**FLAVIA NETO DE JESUS**

# CONSEQUÊNCIAS DA PRESENÇA DE PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS SOBRE A RESPOSTA VASO MOTORA *IN VITRO* DE ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós–Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para o a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo**
**2014**

**FLAVIA NETO DE JESUS**

# CONSEQUÊNCIAS DA PRESENÇA DE PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM RATOS SOBRE A RESPOSTA VASO MOTORA *IN VITRO* DE ANÉIS DE ARTÉRIA MESENTÉRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós–Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para o a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Marcelo Nicolás Muscará

Versão Original

**São Paulo**
**2014**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Jesus, Flavia Neto de.
Consequências da presença de periodontite induzida por ligadura em ratos sobre a resposta vaso motora in vitro de anéis de artéria mesentérica / Flavia Neto de Jesus. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscara.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Inflamação, vascular e periodontite.

Versão do título para o inglês: Consequences in the presence of ligature-induced periodontitis in rats on “in vitro” vasomotor response of mesenteric artery rings.

1. Periodontite 2. Artéria Mesentérica 3. Disfunção Endotelial 4. Óxido Nítrico 5. Prostaglandinas I. Muscara, Prof. Dr. Marcelo Nicolas II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB038/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Flavia Neto de Jesus.

Título da Dissertação: Consequências da presença de periodontite induzida por ligadura em ratos sobre a resposta vaso motora in vitro de anéis de artéria mesentérica.

Orientador(a): Prof. Dr. Marcelo Nicolas Muscara.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

**( ) Aprovado(a)** **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

# CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **170** nas fls. **113** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Marcelo Nicolás Muscará**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Avaliação do papel do óxido nítrico e espécies relacionadas na doença periodontal em ratos"* do qual participam o(s) aluno(s) **Flavia Neto de Jesus, Viviane Almeida, Marco Aurélio Vieira de Paula, Leandro Rodrigues, Eduardo Ekundy Valentim, Karen Tiago, Juliana Florenzano e a pesquisadora Soraia Kátia Pereira da Costa,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **14.02.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 14 de fevereiro de 2012.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

*A Deus,*

*Por ter iluminado meu caminho nesses anos.*

*Aos meus pais Antonio Carlos e Lindalva*

*E ao meu irmão Antonio,*

*Pelo apoio e amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus.**

Ao meu orientador **Dr. Marcelo Nicolás Muscará,** pela oportunidade, confiança, paciência e compreensão que tornaram possível a realização deste trabalho. Os seus ensinamentos, eficiência e capacidade profissional foram além das fronteiras do trabalho tornando-o um amigo querido.

À **Prof. Dra. Soraia K. P. Costa**, por ter aberto as portas do seu laboratório e transmitir a experiência e ensinamentos que possui.

Aos meus queridos amigos **Elly Amaral e Filiphe Mesquita** que fizeram o meu mestrado mais que especial. Sem vocês não conseguiria nem andar pela USP, foram os meus olhos e ouvidos, deixaram-me apoiar sobre os seus ombros durante toda esta jornada. Foram verdadeiramente amigos.

Aos companheiros de laboratório **Karen Santos, Leandro Rodrigues, Marco Aurélio, Juliana Florenzano, Agatha Ribeiro, Cristiane Ramos, Bruna Caetano, Flávia Batista, Silvia Coavoy, Karla Feitosa e Tuanny Schmidt**, que tornaram os meus dias mais fáceis, com muitas risadas, compartilhando o conhecimento e dando-me forças para cada experimento conquistado.

Aos técnicos do laboratório **Simone Teixeira, Irene Gouvêa, Alice Barreto e Antonio Soares** foram à alma deste trabalho, na qual é indiscutível a dedicação de cada um, desde a manutenção do laboratório até na execução do experimento.

À **Aline Dantas, Julio Moscoso, Paula Campi, Angelo Bernak e Simone Sartoretto,** que humildemente ajudaram na formação do conhecimento a respeito deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório da Fisiologia Vascular, em especial a Prof. Dra **Luciana Rossoni, Camilla Wenceslau e Gisele Couto** por terem ajudado no início do mestrado na prática do estudo vascular.

Aos **professores, técnicos, secretárias e funcionários** do Departamento de Farmacologia do ICB.

A minha família e queridos amigos que estão sempre comigo independente de qualquer situação.

Aos **ratos**.

A **CAPES**.

*"Os poetas reclamam que a ciência retira a beleza das estrelas. Mas eu posso vê-las de noite no deserto, e senti-las.*
*Vejo menos ou mais?"*

*Richard Feynman*

**RESUMO**

Jesus FN. Consequências da presença de periodontite induzida por ligadura em ratos sobre a resposta vaso motora *in vitro* de anéis de artéria mesentérica. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A destruição crônica do aparato de ligamento periodontal devido a uma intensa resposta inflamatória a bactérias, leva a um quadro clínico conhecido como doença periodontal. Patógenos periodontais podem ser translocados e liberados do sulco gengival à circulação sanguínea e assim apresentar efeitos periféricos. A bolsa periodontal também é importante reservatório de mediadores inflamatórios, que podem atingir a circulação sanguínea e apresentar efeitos em órgãos distantes. Muitos estudos passaram a documentar a relação entre doença periodontal e disfunção endotelial, reversível pelo tratamento odontológico. No nosso laboratório foi estudada a resposta vasomotora *in vitro* de anéis de aorta de ratos com periodontite induzida por ligadura, e os resultados preliminares mostram aumento significativo da resposta contrátil destes anéis à norepinefrina, quando comparada com a resposta dos vasos provenientes dos animais controle (Sham). Assim, considerando a importância dos efeitos da doença periodontal em órgãos à distância, em particular os cardiovasculares mencionados acima, o presente estudo avaliou a influência da periodontite induzida por ligadura em ratos sobre a resposta vasomotora *in vitro* de anéis de artéria mesentérica. Os resultados demonstraram que os animais com ligadura, durante sete dias, apresentaram diminuição da sensibilidade da artéria mesentérica ao relaxamento causado por NO exógeno e ao inibidor de fosfodiesterase tipo V, além disso, resultou em aumento significativo da transcrição do gene iNOS na artéria mesentérica, mesmo promovendo menor sensibilidade da artéria mesentérica ao relaxamento causado por SNP com o inibidor da iNOS no grupo ligadura. Ainda, fatores contráteis derivados de COX-1 tem menor participação no vasorelaxamento dependente do endotélio na artéria mesentérica de ratos com ligadura em comparação ao grupo Sham. Conclui-se que no modelo de ligadura em ratos possam ocorrer alterações funcionais da musculatura lisa, relacionadas à via NO-sGC-GMPc e também parece promover a produção de mediadores da resposta vasorelaxante da ACh relacionados a mecanismos de hiperpolarização. Assim, estudos com doadores de $H_2S$, particularmente compostos de liberação lenta, deverão ser realizados a fim de responder estas questões que permanecem em aberto.

