta	13
3.5 Curva concentração-efeito de fenilefrina na presença de GSNO	14
3.6 Tratamento de ratos normotensos com nitrito de sódio	14
3.7 Análises estatísticas	15
4. DISCUSSÃO	16
4.1 Avaliação de diferentes concentrações de GSNO	16
4.2 Verificação da independência do cGMP	18
4.3 Administração do nitrito 15 mg.kg ⁻¹	20
5. CONCLUSÃO	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

1 RESUMO

A hipertensão arterial é uma condição clínica que afeta aproximadamente 1 bilhão de pessoas ao redor do mundo e é o principal fator de risco associado com eventos cardiovasculares. Tendo em vista a etiologia multifatorial da hipertensão arterial, a compreensão das causas desta condição clínica requer a consideração dos sistemas que controlam a pressão arterial, tais como os rins, o sistema nervoso simpático e a vasculatura.

Este último, particularmente, tem um papel importante no controle da pressão arterial, uma vez que os neurônios pós-ganglionares simpáticos, que liberam noradrenalina, inervam densamente os vasos sanguíneos, promovendo vasoconstrição, com consequente aumento da resistência vascular periférica.

Dentre as drogas capazes de reduzir a pressão arterial, tem crescido o número de estudos experimentais em torno dos efeitos anti-hipertensivos do nitrito de sódio. Estes efeitos têm sido associados, pelo menos em parte, à formação de nitrosotióis, os quais podem atravessar a membrana celular e nitrosilar proteínas por transnitrosilação.

Portanto é possível que o tratamento com nitrito de sódio, ao formar nitrosotióis, resulte na transnitrosilação do receptor $\alpha 1$ -adrenérgico, promovendo assim uma menor contração $\alpha 1$ -adrenérgica vascular pela menor ligação com o agonista e consequentemente uma redução da pressão arterial.

Palavras Chave: S-nitrosilação, nitrito, hipertensão, receptor $\alpha 1$ -adrenérgico, S-nitroso-tióis

2 INTRODUÇÃO

2.1 Hipertensão

A hipertensão é uma condição crônica multifatorial responsável pela maior taxa de morbidade e mortalidade no mundo. Em noventa e cinco por cento dos pacientes, não se sabe a causa de sua hipertensão já que os mecanismos fisiopatológicos que contribuem para o aumento da pressão sanguínea são complexos e envolvem muitos sistemas biológicos (MONTEZANO et al., 2015). É diagnosticada quando a pressão sistólica é maior que 140 mmHg ou a pressão diastólica é maior que 90 mmHg (CHOBANIAN et al., 2003). A prevalência da hipertensão na população geral está entre 30-45% e a taxa aumenta com o aumento da idade (ESH/ESC, 2013). Para se ter uma ideia dessa magnitude, foi estimado no ano de 2015 que cerca de 65 milhões de adultos nos Estados Unidos da América, ou um quarto da população adulta, apresentavam um quadro de hipertensão. Outro um quarto da população adulta apresentava um quadro de pré-hipertensão, em que a pressão sistólica se apresenta entre 120-139 mmHG ou a pressão diastólica está entre 80-89 mmHg (AHA/ACC/ASH, 2015).

A hipertensão é um dos maiores fatores de risco cardiovascular e se apresenta principalmente através do dano causado no tecido vascular pelo estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS). O estresse oxidativo é o desequilíbrio das substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, e é responsável por promover disfunção endotelial, remodelamento vascular e inflamação, levando ao dano vascular. Estas mudanças são as causas e as consequências do aumento da pressão sanguínea e, portanto, são importantes alvos para terapias anti-hipertensivas (MONTEZANO et al., 2015). A disfunção endotelial é caracterizada pela redução da vasodilatação, aumento da vasoconstrição, adesão de monócitos pró-inflamatórios e perda da integridade da camada endotelial (XIAO et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio mais importantes na transdução de sinais e na fisiologia do tecido vascular são o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil ($HO\bullet$) (RAY et al., 2012). Essas espécies regulam a sinalização e a vasculatura através da oxidação de resíduos de cisteína em proteínas. Estas modificações oxidativas causam alterações na estrutura, atividade e função das proteínas, alterando transportadores de íons, receptores, quinases, fosfatases, fatores de transcrição, proteínas estruturais e metaloproteinases da matriz. Todas essas proteínas são importantes na regulação

endotelial e na função das células musculares lisas vasculares. O aumento do estresse oxidativo gera um desequilíbrio no meio responsável por aumentar a vasoconstrição através da diminuição da disponibilidade de óxido nítrico (NO) (MONTEZANO et al., 2015). As espécies reativas de oxigênio regulam os receptores das células vasculares (SPIEGELBERG, 2013). Nas células musculares lisas vasculares, as espécies reativas de oxigênio influenciam processos celulares importantes na regulação do tônus vascular e estrutural, além de estimular a inflamação vascular (MONTEZANO et al., 2015).

Várias intervenções não farmacológicas como exercício físico e a dieta podem beneficiar as funções endoteliais em pacientes com hipertensão (GHIADONI et al., 2012). Estes benefícios estão relacionados com o aumento da capacidade antioxidante e a diminuição do estresse oxidativo, incluindo ativação da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e aumento da produção de NO (FIUZA-LUCES et al., 2013).

Comparados com os onívoros, os vegetarianos possuem menor pressão arterial e menor mortalidade cardiovascular. Os mecanismos pelos quais os benefícios da dieta vegetariana se dão no sistema cardiovascular ainda não foram esclarecidos, porém, acredita-se que os benefícios são causados pela influência no relaxamento endotelial e funções relacionadas, como agregação e adesão plaquetária e proliferação de células musculares lisas (LIN et al., 2001). Foi demonstrado que os níveis de nitrito no plasma podem ser utilizados para diagnosticar um quadro de disfunção endotelial no paciente, onde os níveis de nitrito decrescem com o aumento do risco cardiovascular (KLEINBONGARD et al., 2006). É conhecido que uma dieta rica em vegetais possui uma grande quantidade de nitrato. Em um estudo realizado na Polônia, observou-se que a ingestão de nitrato dos vegetarianos é 140-270% maior quando comparado com a média da população local (MITEK et al., 2013). Através destes estudos, podemos inferir que o nível de nitrito plasmático, a disponibilidade de NO e a ingestão de nitrato na dieta representam uma importante via na regulação endotelial.

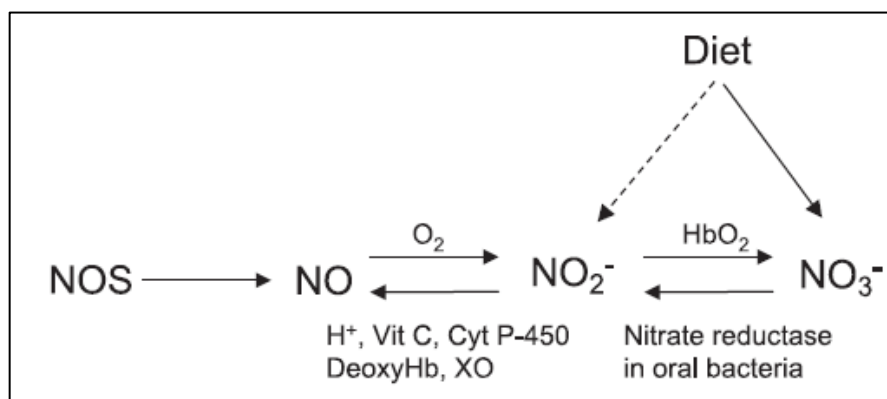
2.2 Via Nitrato-Nitrito-NO

O nosso conhecimento sobre os óxidos de nitrogênio foi limitado, por muito tempo, apenas à sua ação de poluente ambiental. Apesar de alguns documentos do século VIII sugerirem que o nitrito e nitrato eram utilizado pelos chineses para aliviar a dor no peito, foi somente no século XX que os efeitos fisiológicos do nitrito começaram a ser elucidados. Com a descoberta da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) ao final da década de 80, o nitrito

ganhou uma atenção maior na área da farmacologia, embora ainda fosse considerado como sendo apenas um produto final do metabolismo do NO (GLADWIN et al., 2005).