**Palavras-chave:** Periodontite. Artéria Mesentérica. Disfunção Endotelial. Óxido Nítrico. Prostaglandinas.

**ABSTRACT**

Jesus FN. Consequences in the presence of ligature-induced periodontitis in rats on "*in vitro*" vasomotor response of mesenteric artery rings. [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Chronic destruction of periodontal attachment apparatus due to an intense inflammatory response to bacteria leads to a clinical condition known as periodontal disease. Periodontal pathogens can then translocate from the gingival sulcus and reach the bloodstream, and thus have peripheral effects. The periodontal pocket is also an important reservoir of inflammatory mediators, which can reach the bloodstream, and the periodontitis may have effects on organs and regions distant. Studies have also documented the relationship between periodontal disease and endothelial dysfunction, which was reversible by dental treatment. In our laboratory we are currently studying the vasomotor response "*in vitro*" of aortic rings from rats with ligature-induced periodontitis, and the preliminary results show significant increase in the contractile response of the rings to norepinephrine, when compared with the response of vessels obtained from control animals (Sham). Considering the importance of the effects of periodontal disease in remote organs, particularly the cardiovascular mentioned above, this study evaluated the influence of ligature-induced periodontitis in rats on the "*in vitro*" vascular reactivity of mesenteric artery vessels. The results showed that animals with ligature, during seven days, it showed decreased sensitivity of mesenteric artery to relaxation caused by exogenous NO and phosphodiesterase type V inhibitor. Moreover, results in significant increase in the transcription of the iNOS gene in the mesenteric artery, promoting even lower sensitivity of mesenteric artery to relaxation caused by SNP with iNOS inhibitor in the ligature group. Although, contractile factors derived from COX- 1 has the lowest participation of endothelium -dependent vasorelaxation in the mesenteric artery from rat with ligature when compared to sham group. We conclude that in the ligature rat model may occur functional changes in smooth muscle, related to the NO-sGC-cGMP, and also seems to promote the production of mediators of vasorelaxant response to ACh related with hyperpolarization-mechanisms. Thus, studies with $H_2S$ donors, particularly slow-release compounds, should be performed in order to answer these questions that remain open.

**Keywords:** Periodontitis. Mesenteric Artery. Endothelial Dysfunction. Nitric Oxide. Prostaglandins.

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

| | |
|---|---|
| ACh | - Acetilcolina |
| *Actinobacillus actinomycetemcomitans* | - *A. actinomycetemcomitans* |
| AMPc | - Adenosina 3 ', 5'-monofosfato cíclico |
| ApoE | - Apolipoproteína E |
| $Ca^{2+}$ | - Cálcio |
| CAM | - Calmodulina |
| COX | - Enzima cicloxigenase |
| COX-1 | - Ciclooxigenase 1 |
| COX-2 | - Ciclooxigenase 2 |
| CRP | - Proteína C-reativa |
| CSE | - Cistationina gama-liase |
| DAG | - Diacilglicerol |
| DMSO | - Dimetilsulfóxido |
| DP | - Doença Periodontal |
| EDCF | - Fator de contração derivado do endotélio |
| EDHF | - Fator de hiperpolarizante derivado do endotélio |
| EDRF | - Fator de relaxante derivado do endotélio |
| EROs | - Espécies reativas de oxigênio |
| ET-1 | - Endotelina |
| GMPc | - Guanosina 3 ', 5'-monofosfato cíclico |
| H2S | - Sulfeto de hidrogênio |
| IL | - Interleucina |
| INF-γ | - Interferon-gama |
| INDO | - Indometacina |
| IP3 | - Inositol trifosfato |
| KCl | - Cloreto de Potássio |
| L-NAME | - Nω-nitro-l-arginina metil ester |

| | |
|---|---|
| LPS | - Lipopolissacarídeo |
| Na2S | - Sulfeto de sódio |
| NaHS | - Hidrossulfeto de sódio |
| NF-κB | - Fator nuclear kappa B |
| NO | - Óxido Nítrico |
| NOS | - Óxido Nítrico Sintase |
| eNOS | - Óxido Nítrico Sintase Endotelial |
| iNOS | - Óxido Nítrico Sintase Induzível |
| nNOS | - Óxido Nítrico Sintase neuronal |
| NS-398 | - N-[2-(ciclohexiloxi)-4-nitrofenil]-metanesulfonamida |
| PAMPs | - Padrões moleculares associados a patógeno |
| PCR | - Reação em cadeia da polimerase |
| PDE-V | - Fosfodiesterase - 5 |
| PGs | - Prostaglandinas |
| PGE, D2 e H2 | - Prostaglandina E2, D2 e H2 |
| PGI2 | - Prostaciclina |
| Phe | - Fenilefrina |
| *Porphyromonas gingivalis* | - *P. gingivalis* |
| qPCR | - Reação em cadeia da polimerase em tempo real |
| ROS | - Espécie reativa do oxigênio |
| SC-560 | - 5-(4-clorofenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol |
| sGC | - Guanilato ciclase solúvel |
| SHAM | - Sem ligadura, submetidos ao procedimento de colocação de ligadura |
| SNP | - Nitroprussiato de sódio |
| SOD | - Superóxido dismutase |
| *Tannerella forsythia* | - *T. forsythia* |
| TLR | - Receptores do tipo toll |
| TNF-α | - Fator de necrose tumoral-alfa |

| | |
|---|---|
| *Treponema denticola* | - *T. denticola* |
| TXA | - Tromboxano A |
| U-46619 | - Dideoxi-11α,9α-epoximetanoprostaglandina F 2 α |

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1**- Anatomia periodontal na saúde e na doença.....20

**Figura 2**- Peso corporal dos grupos de animais Sham e Ligadura.....43

**Figura 3**- Imagens representativas da medição da perda óssea alveolar das hemi-mandíbula.....44

**Figura 4-** Imagens representativas da perda óssea alveolar das hemi-mandíbulas.....45

**Figura 5**- Efeito da presença de ligadura durante sete dias sobre a perda óssea alveolar dos molares, hemi-mandíbulas do lado direito, dos grupos Sham e Ligadura.....46

**Figura 6**- Efeito da indução de periodontite, avaliado no sétimo dia após a colocação da ligadura, sobre a perda óssea alveolar dos molares, hemi-mandíbulas do lado esquerdo, dos grupos Sham e Ligadura.....47

**Figura 7**- Diâmetro interno e a tensão ativa em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.....48

**Figura 8**- Curva de contração em função da concentração de fenilefrina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.....49

**Figura 9**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.....50

**Figura 10**- Curva de relaxamento em função da concentração do SNP em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.....51

**Figura 11**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura, incubadas com L-NAME (painel A) e 1400W (painel B).....52

**Figura 12**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais sham e ligadura, previamente incubadas com Indometacina (painel A), SC560 (painel B) e NS398 (painel C).....53

**Figura 13**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais Sham e Ligadura, incubadas com Indometacina e L-NAME.....54

**Figura 14**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina (painel A) e ao nitroprussiato de sódio (painel B) em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais Sham e Ligadura, incubadas com inibidor ODQ.....55

**Figura 15**- Curva de relaxamento em função da concentração do SNP em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura, incubadas com 1400W.....56

**Figura 16**- Curva de relaxamento em função da concentração de SIL em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.....57

**Figura 17**- Curva de relaxamento em função da concentração de sulfeto de sódio em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.....58

**Figura 18**- Curva de relaxamento em função da concentração de sulfeto de sódio em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura, incubadas com L-NAME.....59

**Figura 19**- Curva de relaxamento em função da concentração de sulfeto de sódio em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais Sham e Ligadura, previamente incubadas com SC560 (painel A), SC560 + Lname (painel B).....60

**Figura 20**- Curva de relaxamento em função da concentração de sulfeto de sódio (painel A e B) e ao hidrossulfeto de sódio (painel C) em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais Sham e Ligadura, incubadas com inibidor ODQ (painel A e C) e ODQ+Lname (painel B).....61

**Figura 21**- Medição do pH com única concentração de doadores de sulfeto de sódio na câmara do miógrafo.....62

**Figura 22**- Curva de concentração-resposta aos doadores de sulfeto de sódio na câmara do miógrafo.....63

**Figura 23**- Efeito da presença de ligadura, durante sete dias, sobre a expressão de RNAm para COX-1 e COX-2 em artéria mesentérica dos grupos Sham e Ligadura.....64

**Figura 24**- Efeito da indução de periodontite avaliada no sétimo dia, após a colocação da ligadura, sobre a expressão de RNAm para eNOS, iNOS e nNOS em artéria mesentérica dos grupos Sham e Ligadura.....65

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1**- Sequência dos primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.....40

# SUMÁRIO

**1 INTRODUÇÃO** ..... 19
**1.1 Periodonto e doença periodontal.** ..... 19
**1.2 Indução a periodontite – Modelo de ligadura em ratos.** ..... 21
**1.3 Inflamação dos tecidos periodontais.** ..... 22
**1.4 Infecção focal e alterações sistêmicas.** ..... 24
**1.5 Periodontite e a relação com o sistema cardiovascular.** ..... 25
**1.6 Fatores de contração e relaxamento dependente do endotélio.** ..... 26
2 **OBJETIVO** ..... 31
**3 MATERIAL E MÉTODOS** ..... 32
**3.1 Animais** ..... 32
**3.2 Indução de periodontite.** ..... 32
**3.3 Avaliação do peso corporal.** ..... 32
**3.4 Método macroscópico – Análise de perda óssea alveolar.** ..... 32
**3.5 Estudo da Reatividade Vascular do leito mesentérico em artérias de resistência.** 33
3.5.1 Preparação de anéis de artérias mesentéricas. ..... 33
3.5.2 Normalização das condições miográficas para segmentos de artérias de mesentérica. ..... 34
3.5.3 Protocolos experimentais. ..... 34
*3.5.3.1 Avaliação da resposta do diâmetro interno e tensão ativa.* ..... 34
*3.5.3.2 Avaliação da resposta a agonistas contráteis.* ..... 35
*3.5.3.3 Avaliação da resposta a agonistas vasorelaxantes.* ..... 35
*3.5.3.4 Avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante à ACh.* ..... 35
*3.5.3.5 Avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante ao SNP.* ..... 36
*3.5.3.6 Avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante ao $Na_2S$.* ..... 36
*3.5.3.7 Avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante ao hidrossulfeto de sódio.* ..... 36
**3.6 Estudo da perda de $H_2S$ no miógrafo pela medição do pH** ..... 37
3.6.1 Preparação da câmara do miógrafo. ..... 37
3.6.2 Protocolos experimentais. ..... 37
*3.6.2.1 Estudo da cinética dos doadores de $H_2S$.* ..... 37
*3.6.2.2 Construção das curvas de concentração pH para os diversos doadores de $H_2S$.* ..... 37
**3.7 Análise de expressão gênica de COX-1, COX-2, nNOS, eNOS e iNOS na** ..... 38

**artéria mesentérica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).** ..... 38
3.7.1 Obtenção das amostras. ..... 38
3.7.2 Extração do RNA e preparação do cDNA (transcrição reversa)..... 38
3.7.3 Purificação e transcrição reversa (RT) do RNA total. ..... 39
3.7.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). ..... 39
**3.8 Reagentes e diluições** ..... 41
**3.9 Apresentação dos resultados e análise estatística**..... 41
**4 RESULTADOS** ..... 43
**4.1 Avaliação do peso corporal** ..... 43
**4.2 Análise macroscópica da perda óssea alveolar.** ..... 44
4.2.3 Perda óssea alveolar das hemi-mandíbulas do lado direito. ..... 46
4.2.4 Perda óssea alveolar das hemi-mandíbulas do lado esquerdo. ..... 47
**4.3 Reatividade vascular em artéria mesentérica de resistência.** ..... 48
4.3.1 Diâmetro luminar e tensão vascular ativa. ..... 48
4.3.2 Resposta vasoconstritora à fenilefrina. ..... 49
4.3.3 Resposta vasorelaxante dependente do endotélio. ..... 50
4.3.4 Resposta vasorelaxante independente do endotélio ao nitroprussiato de sódio. ..... 51
4.3.5 Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasorelaxante à..... 52
acetilcolina. ..... 52
4.3.6 Efeito da inibição das isoformas de ciclooxigenases sobre a resposta vasorelaxante à acetilcolina. ..... 53
4.3.7 Efeito da inibição da enzima cicloxigenase e da síntese do óxido nítrico sobre a sposta vasorelaxante à acetilcolina. ..... 54
4.3.8 Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel sobre a resposta vasorelaxante. ..... 55
4.3.9 Efeito da inibição da síntese do óxido nítrico, isoforma induzível (iNOS), sobre a resposta vasorelaxante ao nitroprussiato de sódio. ..... 56
4.3.10 Efeito da inibição da fosfodiesterase V sobre a resposta vasorelaxante. ..... 57
4.3.11 Efeito do sulfeto de sódio sobre a resposta vasorelaxante. ..... 58
4.3.12 Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasodilatadora..... 59
ao sulfeto de sódio..... 59
4.3.13 Efeito da inibição da cicloxigenase-1 e da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasodilatadora ao sulfeto de sódio. ..... 60
4.3.14 Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel e da síntese de óxido..... 61
nítrico sobre a resposta vasorelaxante. ..... 61

**4.4 Estudo da perda de $H_2S$ no miógrafo pela medição do pH** ..... 62
4.4.1 Estudo da cinética dos doadores de $H_2S$. ..... 62
4.4.2 Efeito dos doadores de sulfeto de sódio sobre a medição do pH ..... 63
**4.5 Expressão gênica de COX-1, COX-2, nNOS, eNOS e NOS em artéria mesentérica de resistência pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).** ..... 64
4.5.1 Expressão do RNAm para COX-1 e COX-2. ..... 64
4.5.2 Expressão do RNAm para eNOS, nNOS e iNOS. ..... 65
**5 DISCUSSÃO** ..... 66
**6 CONCLUSÃO** ..... 78

# 1 INTRODUÇÃO

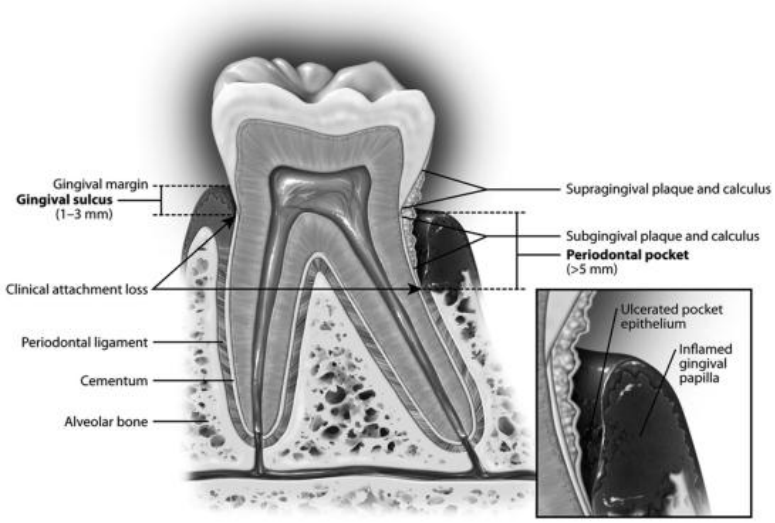
## 1.1 Periodonto e doença periodontal.