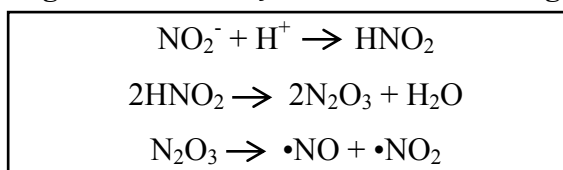
Estudos realizados nas ultimas décadas aumentaram muito a curiosidade dos pesquisadores ao demonstrar que o nitrato e nitrito são reciclados fisiologicamente no organismo para formar NO, independente da ação de enzimas (LUNDBERG, 1994). Esta nova via se dá pela formação do nitrito principalmente pela redução do nitrato ingerido na dieta. Após a absorção do nitrato no intestino, 25% deste retorna às glândulas salivares e é concentrado na saliva. Algumas bactérias comensais da cavidade bucal são capazes de reduzir o nitrato em nitrito, que quando deglutido, reage com o meio estomacal ácido formando algumas espécies reativas de óxidos de nitrogênio, incluindo o NO (GLADWIN et al., 2005). No plasma, os níveis de nitrato chegam a ser 100 vezes maiores que os de nitrito, enquanto que na saliva, os níveis de nitrato e nitrito são quase iguais (100-300 μM), indicando que a conversão de nitrato em nitrito ocorre de fato pelas bactérias comensais da cavidade bucal e que a conversão de nitrato em nitrito pelo próprio organismo é muito ineficiente (HUANG et al., 2010).

Figura 1 – Via Nitrato-Nitrito-NO



Fonte: LUNDBERG et al, 2004, p. 398.

O pH ácido do estômago é muito importante para a conversão do nitrito em NO, em um estudo utilizando omeprazol, fármaco utilizado para aumentar o pH estomacal, os efeitos hipotensores do nitrito foram inibidos (PINHEIRO et al., 2012). Mais especificamente, o nitrito no estômago é protonado para formar ácido nítrico (HNO_2) que por sua vez se decompõe para formar NO e outros óxidos de nitrogênio.

Figura 2 – Formação do NO no estômago

Fonte: LUNDBERG et al, 2008, p. 157.

Desta forma, o nitrito e nitrato são vistos agora como reservatórios de NO no organismo, complementando a via dependente do óxido nítrico sintetase (NOS). Além disso, pelo NO ser uma molécula muito reativa, seu efeito acaba sendo limitado à regiões onde é produzida. Porém, o NO pode ser estabilizado no sangue e tecidos pela oxidação em nitrato e nitrito, se concentrando em tecidos e convertido de volta à NO em condições fisiológicas e patológicas. Enquanto a meia vida do NO é reduzida à segundos no sangue por reagir rapidamente com a hemoglobina, a meia vida plasmática do nitrato é de 5-6 horas (LUNDBERG, 2008). O nitrito pode ser reduzido à NO de diversas formas. Uma delas é pela redução ácida, já que o pK_a do nitrito é relativamente baixo (3.4), a sua redução ocorre principalmente em casos de isquemia ou na mucosa estomacal. (GLADWIN et al., 2005). Há evidências ainda de que o NO pode ser estabilizado também por ligações covalentes com grupos tióis em glutathionas (GOW et al., 1998), cisteínas (STAMLER et al., 1997), albuminas (STAMLER et al., 1992) e hemoglobinas (JIA et al., 1996).

Outro fato interessante é o de que a via nitrato-nitrito-NO é independente do oxigênio, diferentemente da via NOS (ZWEIER, 1995). Desta forma, a via nitrato-nitrito-NO pode ser vista como um sistema de emergência que fornece NO em situações onde o oxigênio é limitado, como é o caso da hipertensão.

A oxidação do NO e a dieta são as duas principais fontes de nitrito e nitrato no organismo. Os níveis normais de nitrato são em torno de 20-40 μM no plasma enquanto que os níveis de nitrito são relativamente menores, em torno de 50-300 nM, sendo que nos tecidos essa concentração é relativamente maior (LUNDBERG et al., 2008). Em estudos feitos com diferentes tipos de mamíferos, a concentração de nitrito se encontrou entre os valores 100-600 nM no plasma, demonstrando que essa pequena variação do nitrito plasmático encontrada indica que a formação de nitrito é uma característica comum na circulação durante a evolução (KLEINBONGARD et al., 2003).

Estudos clínicos recentes demonstraram que a suplementação com nitrato inorgânico pela dieta ou por sais de nitrato foram capazes de reduzir a pressão sanguínea em indivíduos normotensos (KAPIL et al., 2010) e hipertensos (GOSH et al., 2013). O consumo de

alimentos ricos em nitrato podem aumentar a quantidade de nitrito no corpo em mais de $1 \mu\text{M.kg}^{-1}$, o que é muito interessante visto que os efeitos cardiovasculares do nitrito foram observados em concentrações entre $0,1 - 2 \mu\text{M.kg}^{-1}$ (GLADWIN et al., 2005). A ação do nitrito em modular o sistema cardiovascular foi observado por alguns pesquisadores testando diferentes concentrações. Há evidências de que o nitrito foi capaz de vasodilatar rapidamente um antebraço humano numa concentração quase fisiológica ($2.5 \mu\text{M}$) e foi também capaz de diminuir a pressão sistólica em mais de 17 mmHg em cães anestesiados na dose de $8 \mu\text{M}$ (GLADWIN, 2005).

O nitrito, como o NO, é capaz de modular várias vias de sinalização *in vivo*. Estudos demonstraram que o nitrito é uma molécula sinalizadora mesmo em condições fisiológicas, isto é, na ausência de isquemia. Estes efeitos sinalizadores foram observados em tecidos em uma concentração de nitrito muito abaixo da requerida para diminuir a pressão sanguínea ou oxidar hemoglobina. O mais surpreendente foi que algumas dessas ações não eram mediadas pelo NO, mas sim por espécies formadas pelo nitrito via mecanismo envolvendo tiol e enzimas (BRYAN et al., 2005).

Em um estudo *in vitro* utilizando nitrito em aortas de ratos, níveis fisiológicos de nitrito induziram vasodilatação nas aortas de ratos quando o pH do meio era reduzido de 7.45 para 6.6. Este efeito foi inibido (redução de 50% do E_{max} – efeito máximo) quando administrado um inibidor de guanilato ciclase (ODQ). O trabalho concluiu que o nitrito é um agente vasodilatador mais potente em meio ácido, é um fenômeno dependente da via cGMP e sugere que o nitrito exerce vasodilatação pela geração de NO, mas há a possibilidade de haver outros mecanismos atuando em conjunto (MODIN et al., 2001).

Alguns trabalhos já demonstraram que em situações de hipóxia e em pH fisiológico, o nitrito exerce sua função vasodilatadora independente do NO como intermediário, ou seja, independente da via NO-sGC-cGMP (PINDER et al., 2009; LIU et al., 2015). Em outro estudo *in vitro* em que se analisava receptores α_1 -adrenérgicos em artérias pulmonares, foram encontradas evidências da regulação do tônus vascular pelo NO, independente da via do GMPc, pela S-nitrosilação do receptor α_1 -adrenérgico (NOZIK-GRAYCK et al., 2006). Portanto, é interessante realizar estudos nestas vias independentes do GMPc que podem também alterar o tônus vascular e servirem como uma nova abordagem farmacológica em casos de disfunções endoteliais.