O periodonto é um conjunto de tecidos que tem como função fixar e proteger os dentes. Suas funções de suporte e revestimento dental são realizadas por componentes específicos, tais como o cemento, ligamento periodontal, osso alveolar e a porção gengival, que está em contato com o dente. No periodonto saudável, a gengiva é firmemente ligada à superfície da raiz ao nível da junção entre o esmalte dos dentes e o cemento. A manutenção da integridade estrutural resulta em um bom funcionamento periodontal que é essencial para a homeostase do tecido e defesa contra microrganismos e seus produtos (Schroeder, Listgarten, 1997).

Um importante componente do periodonto é o ligamento periodontal, formado principalmente pelas fibras de Sharpey, constituído por tecido conjuntivo frouxo, que circunda as raízes dos dentes ligando o cemento radicular ao osso alveolar, alguns estudos mostram que o ligamento periodontal possui células com características de células progenitoras que as tornam importantes na formação do cemento, do próprio ligamento periodontal e do osso alveolar, sendo um reservatório complexo e fundamental para a mobilidade do dente, definida através da largura, altura e qualidade desse ligamento periodontal (Figura 1) (Bosshardt, Schroeder, 1996; Iwata et al., 2014; Schroeder, Listgarten, 1997).

A doença mais predominante na cavidade oral é a doença periodontal (DP), bactérias, principalmente gram-negativas e anaeróbicas, instalam-se e aderem-se nas superfícies dos dentes formando uma película com células epiteliais descamadas, leucócitos polimorfonucleares, micoplasmas, leveduras e protozoários, conhecidos como placa bacteriana, ou biofilme. A inflamação causada nesses tecidos de suporte dos dentes se dá devido ao biofilme que pode resultar, futuramente, em perda de inserção em consequência da presença de um conjunto de bactérias e produtos bacterianos, e ou pela resposta de defesa do hospedeiro levando a destruição tecidual (Figura 1) (Lockhart et al., 2012; Page, Kornman, 1997; Ximénez-Fyvie et al., 2000).

**Figura 1**- Anatomia periodontal na saúde e na doença.




Dente molar com a anatomia periodontal na saúde (lado esquerdo) e com doença periodontal (lado direito). Note-se a um grande aumento da profundidade de 1 a 2 mm do sulco gengival, causada pela perda da inserção gengival para criar uma bolsa periodontal de >5 mm; papila gengival inflamada e inchada e a perda de osso alveolar, a partir da resposta inflamatória da placa subgengival e cálculo, e a presença de ulceração da mucosa da bolsa periodontal e resultando em perda da barreira da mucosa entre as bactérias da placa e o aumento de circulação gengival. Cortesia de Anne Olson.

Usualmente a DP é dividida em duas categorias fundamentais: gengivite (inflamação gengival) e periodontite, com destruição dos tecidos de suporte dos dentes (Kwek et al., 1990). Fatores que aumentam a probabilidade de ocorrência da DP é a má higienização oral, a má nutrição, os maus hábitos como o fumo (Clarkson et al., 2013; Gillette, Van House, 1980; Giuca et al., 2014; Staudte et al., 2012). Apesar das diversas classificações das manifestações clínicas da periodontite, a periodontite crônica pode ser classificada de forma localizada na qual atinge menos de 30% da área envolvida, e de forma generalizada, atingindo mais de 30% da área envolvida. Para melhor compreensão do grau de severidade, a periodontite pode ser caracterizada como leve (perda de inserção clínica de 1-2 mm), moderada (perda de inserção clínica de 3-4 mm) e grave (perda de inserção clínica acima de 5 mm). (Flemming, 1999; Tonetti, Mombelli, 1999).

As doenças periodontais são multifatoriais e influenciadas por fatores genéticos, ambientais, imunológicos e comportamentais. Em consequência desta complexidade, a periodontite destaca-se pela alta prevalência e por sua associação a doenças sistêmicas. Contudo, a doença é desencadeada por bactérias gram-negativas anaeróbicas devido à formação de um biofilme bacteriano (Haffajee, Socransky, 1994; Haynes, Stanford, 2003).

Socransky et al. (1998) observaram que a virulência dos patógenos do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola*) além de levar a destruição da estrutura periodontal, estão relacionadas com o aumento de algumas alterações sistêmicas (Socransky et al., 1998), como por exemplo, no sistema cardiovascular; (Desvarieux et al., 2005; Dogan et al., 2005). Por sua complexa diversidade bacteriana presente nos processos de periodontite, no biofilme existe mais de 300 a 400 espécies de bactérias presentes, não é possível relacionar a destruição do tecido periodontal a um patógeno exclusivo (Moore, Moore, 1994).

Durante a invasão pelo patógeno na periodontite, o sistema imunológico do hospedeiro tenta controlar esta invasão bacteriana, bem como suas toxinas através da liberação de mediadores inflamatórios, tais como interleucina (IL)-1β, o fator de necrose tumoral (TNF)-α e prostaglandinas (PGs) derivadas de macrófagos e monócitos (Roberts et al., 1997; Tatakis, Kumar, 2005).

## 1.2 Indução a periodontite – Modelo de ligadura em ratos.

Em 1966, Rovin et al. demonstraram a relevância das bactérias na inflamação em tecidos periodontais, através do modelo de ligadura induzido em ratos convencionais quando comparados com ratos livres de germes. Os animais foram sacrificados nos dias 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 22 e 26, após a colocação da ligadura, tal procedimento foi efetivo em induzir inflamação apenas em ratos convencionais, enquanto ratos livres de germes não demonstraram resposta inflamatória no local da ligadura. Os pesquisadores concluíram que a colocação da ligadura nos primeiros molares de ratos favoreceu o quadro da inflamação local, por uma combinação de fatores em decorrência, principalmente, do maior acúmulo de bactérias presente na cavidade oral. Além dos microrganismos causarem a infecção por sua patogenicidade, ainda são ótimos facilitadores de formação de biofilme com acúmulo de resíduos e materiais calcificados. Ainda, os ratos convencionais apresentaram intensa resposta inflamatória local com presença de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, algumas proliferações fibrosas e reabsorção óssea alveolar, caracterizando o procedimento com a ligadura como modelo de periodontite com qualidade (Rovin et al., 1966).

Trabalho realizado por nosso grupo, Herrera et al. (2011b) demonstraram que modelo de rato com 7 e 14 dias de ligadura houve significativa perda óssea alveolar, quando comparados com o grupo Sham. Com o tratamento crônico utilizando inibidor de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), aminoguanidina, inibiu perda óssea alveolar, mostrando reversão do efeito que foi exibido com a ligadura. Este estudo confirma que o modelo de rato com ligadura 7 e 14 dias foi efetiva na perda óssea e que o óxido nítrico (NO) derivado da iNOS tem papel importante na DP, evidenciando um importante modelo de inflamação (Herrera et al., 2011b).