2.3 S-nitrosilação e S-nitrosotiois

Sabe-se que a influência fisiológica do NO é exercida principalmente pela modificação pós-traducional e regulação de funções de proteínas. Inicialmente, foi estabelecido que o NO gerado pelas células endoteliais causam relaxamento das células musculares lisas adjacentes pela ativação do guanilato ciclase e consequente aumento do monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) (MURAD, 1986). Porém, este mecanismo não explicava outras vias de sinalização do NO. Surgiram então evidências de que o NO também pode exercer relaxamento de células musculares lisas por vias independentes do cGMP através da estimulação da atividade Na^+/K^+ -ATPase, modificação dos canais de K^+ e também pela modificação química de agentes vasoconstritores e das proteínas de seus receptores (NOZIK-GRAYCK et al., 2002). Uma dessas vias independentes do cGMP é observada pela reação fisiológica do NO com grupos tióis de cisteínas em peptídeos e proteínas para formar S-nitrosotiois (RSNO) (STAMLER et al., 1992).

A nitrosação de tióis, também referida como sendo a S-nitrosilação, é uma modificação protéica pós-traducional e pode ser muito relevante no estudo de algumas doenças. A formação de RSNO ocorre principalmente pela reação do NO com NO_2 para gerar a espécie nitrosilante N_2O_3 que pode reagir com aminas, tióis e hidroxilas. Os RSNOs também podem ser formados pelo peroxinitrito (ONOO^-), interação entre NO e um grupo tiol na presença de um aceptor de elétrons e pelo mecanismo de transnitrosilação (BRYAN et al., 2004). Os RSNOs são importantes reguladores fisiológicos capazes de produzir vasodilatação e sua formação se demonstrou importante em diversos processos como transdução de sinais, reparo do DNA e regulação da pressão sanguínea (GOW et al., 1997).

Os RSNO são tidos como importantes doadores de NO no sangue, permitindo que o NO tenha sua meia-vida aumentada e exerça seus efeitos em regiões distantes de sua produção (LUNDBERG et al., 2004). Como já citado neste trabalho, o NO pode ser estabilizado pela ligação covalente com albuminas, hemoglobinas, glutathionas e cisteínas. Estes S-nitrosotiois formados podem ter alto ou baixo peso molecular e acredita-se que são importantes na estabilização e distribuição do NO nos tecidos vasculares, onde o NO pode causar alteração do tônus vascular, havendo uma discussão se esta atividade é causada pelo próprio NO ou pelos S-nitrosotiois. Os níveis basais de RSNO de baixo e alto peso molecular são quase indetectáveis, encontrando-se entre poucos nanomolares (GLADWIN et al., 2000).

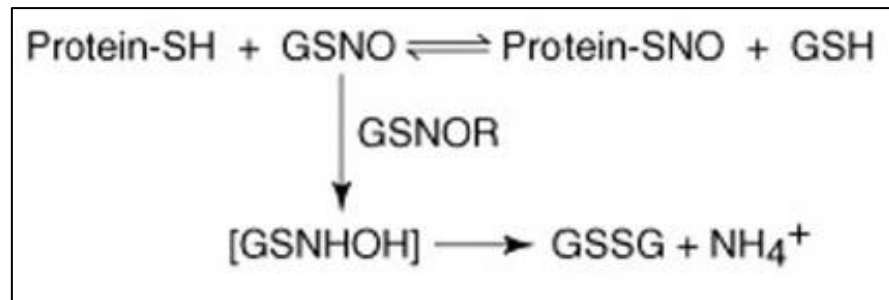
Nas últimas décadas, foram descobertos milhares de substratos para a S-nitrosilação, assim como evidências de sua capacidade de regular vários mecanismos de sinalização

celular, havendo evidências também de que a alteração nos níveis de proteínas S-nitrosiladas em alvos específicos, estão diretamente relacionados à etiologia e os sintomas em várias doenças humanas, incluindo desordens dos sistemas cardiovasculares, musculoesquelético e nervoso (FOSTER et al., 2009). Apesar do fato de que quase todas as proteínas apresentam resíduos de cisteínas, a S-nitrosilação de proteínas endógenas é caracterizada por especificidade. Nas proteínas em que foram identificadas reações de S-nitrosilação, a modulação de suas funções em condições fisiológicas foi resultado da modificação de um ou alguns poucos tióis de cisteínas (HESS et al., 2005).

A proximidade da enzima NOS com o alvo protéico para a S-nitrosilação demonstra ser de grande importância. Locais onde a NOS se encontra muito próxima de um alvo proteico são determinantes para a ocorrência de S-nitrosilação em níveis fisiológicos, e mais, inúmeros locais da NOS aparentam estar envolvidas com várias doenças. Outro fator importante é a transferência de grupos NO entre proteínas e glutatona formando um equilíbrio celular (FOSTER et al., 2009).

Acredita-se que a S-nitroso-glutathione (GSNO) seja a principal RSNO não proteica no meio celular e que esta participa na S-nitrosilação de proteínas não apenas transferindo o grupo NO para um tiol, mas também como uma fonte de radicais livres de NO (HESS et al., 2005). A S-nitrosoglutathione (GSNO) é um RSNO de baixa massa molecular que está em equilíbrio no organismo com várias proteínas S-nitrosiladas. A GSNO é metabolizada pela enzima GSNOR, e células e tecidos que não apresentam essa enzima exibem uma maior quantidade de proteínas S-nitrosiladas (FOSTER et al., 2009). Há evidências de que a GSNO é capaz de alterar a vasoconstrição de células musculares lisas através da nitrosilação de receptores ligados à proteína G. (NOZIK-GRAYCK et al., 2002).

Em modelos de ratos knockout para o gene da GSNOR, foi observado um aumento no número de proteínas S-nitrosiladas exibindo assim um efeito cardioprotetor. Portanto, agentes que aumentam a quantidade de S-nitrosotióis em tecidos podem servir como uma estratégia terapêutica para o controle de infartos, doenças coronárias e insuficiência cardíaca (LIMA et al., 2009).

Figura 3 – Vias de regulação da S-nitrosoglutationa

Fonte: FOSTER et al, 2009, p. 24.

Em um estudo foi observado que a administração de nitrito em condições fisiológicas de oxigênio e pH, foi acompanhado de um aumento de RSNO em vários tecidos, exceto no cérebro e na aorta. Foi observado um pico de nitrosilação no tecido da aorta apenas em uma dose alta de nitrito (10 mg.kg^{-1}) que levou à uma queda na pressão arterial (BRYAN et al., 2005). Em um outro estudo, a administração de 10 mg.kg^{-1} de nitrato não alterou os níveis de RSNO enquanto que os níveis de nitrito aumentaram muito, estando quase 20 vezes maiores que os níveis de RSNO. O estudo concluiu que o nitrito, e não os RSNO, são os principais substratos para a formação do NO independente da NOS (LUNDBERG et al., 2004).

Apesar de haver poucas evidências de que os RSNO podem agir como um doador de NO tão eficaz quanto o nitrito, podemos esperar então que receptores ligados à proteína G na aorta possam ser regulados pela S-nitrosilação, através de agentes como a GSNO, de modo que sejam alterados os mecanismos de sinalização celular, influenciando o tônus vascular.

2.4 Receptor $\alpha 1$ -adrenérgico

Receptores ligados à proteína G são caracterizados por serem a maior família de receptores de ativação por ligantes da membrana plasmática e transmitem uma grande variedade de sinais para as células através da ativação da proteína G. A transdução do sinal é regulada pela ligação de um agonista com o receptor que faz com que a proteína G se desligue do receptor e inicie sua sinalização dentro da célula (DRAKE et al., 2006). A ligação do receptor com um agonista faz com que o receptor mude de sua conformação inativa para ativa, porém, modificações pós-traducionais desse receptor desregulam este equilíbrio dinâmico entre os estados conformacionais (MONOD et al., 1965). Como já citado neste trabalho, a alteração pós-traducional causada pela S-nitrosilação de grupos tióis em cisteínas é um mecanismo específico. Podemos observar este fato pela S-nitrosilação do receptor de

rianodina pelo óxido nítrico. A S-nitrosilação do receptor ocorre apenas em 1 dentre 50 cisteínas livres por subunidade do receptor, mas isso é suficiente para alterar a interação do receptor com seu agonista (SUN et al., 2001).

Os RSNO podem causar vasodilatação pela via tradicional NO-cGMP em que os RSNO entram nas células por transportadores de membrana e liberam NO dentro das células para ativarem o guanilato ciclase (RIEGO et al., 2009) ou pela via independente do cGMP envolvendo a S-transnitrosilação de proteínas funcionais na via de sinalização de contração da célula, sendo que a S-transnitrosilação se dá pela transferência de um grupo nitroso de um RSNO para outro grupo tiol (JOURD'HEUIL et al., 2000).

Quando administrados diretamente na circulação, os RSNO são rapidamente convertidos enzimaticamente em outras espécies ou reagem rapidamente com tiois plasmáticos sofrendo S-transnitrosilação com diversas moléculas, dificultando o estudo sobre locais de ação dos RSNO. Por exemplo, a GSNO, sendo impermeável na membrana plasmática, é rapidamente consumida por S-transnitrosilação com a albumina. Um estudo utilizando diferentes RSNOs concluiu que a potência de seus efeitos vasodilatadores dependem da permeabilidade do RSNO na membrana plasmática, além de que os RSNO de baixo peso molecular são transformados rapidamente em RSNO de alto peso molecular, sugerindo que os efeitos dos RSNOs dependem de um equilíbrio de S-transnitrosilação no sangue (LIU et al., 2016).

A S-nitrosilação pode regular a sinalização celular através de vários receptores ligados à proteína G, como já demonstrado nos receptores 5-HT₂ (NOZIK-GRAYCK et al., 2002), muscarínico M₂ (ARONSTAM et al., 1995), e o receptor de angiotensina AT₁ (CAHILL et al., 1995), porém, o local onde agem os RSNOs especificamente ainda não foram determinados com precisão. Sendo o receptor α 1-adrenérgico um receptor ligado à proteína G, este pode ser considerado um potencial alvo para S-nitrosilação, já que o receptor β 2-adrenérgico, também acoplado à proteína G e da mesma família, é modificado por doadores de NO diminuindo sua sinalização (ADAM et al., 1999). Assim, a via de sinalização do receptor α 1-adrenérgico que consiste em promover a contração das células musculares lisas pode ser alterada, levando à alteração no tônus vascular.

2.5 Objetivo

Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos do tratamento com nitrito de sódio sobre a contração α 1-adrenérgica em aortas de ratos wistar.

3. METODOLOGIA

3.1 Reagentes e fármacos

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical (St Louis, MO, USA) e todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso. O ODQ foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO).

3.2 Síntese da S-nitroso-glutationa

A S-nitroso-glutationa (GSNO) foi preparada pela reação equimolar de Glutationa Reduzida (GSH) com Nitrito de Sódio dissolvidos em água com a adição de EDTA. A solução foi preparada momentos antes de ser incubada pelo fato de se decompor facilmente na presença de luz.

3.3 Preparação da solução Krebs-KCl

A solução Krebs-KCl foi preparada antes da realização das curvas concentração-efeito contendo 74.7 mM cloreto de sódio, 60.0 mM cloreto de potássio, 1.18 mM fosfato de potássio monobásico, 14.9 mM bicarbonato de sódio, 1.17 mM sulfato de magnésio, 1.6 mM cloreto de cálcio e 5.5 mM dextrose, pH 7.4. Após o teste de endotélio, foi feita uma lavagem da cuba com solução KH por alguns minutos. Toda solução era removida da cuba e no lugar era introduzida a solução Krebs-KCl. Esta solução é mantida na cuba por 10 minutos para avaliar o grau de contração máximo do anel de aorta incubado e possibilitar uma correção dos resultados finais.

3.4 Preparação dos anéis de aorta

O experimento foi realizado com anéis de aorta incubados em uma solução Krebs-Henseleit (KH), contendo 118 mM cloreto de sódio, 4,7 mM cloreto de potássio, 1,2 mM fosfato de potássio monobásico, 24,9 mM bicarbonato de sódio, 1,64 mM sulfato de

magnésio, 2,5 mM cloreto de cálcio e 11,1 mM dextrose, pH 7.4. Ratos Wistar machos pesando aproximadamente 250g vindos do biotério da Universidade de São Paulo (Campus de Ribeirão Preto) mantidos em um ciclo de 12h claro/escuro numa temperatura de (22-25 °C) com livre acesso à ração e água, foram anestesiados com tribromo etanol. Foi realizada uma abertura do abdômen até o tórax e foi feito um corte na aorta abdominal para reduzir a quantidade de sangue na aorta torácica. Foi removida uma porção da aorta torácica e colocada em um suporte contendo solução Krebs para remoção do tecido perivascular. Em seguida foram cortados anéis de aorta (4-5 mm) e colocados em cubas de 5 ml contendo solução KH e borbulhado com uma mistura carbogênica (95% O₂, 5% CO₂) à 37°C. Todos os anéis foram submetidos à uma tensão base (1,5g) e a solução KH era renovada em intervalos de tempo. Após 1h sob a tensão base, foi realizada a administração de fenilefrina 10⁻⁷ M e em seguida acetilcolina 10⁻⁶ M para se avaliar a integridade do endotélio.

3.5 Curva concentração-efeito de fenilefrina na presença de GSNO

Aortas de ratos Wistar foram incubados em cubas contendo solução KH conforme já descrito. A GSNO foi incubada nas concentrações de 1, 125, 250 e 1000µM ou veículo e removida das cubas após 30 minutos. Foi realizada então uma curva concentração-efeito para o agonista α 1-adrenérgico: fenilefrina, nas doses de 10⁻¹⁰ à 10⁻⁵ M. Para avaliar o envolvimento da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) nos efeitos observados, foram realizadas curvas concentração-efeito para fenilefrina (10⁻¹⁰ a 10⁻⁵ M) na presença de ODQ (inibidor da GCs; 10⁻⁴ M), GSNO (1000 µM) ou veículo.

3.6 Tratamento de ratos normotensos com nitrito de sódio

Ratos Wistar (250g) normotensos foram tratados com nitrito de sódio (15 mg/kg, via oral) ou veículo por 7 dias. Ao final deste período, os animais foram eutanasiados e suas aortas isoladas e submetidas a curvas concentração-efeito para fenilefrina (10⁻¹⁰ a 10⁻⁵ M).