## 1.3 Inflamação dos tecidos periodontais.

Após a infecção no tecido periodontal, uma reação inflamatória típica, observada primeiramente pela presença de vasodilatação na região e quimioatração com consequente migração das células do sistema imunológico inato, tais como os polimorfonucleares (neutrófilos), para o local da inflamação, os quais também são responsáveis por induzir a liberação de mediadores inflamatórios, tais como prostaglandina E2 (PGE2), IL-1α e IL-1β, TNF-α, IL-8 através da ativação de receptores do tipo Toll e CD14 (Palsson-McDermott, O'Neill, 2004; Tatakis, Kumar, 2005).

Em pacientes com periodontite, as bactérias mais encontradas e estudadas são *Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia,* a espiroqueta *Treponema denticola* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Dashper et al., 2014; Mandell, Socransky, 1981; Moore, Moore, 1994). Em particular, *Porphyromonas gingivalis*, relacionado principalmente com a periodontite crônica, possui uma facilidade maior de propagação subgengival, caracterizada por invadir a estrutura e função do epitélio juncional, responsável por manter a saúde periodontal e sendo este um obstáculo eficiente contra bactérias e seus produtos. A presença de patógenos, capazes de romper tais barreiras na periodontite crônica, pode ser uma das explicações para a associação deste tipo de periodontite com possíveis doenças em órgãos à distância (Dashper et al., 2014; Nanci, Bosshardt, 2006; Salminen, 2014).

Outro fator de extrema importância na DP é a produção do radical livre NO sintetizado pelas isoformas óxido nítrico sintases (NOS). A isoforma considerada induzível, a iNOS, é uma resposta protetora do hospedeiro a fim de eliminar as bactérias patogênicas. O lipopolissacarídeo (LPS), produto da parede celular da

bactéria gram-negativa, interage com específicos receptores de macrófagos para gerar uma resposta antinflamatória que resulta em produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1β, IL-6 e TNF-α. As citocinas e/ou LPS ativam a iNOS, decorrendo no aumento da produção de NO. Este excesso de NO pode produzir citotoxicidade e tem capacidade antimicrobial devido ao mecanismo em que o NO reage com o radical anion superóxido resultando na formação de peroxinitrito, o que pode se degradar a radical hidroxil assim, eficiente na defesa contra invasão de patógenos (Marin & Rodriguez-Matinez, 1997; Nusser & Billiar, 1993).

Neste contexto, Herrera e colaboradores (2011a) mostraram uma diminuição da perda óssea em animais com periodontite tratados com o inibidor não seletivo de NOS, o L-NAME (Herrera et al., 2011a). Ainda, no modelo de rato com ligadura, durante oito dias, observou aumento da expressão de iNOS, resultando no aumento excessivo de NO e peroxinitrito, produzindo resposta inflamatória e destruição óssea. Adicionalmente, o efeito foi revertido com o tratamento do inibidor de iNOS e sequestrador de peroxinitrito. Confirmando que o NO e peroxinitrito atuam de forma significativa na DP (Lohinai et al., 1998).

Seguindo com o modelo de rato com ligadura, estudos demonstram que os prostanóides têm papel importante na progressão da periodontite. Os efeitos inflamatórios na DP, tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar, edema, degradação de colágeno e perda óssea alveolar está diretamente relacionada com a presença dos produtos da ciclooxigenase (COX), especialmente PGE2. Na reabsorção óssea alveolar, a PGE2 estimula osteoclastos, mecanismo relacionado com o aumento do nível de AMPc, resultando no aumento da atividade e mobilidade dos osteoclastos (Bezerra et al., 2000; Holzhausen et al., 2005; Nassar et al., 2005; Offenbacher et al., 1993). Desta forma, rato com sete dias de ligadura quando tratados com inibidores não seletivo da COX (Indometacina) e seletivo da COX-2 (Meloxicam) observaram diminuição da inflamação local, redução de neutrófilos, diminuição da perda de peso e ainda diminuição da reabsorção óssea alveolar, quando comparados ao grupo que não recebeu o tratamento. Como consequência da inibição dos prostanóides e de sua ativação celular específica de osteoclastos (Bezerra et al., 2000).

## 1.4 Infecção focal e alterações sistêmicas.

Em 1900, o médico britânico William Hunter divulgou a ideia sobre septicemia bucal, investigando a importância de doenças bucais como causa de doenças em sistemas de outros órgãos. Por muitos anos, estudou sobre sepse oral e observou que mesmo em condições de diferentes septicemias, com características particularmente virulentas, havia também um elemento importante, a resistência do indivíduo. Diversos distúrbios, como por exemplo, gástricos, meningites, endocardites ulcerativas, nefrites, osteomielite foram relacionados com a septicemia bucal. Sabendo que era inevitável a infestação destes microrganismos na cavidade oral, pois era um perfeito ambiente de desenvolvimento e propagação, foi especulado a possibilidade de evitar a sua aderência no dente, propondo assim, medidas de prevenção e tratamento com o uso de antissépticos orais, mas não com adstringentes ou antissépticos leves e sim, aplicação direta de ácido carbólico no dente doente ou na gengiva inflamada, diariamente, caso a infecção local não melhorasse, o procedimento ideal seria a extração dos dentes (Hunter, 1900).

Muitos estudos demonstram a importância das infecções na DP como mecanismos de disseminação, das mais diversas bactérias, para corrente sanguínea, como é o caso *P. gingivalis, A. actinomycetemcomitans e T. denticola*. Estas bacteremias são responsáveis por muitas infecções à distância ocorrendo adoecimento de órgãos vitais (Aimetti et al., 2007; Fiehn et al., 2005; Haraszthy et al., 2000; Nomura et al., 2006; Socransky, Haffajee, 2002). Pucar e colaboradores (2007) detectaram que em biopsia de artéria coronariana de pacientes com doença arterial coronariana há presença elevada de bactérias periodontopatogênicas, tais como *A. actinomycetemcomitans, C. pneumoniae, P. intermedia, P. gingivalis, T. forsythia e Citomegalovírus*. Já em amostras de artérias mamárias, nos mesmos pacientes, não foram observadas tais bactérias, sugerindo que estas podem estar associadas ao desenvolvimento e progressão de aterosclerose, devido à alta porcentagem desta doença em artérias coronarianas não evidenciada em artérias mamárias internas (Pucar et al., 2007).

Há também a disseminação dos produtos bacterianos (endotoxinas), por exemplo, LPS, provenientes da doença periodontal, além da liberação de mediadores inflamatórios, como: IL-1β, IL-6, TNF-α e PGE2, fazendo com que o organismo encare tal condição como sendo uma forma de agressão levando a um

processo crônico e sistêmico. Consequentemente, estas alterações poderiam levar a doenças sistêmicas, como aterosclerose, eventos tromboembólicos, entre outros (Beck et al., 1996; Loos, 2005).

Mesmo em sítios distantes, observou-se um aumento de componentes pró-oxidativos, revelando que a periodontite aumentaria metabólitos reativos do oxigênio (ROS) e da mesma forma diminuiria o potencial antioxidante biológico do plasma (D'Aiuto et al., 2010). Dados de nosso laboratório (Herrera et al., 2011) evidenciam que em órgãos periféricos, como o coração, a periodontite induz alterações no conteúdo de resíduos protéicos de 3-nitrotirosina, um marcador indireto da produção de NO, formado pela reação entre o NO e outro radical livre derivado do oxigênio, o ânion superóxido, gerando peroxinitrito, o qual pode reagir com resíduos aromáticos de aminoácidos dando origem à sua nitração (Herrera et al., 2011; Kaur, Halliwell, 1994). Assim, pode-se sugerir importante papel para o NO, mediando os efeitos sistêmicos da periodontite.

## 1.5 Periodontite e a relação com o sistema cardiovascular.

Nas últimas duas décadas foram realizados diversos estudos analisando a associação entre periodontite e sistema cardiovascular, os estudos sugerem uma possível relação entre a periodontite o desenvolvimento de doenças, tais como infarto agudo do miocárdio, isquemia, doença vascular periférica, endocardite, doença cerebrovascular, entre outros (Aimetti et al., 2007; Ekuni et al., 2012; Fiehn et al., 2005; Haraszthy et al., Li et al., 2002; 2000; Nomura et al., 2006; Petersen et al., 2013; Pollreisz et al., 2010).

Muitos desses estudos apontam a formação de placas de ateroma na parede dos vasos sanguíneos, seria resultado de um processo crônico, progressivo e inflamatório (com infiltrados de monócitos/macrófagos, células T, neutrófilos, entre outros) (Falk et al., 1995). Como o sulco gengival pode funcionar como porta de entrada de microrganismos periodontais que se disseminariam pela corrente sanguínea, essas bactérias poderiam se depositar nas placas de ateroma. No estudo Haraszthy et al. (2000) foram selecionados 50 pacientes com estenose na carótida e com necessidade de endarterectomia, após remoção de placas de aterosclerose das artérias carótidas destes indivíduos, a microbiota foi analisada e também a expressão gênica bacteriana para a identificação das espécies. Os

resultados evidenciaram a presença de uma ou mais bactérias periodontopatogênicas (*A. actinomycetemcomitans, P gingivalis, P. intermédia, B. forsythus)* nas amostras, evidenciando a participação destas bactérias no desenvolvimento e na progressão da aterosclerose. (Haraszthy, et al., 2000).

O estado de inflamação periodontal crônico de um indivíduo, envolvendo bactérias gram negativo, já seria suficiente para provocar resposta inflamatória sistêmica com risco de alterações cardíacas. Alguns estudos correlacionam que o aumento dos níveis dos marcadores inflamatórios, tais como Proteína C–reativa (CRP), fibrinogênio e citocinas (IL-1β, IL-6 e TNF-α), são de especial interesse no estudo da inflamação (Becker et al., 1996). Alguns trabalhos demonstraram que pacientes com periodontite, exibiram aumento nos níveis séricos de CRP e com o tratamento periodontal houve diminuição deste marcador inflamatório, evidenciando uma associação entre periodontite e sistema cardiovascular (Kanaparthy et al., 2012; Paraskevas et al., 2008). A CRP está relacionada com a resposta de fase aguda da inflamação sistêmica, considerada como ótima ferramenta de avaliação para futuras disfunções vasculares (Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2010).

Estudo realizado por Loss e colaboradores (2000) em pacientes com periodontite crônica, mostrou aumento, com diferenças significativas, nos níveis sistêmicos de marcadores inflamatórios importantes para doenças cardiovasculares, tais como CRP, IL-6 e contagem de leucócitos (neutrófilos), quando comparados com indivíduos sem periodontite. Conclui-se que estas elevações poderiam aumentar a atividade da doença aterosclerótica aumentando o risco de eventos cardíacos (Loss et al., 2000).

## 1.6 Fatores de contração e relaxamento dependente do endotélio.

Nos vasos sanguíneos (artérias, veias e capilares) e linfáticos há em sua camada mais interna, uma membrana epitelial chamada endotélio. Do ponto de vista fisiológico, o endotélio que reveste as artérias desempenha uma importante função na resistência vascular (Triggle et al., 2012). Muitos estudos evidenciam a importância da conservação da função e integridade do endotélio para uma tensão arterial normal. O endotélio libera moléculas vasoativas que irão atuar na musculatura lisa vascular modulando as respostas vasocontráteis ou

vasorelaxantes, um quadro de desbalanço destas substâncias leva à disfunção endotelial, podendo resultar em alterações na pressão arterial (Grundy, 2003; Triggle et al., 2012).

A participação do endotélio no controle de fluxo sanguíneo está vinculada a substâncias ativas na regulação da homeostase vascular através de três fatores: fatores relaxantes derivados do endotélio (EDRF), fatores de contração derivados do endotélio (EDCF) (Furchgott, Vanhoutte, 1989; Furchgott, Zawadzki, 1980; Ignarro et al., 1986; Luscher, Vanhoutte, 1986), fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (EDHF) (Chen et al., 1988; Huang et al., 1988). Os estudos sobre o endotélio tiveram início com Robert Furchgott e John Zawadzki, em 1980 os pesquisadores observaram, em um experimento clássico, que a aorta de coelho tinha o vasorelaxamento dependente do endotélio devido aos testes com acetilcolina (ACh) (Furchgott, Zawadzki, 1980).

Na literatura está bem estabelecido que a inflamação crônica pode causar uma disfunção endotelial através da redução da biodisponibilidade do NO ou de seus efeitos celulares em pacientes com periodontite. O tratamento periodontal restabeleceria a função vasomotora (Higashi et al., 2009). Em pacientes com periodontite avançada foi observado aumento do marcador inflamatório CRP e diminuição da dilatação da artéria braquial, avaliado com ultrassom vascular, quando comparados a indivíduos controle. Este estudo demonstra uma possível associação da DP com a disfunção endotelial e com a inflamação sistêmica, (Amar et al., 2003).

Há evidências de que as bactérias periodontopatogênicas, principalmente a *P.gingivalis*, contribui para a instalação e para o desenvolvimento de aterosclerose (Fiehn et al., 2005; Haraszthy et al., 2000; Pucar et al, 2007). A constante liberação de citocinas pró-inflamatórias do hospedeiro contra estes microrganismos, tais como: TNF-α, IL-1, IL-6, diminuiria a expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, Becker et al., 1996; Zhang et al., 1997).

Por outro lado, a via da cicloxigenase, em especial a prostaciclina (PGI2) conhecido como produto da via da COX-2, também atua como um EDRF. A liberação contínua deste prostanóide é importante na manutenção do fluxo sanguíneo, por atuar como inibidor de agregação plaquetária nos vasos e estar vinculada ao mecanismo dependente de AMPc, agindo como um bom vasodilatador em humanos e roedores (Duffy et al., 1998).

Estudo realizado por Szerafin et al. (2006) em pacientes com diabetes mellitus, mostrou maior expressão de COX-2 em análise imunohistoquímica e aumento da capacidade de dilatação das arteríolas coronariana, quando comparados aos pacientes controles. Tais resultados sugerem que pacientes com diabetes mellitus, possuem um estado de função endotelial alterada, necessitando uma maior expressão de COX-2 para a manutenção da perfusão adequada de fluxo sanguíneo nos tecidos cardíacos (Szerafin et al., 2006).