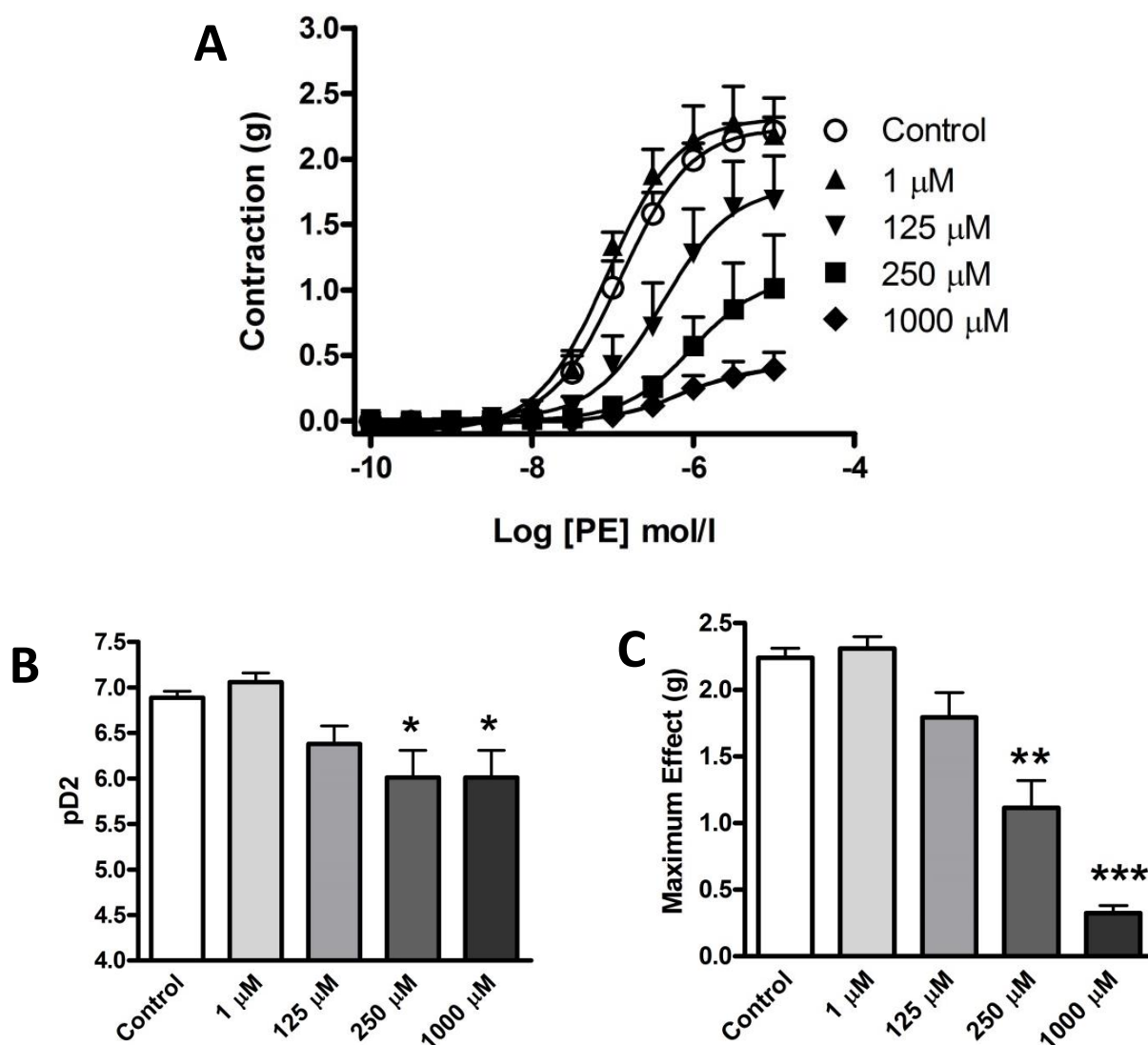
3.7 Análises estatísticas

Valores são dados por média $\pm$ EPM. Os dados foram analisados por ANOVA para as curvas concentração-efeito das diferentes doses de GSNO e para o teste de independência do cGMP, teste T-Student pareado pareado para comparar os efeitos do nitrito de sódio com o controle. Todos os testes foram realizados pelo software Prism 5.0. Os valores de P são providenciados onde a análise estatística foi realizada.

4. DISCUSSÃO

4.1 Avaliação de diferentes concentrações de GSNO

Figura 4 – Curva concentração x efeito utilizando fenilefrina em anéis de aortas encubada com diferentes doses de S-nitroso-glutathiona:

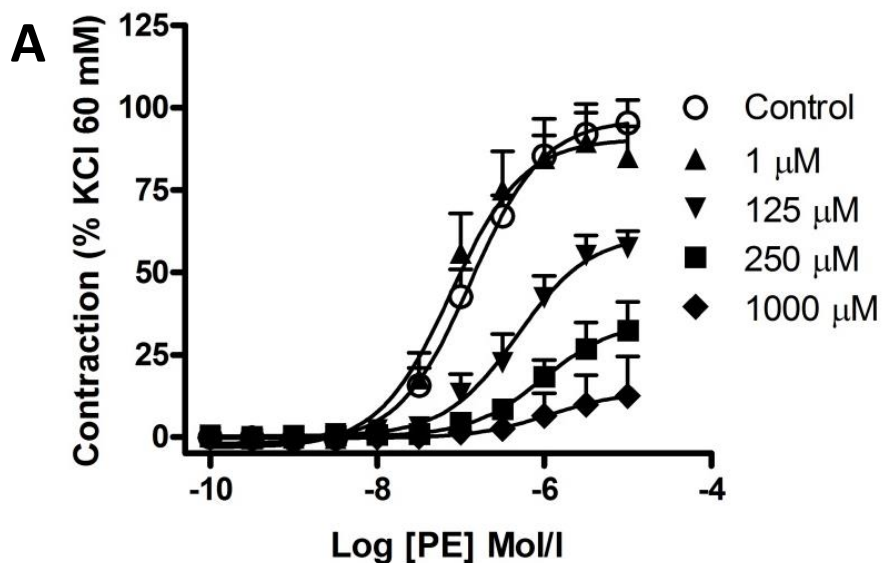


Os valores representam a média $\pm$ EPM de N = 10 (controle), 4 (GSNO 1 μ M), 5 (GSNO 125 μ M), 6 (GSNO 250 μ M), 7 (GSNO 1000 μ M) (ANOVA). *P < 0,05 do controle. ** P < 0,05 do controle, 1 μ M e 125 μ M. *** P < 0,05 do controle, 1 μ M, 125 μ M e 250 μ M.

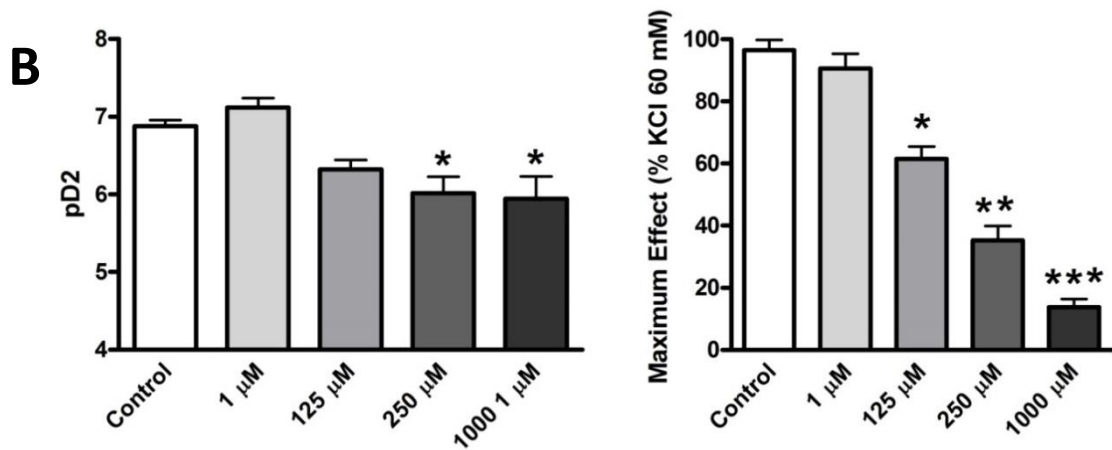
Primeiramente, observamos a resposta dos anéis de aorta incubados com diferentes concentrações de GSNO. O resultado demonstra um efeito atenuante da GSNO sobre a contração por fenilefrina na figura A, demonstrando um maior efeito conforme a concentração aumenta. Os resultados obtidos se assemelham com os resultados encontrados por Nozik-