Mendes e colaboradores (2013) mostraram que ratos com 21 dias de ligadura tiveram aumento da expressão de COX-2 em artérias mesentéricas na análise imunohistoquímica e diminuição no conteúdo de NO em amostras de sangue, quando comparados com ratos controle. O tratamento com etoricoxib prejudicou os ratos com relação à pressão arterial. Sugerindo que mecanismos compensatórios estão ativos com o objetivo de manter a homeostase neste modelo de DP inflamatório (Mendes et al., 2013).

Células endoteliais podem liberar prostanóides vasoconstritores, conhecidos por atuarem como EDCF. A isoenzima COX-1 é importante para funções de manutenção do organismo sendo expressa na maioria das células, como por exemplo, no epitélio gástrico com a função de citoproteção. (Ricciotti, FitzGerald, 2011). Foi observado, em curvas de concentração-resposta à ACh, que artérias hepáticas de ratos com cirrose possuem disfunção endotelial. Quando os vasos desses animais foram submetidos à inibição utilizando indometacina (inibidor não seletivo de COX) e SC560 (inibidor de COX-1) sua disfunção anteriormente observada foi reparada quando comparados a animais controle. Nestes animais houve também aumento significativo na produção de tromboxano (TXA) no fígado. Sugerindo que a disfunção endotelial que ocorre no fígado cirrótico contribui para o aumento de resistência vascular hepática mediada pela COX-1, mostrando que este prostanóides tem papel importante na função dos vasos (Graupera et al., 2003).

Entre os EDCF já caracterizados, destaca-se o peptídeo endotelina (ET-1). Em pacientes com periodontite crônica observou-se aumento da expressão de ET-1 nas células epiteliais gengivais (Yamamoto et al., 2003). Sugere-se que a presença sistêmica da bactéria *P. gingivalis* pode causar aumento das concentrações de ET-1, com consequente ação vasoconstritora sobre o endotélio vascular, além disso, foi observado em cultura de células, que as células endoteliais na presença deste patógeno, produzem níveis elevados de ET-1 (Ansai et al., 2002).

O terceiro fator que contribui para EDRF é o fator hiperpolarizante dependente do endotélio (EDHF), esta molécula ainda não é bem conhecida, porém está listada como um possível mediador. Sabe que não se trata nem de NO muito menos de PGI2, apesar de que eles também possam hiperpolarizar a musculatura lisa vascular. O seu mecanismo está ligado à ativação de canais de potássio e assim ocorrendo um relaxamento da musculatura lisa vascular dependente do endotélio (Chen et al., 1988; Félétou 2011ª e 2011b; Huang et al., 1988).

É interessante notar que alguns estudos evidenciam que animais com ligadura desenvolve disfunção vascular em artérias mesentérica e aorta. Resultados obtidos por Pereira et al. (2011) demonstraram que a resposta contrátil à fenilefrina (Phe, agonista alfa-adrenérgico) de preparações de leito arteriolar mesentérico de camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE hipercolesterolêmicos) ou de animais normocolesterolêmicos (controle) era potencializada pela inoculação oral dos animais com *Porphyromonas gingivalis*, durante três meses, sem que tenham sido observadas alterações vasculares significativas na resposta vasodilatadora à acetilcolina (dependente de endotélio) ou ao nitroprussiato de sódio (independente de endotélio) (Pereira et al., 2011).

Estudo realizado por Brito e colaboradores (2012) utilizando ratos com 14 dias de ligadura mostrou diminuição no relaxamento vascular dependente do endotélio, em artérias de mesentérica e aorta, quando comparados ao grupo controle. Esta reatividade vascular alterada foi associada com inflamação sistêmica, devido ao aumento de LDL-colesterol, IL-6 e CRP. Em ratos com 28 dias de ligadura foi observado aumento de espécies reativas do oxigênio (anion superóxido). Estes resultados apontam para a ocorrência da disfunção endotelial em ratos com 14 dias de ligadura, sugerindo uma possível correlação entre a presença da doença periodontal e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Brito et al., 2012).

Resultados obtidos no nosso laboratório evidenciam que a presença de periodontite em ratos com ligadura, durante sete dias, gera aumento significativo da resposta contrátil de anéis de aorta à norepinefrina *in vitro* em comparação à resposta dos vasos provenientes dos animais controle (Sham). Assim, considerando a importância dos efeitos da doença periodontal em órgão à distância, em particular os cardiovasculares, não há na literatura estudos que correlacionem a presença de periodontite com alterações vasculares empregando modelos de animais da doença,

o que permitiria estudar em profundidade os mecanismos e os mediadores farmacológicos envolvidos.

# 2 OBJETIVO

Avaliar a influência da periodontite induzida por ligadura em ratos na reatividade vascular avaliada *in vitro* em segmentos de artéria mesentérica. Ainda, caracterizar os mediadores envolvidos nestas respostas, com especial ênfase (mas não de forma exclusiva) nos produtos derivados das diversas enzimas ciclooxigenase (COX) e óxido nítrico sintase (NOS).

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 Animais

Ratos Wistar machos (250-300g, n= aproximadamente 200) foram divididos em grupos de cinco animais por gaiola. Eles receberam água e ração ad libitum e foram mantidos sob ciclo claro/escuro de doze horas em ambiente com temperatura controlada (23 ± 2 °C). Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais do ICB/USP (protocolo 170, fls. 113, livro 2/2011).

Todos os experimentos foram realizados após anestesia dos animais pela administração intraperitoneal (i.p.) de uma mistura de quetamina (80 mg/ $kg^{-1}$) e xilazina (20 mg/ $kg^{-1}$).

## 3.2 Indução de periodontite.

Após anestesia, fio de sutura de algodão foi passado ao redor da área cervical do dente dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo dos animais, com ajuda de uma espátula, deixando o fio de ligadura de forma subgengival. No grupo de animais controle (Sham), o fio de sutura foi retirado imediatamente após o procedimento e o outro grupo de animais (Ligadura) permaneceu com o fio ao redor dos dentes durante sete dias.

## 3.3 Avaliação do peso corporal.

Antes da indução da periodontite nos ratos, o peso corporal foi determinado e depois de sete dias os ratos foram novamente pesados, antes de serem mortos.

Para cada peso dos ratos, o valor final foi subtraído com relação ao valor inicial e os resultados foram expressos em gramas (g).

## 3.4 Método macroscópico – Análise de perda óssea alveolar.

No sétimo dia, as mandíbulas foram retiradas dos ratos e com ajuda de uma espátula, o tecido gengival foi parcialmente removido da mandíbula e em seguida, foi separada em hemi-mandíbulas (lado direito e esquerdo).

As amostras foram imersas durante sete horas em peróxido de hidrogênio 30%, para que os tecidos moles restantes fossem removidos completamente. Com o propósito de distinguir o osso dos dentes, foram coloridas as hemi-mandíbulas, durante 25 minutos, com azul de metileno 1%.