Grayck et al. (2006) em relação ao efeito atenuador da GSNO sobre a contração $\alpha 1$ -adrenérgica, onde foi demonstrada uma diferença estatística na contração de anéis de artérias pulmonares incubadas com 250 μM de GSNO comparados com os anéis de controles, porém o efeito não foi observado nas concentrações de 25 e 2.5 μM . Concluimos que a incubação de agentes S-nitrosilantes com anéis de aortas *in vitro* causam uma menor contratilidade do tecido na presença de agonistas do receptor $\alpha 1$ -adrenérgico, neste caso, a fenilefrina. Este efeito é dependente da concentração, tendo um efeito cada vez mais pronunciado conforme o aumento da concentração de GSNO incubada. Nas figuras B e C observamos o pD2 e o Efeito Máximo respectivamente. Estes dois fatores são utilizados para se verificar diferenças nas curvas concentração x efeito. Podemos observar que houve uma diferença significativa para as concentrações de 250 μM e 1000 μM de GSNO, havendo diminuição tanto do pD2 quanto do Efeito Máximo. O pD2 é calculado pelo logaritmo negativo da concentração que induz 50% do Efeito Máximo (GOINEAU et al., 2001). Valores de Emax em gramas: Controle ($2,47 \pm 0,06$), GSNO 1 μM ($2,31 \pm 0,06$), GSNO 125 μM ($1,79 \pm 0,03$), GSNO 250 μM ($1,16 \pm 0,01$), GSNO 1000 μM ($0,35 \pm 0,01$). Valores de pD2: Controle ($7,21 \pm 0,07$), GSNO 1 μM ($7,06 \pm 0,06$), GSNO 125 μM ($6,38 \pm 0,03$), GSNO 250 μM ($6,02 \pm 0,01$), GSNO 1000 μM ($6,03 \pm 0,04$).

Figura 5 – Curva padronizada por KCl de concentração x efeito utilizando fenilefrina em anéis de aortas encubada com diferentes doses de S-nitroso-glutationa:



C

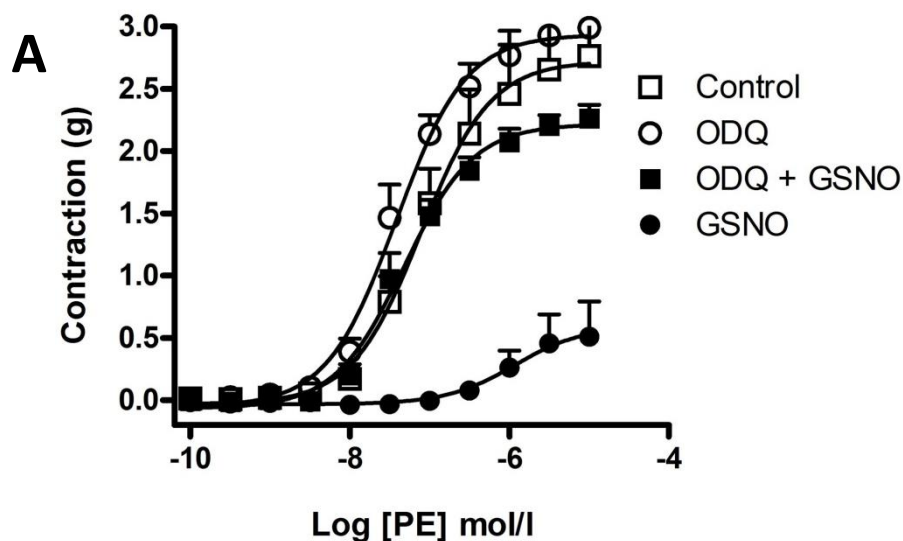


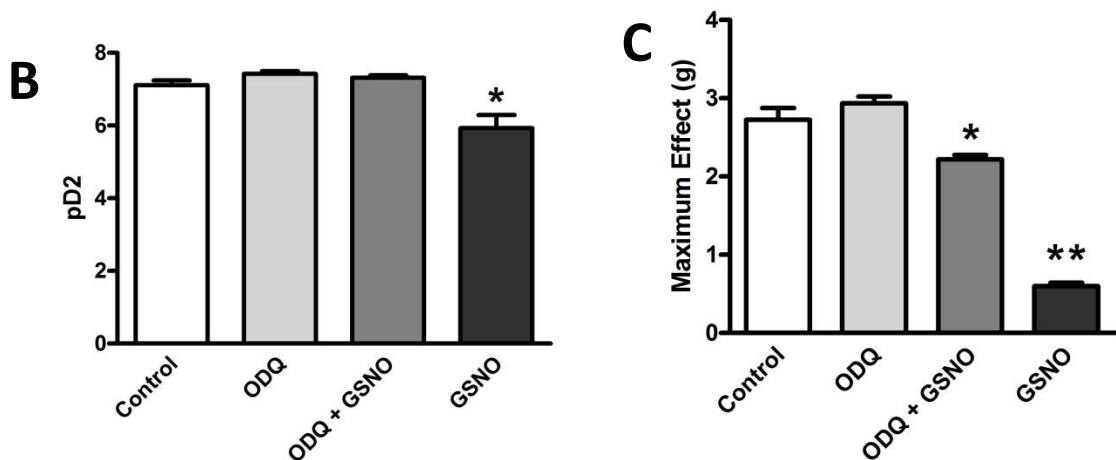
Os valores representam a média $\pm$ EPM de N = 10 (controle), 4 (GSNO 1 μ M), 5 (GSNO 125 μ M), 6 (GSNO 250 μ M), 7 (GSNO 1000 μ M) (ANOVA). *P < 0,05 do controle. ** P < 0,05 do controle, 1 μ M e 125 μ M. *** P < 0,05 do controle, 1 μ M, 125 μ M e 250 μ M.

Os resultados observados na figura 3 seguem o mesmo princípio da figura 2, porém, foi utilizado o KCl 60 mM para padronização dos resultados. Nesta análise, observamos uma diferença estatística também para a concentração 125 μ M de GSNO além das diferenças estatísticas já observadas anteriormente. Valores de Emax em porcentagem da contração máxima: Controle (91,51 $\pm$ 2,53), GSNO 1 μ M (90,59 $\pm$ 2,86), GSNO 125 μ M (61,47 $\pm$ 1,35), GSNO 250 μ M (34,81 $\pm$ 0,42), GSNO 1000 μ M (15,34 $\pm$ 0,41). Valores de pD2: Controle (7,22 $\pm$ 0,07), GSNO 1 μ M (7,11 $\pm$ 0,07), GSNO 125 μ M (6,32 $\pm$ 0,04), GSNO 250 μ M (6,03 $\pm$ 0,02), GSNO 1000 μ M (5,92 $\pm$ 0,04).

4.2 Verificação da independência do cGMP

Figura 6 – Curva concentração x efeito utilizando fenilefrina em anéis de aortas de ratos pré-encubados com ODQ, GSNO ou veículo:





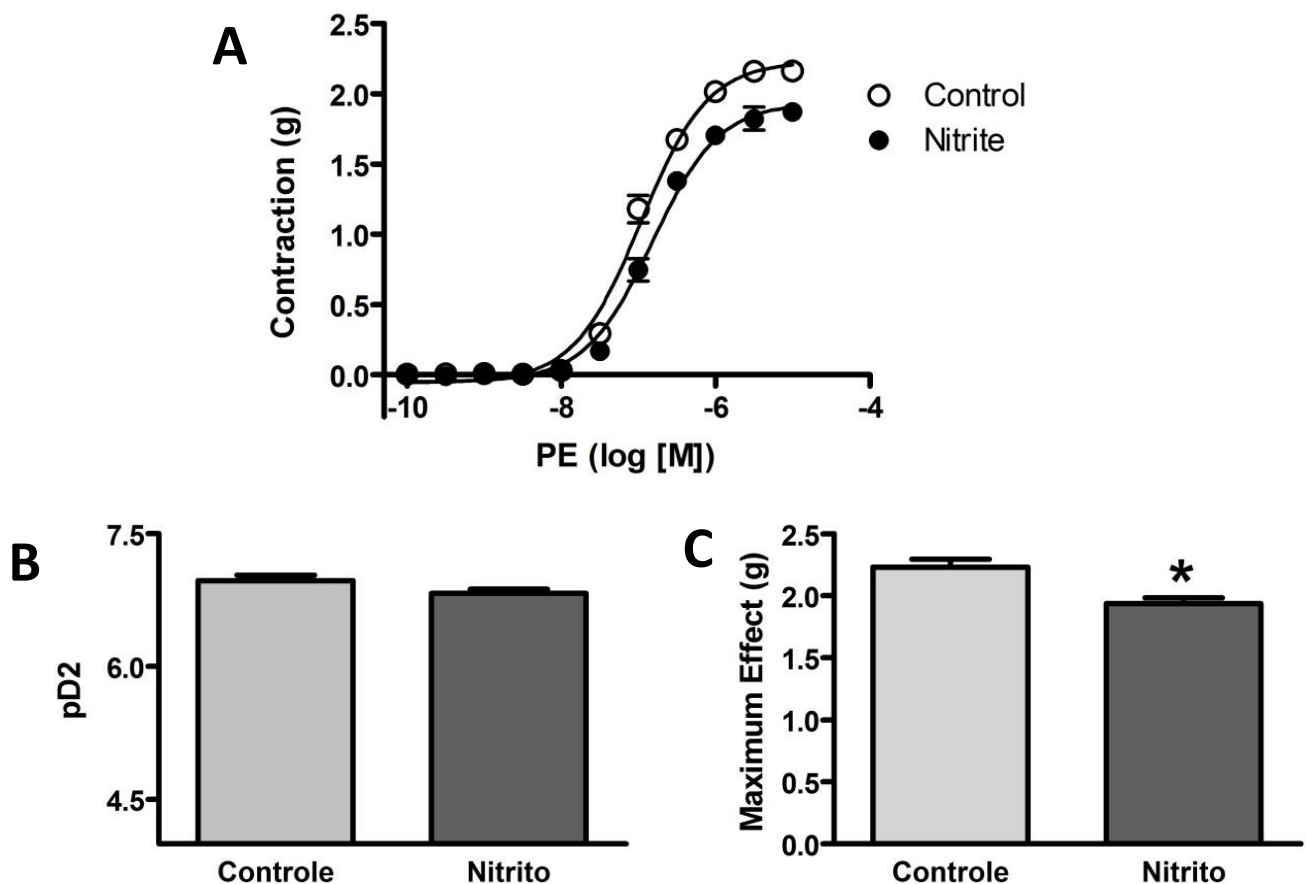
Os valores representam a média $\pm$ EPM de N = 4 (controle), 4 (ODQ), 3 (ODQ + GSNO), 5 (GSNO), (ANOVA). *P < 0,05 vs controle e ODQ. ** P < 0,05 vs controle, ODQ e ODQ + GSNO.

Como a nossa intenção é verificar apenas a ação S-nitrosilante da GSNO, são necessários métodos para evitar que o resultado final seja afetado pela ação de radicais livres de NO, que também podem diminuir a contração das células musculares lisas vasculares. O 1H-(1,2,4)oxadiazole(4,3- α)quinoxaline-1-one (ODQ) é um inibidor de guanilato ciclase solúvel (sGC), utilizado para se verificar a dependência dos efeitos da sinalização da via clássica NO-sGC-cGMP. Com os resultados obtidos da figura 6, podemos inferir que parte dos efeitos observados da GSNO são independentes do NO induzindo a via GMPc. Estes resultados novamente se assemelham com os resultados encontrados por Nozik-Grayck et al. (2006), houve o mesmo padrão de ação para os casos de ODQ, ODQ + GSNO e GSNO apesar das doses utilizadas serem diferentes das utilizadas no presente trabalho. Este estudo de Nozik-Grayck ainda demonstrou que a quantidade de cGMP foi reduzida a valores próximos de zero na presença de ODQ enquanto que na presença apenas de GSNO a quantidade era muito maior que a dos controles. Observamos novamente a redução causada pela GSNO 1000 μ M e uma redução intermediária causada pela combinação do ODQ 100 μ M com a GSNO, não havendo diferença significativa utilizando apenas o ODQ. Na análise do pD2, apenas houve diferença estatística para a GSNO e na análise do Efeito Máximo, houve diferença estatística tanto do ODQ + GSNO quanto da GSNO quando comparados com o controle ou o ODQ isolado e a GSNO também apresentou diferença estatística quando comparada com o ODQ + GSNO. O controle neste caso foi tratado com o veículo. Podemos observar que mesmo com o ODQ presente, a GSNO conseguiu realizar seu efeito vasodilatador, e consequentemente, reduziu o efeito máximo da contração da fenilefrina.

Porém, este efeito não foi tão intenso quanto a GSNO isolada, provavelmente pelo fato de que neste caso, a GSNO estaria gerando radicais NO e portanto há um efeito tanto dependente quanto independente do cGMP. Valores de E_{max} em gramas: Controle ($2,72 \pm 0,03$), ODQ ($2,93 \pm 0,05$), ODQ + GSNO ($2,21 \pm 0,04$), GSNO $1000 \mu M$ ($0,59 \pm 0,02$). Valores de pD_2 : Controle ($7,10 \pm 0,03$), ODQ ($7,42 \pm 0,05$), ODQ + GSNO ($7,31 \pm 0,05$), GSNO $1000 \mu M$ ($5,93 \pm 0,06$).

4.3 Administração do nitrito 15 mg.kg^{-1}

Figura 7 – Curva concentração x efeito utilizando fenilefrina em anéis de aortas de ratos tratados com 15 mg.kg^{-1} nitrito por dia:



Os valores representam a média $\pm$ EPM de $N = 4$ (controle), 4 (nitrito) (Tukey). * $P < 0,05$ do controle.

Observamos que a ingestão de nitrito pode causar uma redução na contratilidade da aorta de ratos normotensos quando tratados por 7 dias, com diferença estatística apenas no efeito máximo e não no pD_2 , demonstrando que o nitrito pode alterar a contratilidade do vaso em ratos normotensos. Vários estudos já demonstraram a queda da pressão arterial *in*

vivo após administração de nitrito via oral (BEIER et al., 1995), porém, não há evidências do mecanismo pelo qual o nitrito causa este efeito. Acreditamos que o meio pelo qual isto é realizado seja pela maior S-nitrosilação dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos por agentes RSNO formados pelo aumento do nível plasmático de nitrito. Observamos na literatura científica que os efeitos da administração de nitrito via oral é muito mais potente nos casos de hipertensão. Estudo observaram que o nitrito de sódio na dose 15 mg.kg^{-1} possui uma ação antioxidante e antihipertensiva em ratos hipertensos nos modelos de hipertensão DOCA-salt (AMARAL et al., 2015) e 2K1C (MONTENEGRO et al., 2011). Em um estudo semelhante, foi observado que após a administração de nitrito *in vivo* em diferentes doses (0.1 , 1.0 e 10 mg.kg^{-1}) tanto por via oral quanto intraperitoneal, há um aumento proporcional dos produtos S-nitroso (RSNO) embora isso não tenha sido observado no cérebro e na aorta. Porém, há um aumento súbito de nitrosilação do tecido aórtico na dose de 10 mg.kg^{-1} , que foi seguido por uma diminuição da pressão arterial (BRYAN et al., 2005). Portanto, a dose escolhida para o experimento do presente estudo é adequada para que sejam observados efeitos de nitrosilação do tecido. Valores de Emax em gramas: Controle ($2,51 \pm 0,06$), Nitrito ($2,01 \pm 0,03$). Valores de pD2: Controle ($7,18 \pm 0,06$), Nitrito ($7,17 \pm 0,04$).

5. CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de nitrito de sódio, pela via oral, sobre a contração $\alpha 1$ -adrenérgica em anéis de aortas de ratos wistar, buscando elucidar os possíveis mecanismos pelo qual o nitrito age. Em resumo, sugerimos através deste trabalho que os efeito hipotensores do nitrito de sódio seja exercido tanto pela via dependente quanto pela via independente do cGMP. Apresentamos evidências também de que a via independente do cGMP possa ocorrer pela S-nitrosilação dos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos presentes no tecido vascular e estes perdem suas funções de reconhecimento dos agonistas e portanto apresentam uma menor capacidade de contração do tecido da musculatura lisa vascular. Em razão dos efeitos antihipertensivos do nitrito de sódio ser menor em ratos normotensos comparados com ratos hipertensos, um próximo passo para a elucidação dos mecanismos de ação do nitrito nos receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos seja realizar estudos com ratos hipertensos sob efeito do nitrito de sódio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AHA/ACC/ASH. Treatment of hypertension in patients with coronary artery disease: a scientific statement from the American Heart Association, American College of Cardiology, and American Society of Hypertension. *Hypertension*, v. 65(6), p. 1372-1407, 2015.

AMARAL, J.H. et al. Consistent antioxidant and antihypertensive effects of oral sodium nitrite in DOCA-salt hypertension. *Redox Biology*, v. 5, p. 340-346, 2015.

ARONSTAM, R.S. et al. S-nitrosylation of M2 muscarinic receptor thiols disrupts receptor-G protein coupling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 757, p. 215–217, 1995.

BEIER, S. et al. Antihypertensive effect of oral nitrite uptake in the spontaneously hypertensive rat. *Arzneimittelforschung*, v. 45, p. 258-261, 1995.

BRYAN, N.S. et al. Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nature Chemical Biology*, v.1(5), p.290–297, 2005.

BRYAN, N.S. et al. 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*, v. 101(12), p. 4308-4313, 2004.

CAHILL, P.A. et al. Nitric oxide regulates angiotensin II receptors in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 288, p. 219–229, 1995.

CHOBANIAN, A.V. et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension*, v. 42(6), p. 1206-1252, 2003.

DRAKE, M.T.; SHENOY, S.K.; LEFKOWITZ, R.J. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circulation Research*, v. 99, p. 570– 582, 2006.

ESH/ESC. 2013 ESH/ESC Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Blood Pressure*, v. 22(4), p. 193-278, 2013.

FIUZA-LUCES, C. et al. Exercise is the real polypill. *Physiology*, v. 28, p. 330-358, 2013.

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

GHIADONI, L.; TADDEI, S.; VIRDIS, A. Hypertension and endothelial dysfunction: therapeutic approach. *Current Vascular Pharmacology*, v. 10, p. 42-60, 2012.

GHOSH, S.M. et al. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. *Hypertension*, v. 61, p. 1091-1102, 2013.

GLADWIN, M.T. et al. The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology*, v. 1(6), p. 308-314, 2005.

GLADWIN, M.T. et al. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, p. 11482–11487, 2000.

GOINEAU, S. et al. Increased sensitivity of vascular smooth muscle to nitric oxide in dilated cardiomyopathy of Syrian hamsters (Bio TO-2 strain). *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 37(3), p. 290-300, 2001.

GOW, A.J.; BUERK, D.G.; ISCHROPOULOS, H. A Novel Reaction Mechanism for the Formation of S-Nitrosothiol in Vivo. *The Journal Of Biological Chemistry*, v. 272, p. 2841-2845, 1997.

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

HESS, D. T. et al. Protein S-nitrosylation: Purview and parameters. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, p. 150-166, 2005.

HUANG, L.; BORNIEQUEL, S.; LUNDBERG, J.O. Enhanced xanthine oxidoreductase expression and tissue nitrate reduction in germ free mice. *Nitric Oxide*, v. 22, p. 191-195, 2010.

JIA, L. et al. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, v. 380, p. 221–226, 1996.

JOURD'HEUIL, D. et al. Dynamic state of S-nitrosothiols in human plasma and whole blood. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 28, p. 409-417, 2000.

KAPIL, V. et al. Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: role for nitrite-derived NO. *Hypertension*, v. 56, p. 274-281, 2010.

KLEINBONGARD, P. et al. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 35, p. 790–796, 2003

KLEINBONGARD, P. et al. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 40(2), p. 295-302, 2006.

LIMA, B. et al. Endogenous S-nitrosothiols protect against myocardial injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106(15), p. 6297-6302, 2009.

LIN, C.L.; FANG, T.C.; GUENG, M.K. Vascular dilatory functions of ovo-lactovegetarians compared with Omnivores. *Atherosclerosis*, v.158, p. 247-251, 2001.

LIU, M. et al. Nitrite-mediated renal vasodilatation is increased during ischemic conditions via cGMP-independent signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 84, p. 154-160, 2015.

LIU, T. et al. Local and systemic vasodilatory effects of low molecular weight S-nitrosothiols. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 91, p. 215-223, 2016.

LUNDBERG, J.O. et al. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut*, v. 35, p. 1543-1546, 1994.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M.T. The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 7, p. 156-167, 2008.

LUNDBERG, J.O.; GOVONI, M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 37, p. 395–400, 2004.

MITEK, M.; ANYZEWSKA, A.; WAWRZZYNIAK, A. estimated dietary intakes of nitrates in vegetarians compared to a traditional diet in Poland and acceptable daily intakes: is there a risk? *Rocznik Państwowego Zakładu Higieny*, v. 64(2), p. 105-109, 2013.

MODIN, A. et al. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of „acidic-metabolic” vasodilation. *Acta Physiologica*, v. 171, p. 9-16, 2001.

MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J.P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of Molecular Biology*, v. 12, p. 88–118, 1965.

MONTENEGRO, M.F. et al. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, p. 144-152, 2011.

MONTEZANO, A.C. et al. Oxidative Stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Canadian Journal of Cardiology*, v. 31, p. 631-641, 2015.

MUNTNER, P. et al. Antihypertensive prescriptions for newly treated patients before and after the main antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial results and seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure guidelines. *Hypertension*, v. 53(4), p. 617-623, 2009.

MURAD, F. Cyclic Guanosine Monophosphate as a Mediator of Vasodilation. *Journal of Clinical Investigation*, v. 78, p. 1-5, 1986.

NOSSAMAN, V.E.; NOSSAMAN, B.D.; KADOWITZ, P.J.; Nitrates and nitrites in the treatment of ischemic cardiac disease. *Cardiology in Review*, v. 18(4), p. 190-197, 2010.

NOZIK-GRAYCK, E.; MCMAHON, T.J.; HUANG, Y.C.T. Pulmonary vasoconstriction by serotonin is inhibited by S-nitrosoglutathione. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 282(5), p. L1057-L1065, 2002.

NOZIK-GRAYCK, E. et al. S-nitrosoglutathione inhibits α 1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, v. 290, p. L136-L143, 2006.

PINDER, A.G. et al. Nitrite directly vasodilates hypoxic vasculature via nitric oxide-dependent and -independent pathways. *British Journal of Pharmacology*, v. 157, p. 1523-1530, 2009.

PINHEIRO, L.C. et al.. Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 53, p. 701-709, 2012.

RAY, P.D.; HUANG, B.W.; TSUJI, Y.; Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, v. 24, p. 981-990, 2012.

RIEGO, J.A. et al. Activation and inhibition of soluble guanylyl cyclase by S-nitrosocysteine: involvement of amino acid transport system L. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, p. 269–274, 2009.

SPIEGELBERG, B.D. G protein coupled-receptor signaling and reversible lysine acetylation. *Journal Of Receptor Signal Transduction Research*, v. 33, p. 261-266, 2013.

STAMLER, J. S. et al. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.89, p.444–448, 1992.

STAMLER, J.S. et al. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, p. 7674-7677, 1992.

STAMLER, J.S. et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, v. 276, p. 2034-2037, 1997.

SUN, J. et al. Cysteine 3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, p. 11148-11162, 2001.

XIAO, L.; LIU, Y.; WANG, N. New paradigms in inflammatory signaling in vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology*, v. 306, p. H317-H325, 2014.

ZWEIER, J.L. et al. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nature Medicine*, v. 1, p. 804-809, 1995.