As hemi-mandíbulas foram escaneadas (HP Scanjet 3670) com resolução de 1200 dpi e as medições foram realizadas através de um software de processamento de imagem, Image J 1.47, com um examinador que não estava ciente sobre a origem das amostras. A perda óssea alveolar foi obtida pelo somatório, em milímetros (mm), das distâncias entre a crista do osso alveolar (COA) e a junção cemento-esmalte (JCE) de todas as raízes dos três molares (face lingual), sendo que as medições foram marcadas das três raízes do primeiro molar e duas raízes do segundo e terceiro molar (Crawford et al., 1978).

## 3.5 Estudo da Reatividade Vascular do leito mesentérico em artérias de resistência.

### 3.5.1 Preparação de anéis de artérias mesentéricas.

Para estudar a reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência, os animais foram mortos no sétimo dia, o leito mesentérico foi removido e mantidos em uma placa de petri com solução de Krebs-Henseleit a 4 °C, contendo (em mM): NaCl, 115; $NaHCO_3$, 25; KCl, 4.7; $KH_2PO_4$, 1,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 2,5; EDTA, 0,01; glicose 11,1.

O tecido gorduroso foi retirado, com o auxílio de um microscópio de dissecção (Nikon, SMZ 745, USA), e o terceiro ramo da artéria mesentérica superior foi dissecado e cortado em segmentos (2,0 mm de comprimento). Foram, cuidadosamente, inseridos dois fios de tungstênio (40 µm de diâmetro) no lúmen das artérias e montados em miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Technology, modelo 620M, Dinamarca) para registro de tensão isométrica.

O miógrafo estava conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab/ ADinstruments, Austrália) e este a um computador (Intel®Pentium® E5800).

3.5.2 Normalização das condições miográficas para segmentos de artérias de mesentérica.

Os tecidos foram mantidos na solução de Krebs-Henseleit, continuamente borbulhados com 95% de $O_2$ e 5% de $CO_2$, pH 7,4 e mantidos a 37 °C. Após período de estabilização de quinze minutos, a artéria foi estirada a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial, a relação tensão/diâmetro foi calculada a uma circunferência interna que corresponde a uma pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado in situ (L100). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com circunferência interna L1, calculada por meio da fórmula L1=0,90xL100, na qual o desenvolvimento de força é máximo (Mulvany, Halpern, 1977). O diâmetro luminal efetivo foi determinado de acordo com a equação I1 = L1/π, utilizando o software específico para normalização de artérias de resistência (DMT Normalization Module, Adinstruments, Australia). Após quinze minutos do processo de normalização, a integridade funcional das artérias foi verificada pela adição de cloreto de potássio (KCl 120 mM). E este procedimento com KCl repetiu-se por mais duas vezes com intervalo de quinze minutos entre cada administração, até alcançar uma estabilidade na resposta de despolarização do músculo liso ao KCl.

Os segmentos arteriais que responderam à contração ao KCl com tensão vascular ativa (aumento da força a partir da tensão basal dividida por duas vezes o comprimento de cada segmento arterial, mN/ mm) abaixo de 1,5 mN/ mm foram excluídos.

3.5.3 Protocolos experimentais.

*3.5.3.1 Avaliação da resposta do diâmetro interno e tensão ativa.*

Para avaliar o diâmetro interno dos anéis, utilizados posteriormente para a realização das curvas, foi medida a circunferência interna através software específico para normalização de artérias de resistência.

Em seguida, a tensão ativa foi calculada pela média da segunda e terceira administração KCl (120 mM) e subtraída pela média dos seus basais.

*3.5.3.2 Avaliação da resposta a agonistas contráteis.*

Para avaliar a contração vascular, alguns anéis foram pré-contraídos com U46619 (10 µM) e outros com Phe (10 µM) até alcançar um platô da resposta contrátil e em seguida foi administrado ACh (10 µM), como um teste para confirmação da integridade funcional do endotélio. Os anéis que relaxaram acima de 80%, foram utilizados para a avaliação das curvas concentração-resposta à Phe. (concentrações crescentes de Phe compreendidas entre 10 nM e 100 µM, de forma cumulativa).

*3.5.3.3 Avaliação da resposta a agonistas vasorelaxantes.*

Após trinta minutos da contração induzida pela terceira administração de KCl (120 mM), foi analisado o relaxamento induzido pela adição de concentrações cumulativas de ACh (100 pM até 300 µM), SNP (100 pM até 300 µM), sildenafil (0,1 pM até 1 µM) e sulfeto de sódio ($Na_2S$, 100 nM até 3 mM), os anéis de artérias mesentéricas foram pré-contraídas com 10 µM de Phe, em uma concentração capaz de induzir ~100% da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (120 mM).

*3.5.3.4 Avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante à ACh.*

Quinze minutos antes do início das curvas de dose-resposta à ACh em experimentos de reatividade vascular as seguintes drogas, separadamente, foram aplicadas diretamente na câmara de reatividade vascular, para avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante dependente do endotélio. O inibidor inespecífico de NOS, L-NAME (concentração final de 100 µM), o inibidor de COX-1 e COX-2, indometacina (concentração final de 10 µM), o inibidor de COX-1, SC560 (concentração final de 1 µM), o inibidor de COX-2, NS398 (concentração final de 10 µM), o inibidor específico da iNOS, 1400W (concentração final de 10 µM), o inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, ODQ (concentração final de 10 µM). Todas as artérias de resistência foram pré-contraídas com Phe em uma concentração capaz de induzir ~ 100% da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (120 mM).

*3.5.3.5 Avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante ao SNP.*

Para as curvas de dose-resposta ao SNP em experimentos de reatividade vascular as seguintes drogas, separadamente, foram aplicadas diretamente na câmara de reatividade vascular quinze minutos antes da curva, para avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante independente do endotélio. O inibidor específico da iNOS, 1400W (concentração final de 10 µM), o inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, ODQ (concentração final de 10 µM). Todas as artérias de resistência foram pré-contraídas com Phe em uma concentração capaz de induzir ~100% da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (120 mM).

*3.5.3.6 Avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante ao $Na_2S$.*

Quinze minutos antes do início das curvas de dose-resposta à $Na_2S$ em experimentos de reatividade vascular as seguintes drogas, separadamente, foram aplicadas diretamente na câmara de reatividade vascular, para avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante. O inibidor inespecífico de NOS, L-NAME (concentração final de 100 µM) o inibidor de COX-1, SC560 (concentração final de 1 µM), o inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, ODQ (concentração final de 10 µM). Todas as artérias de resistência foram pré-contraídas com Phe em uma concentração capaz de induzir ~ 100% da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (120 mM).

*3.5.3.7 Avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante ao hidrossulfeto de sódio.*

Para as curvas de dose-resposta ao hidrossulfeto de sódio (NaHS, 10 nM até 300 µM) em experimentos de reatividade vascular as seguintes drogas, separadamente, foram aplicadas diretamente na câmara de reatividade vascular quinze minutos antes da curva, para avaliação das vias envolvidas na resposta vasorelaxante. O inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, ODQ (concentração final de 10 µM). Todas as artérias de resistência foram pré-contraídas com Phe em uma concentração capaz de induzir ~100% da resposta contrátil máxima induzida pelo KCl (120 mM).

## 3.6 Estudo da perda de $H_2S$ no miógrafo pela medição do pH

### 3.6.1 Preparação da câmara do miógrafo.

Para estudar a perda de $H_2S$ na câmara do miógrafo é necessário manter as mesmas condições do experimento realizado na reatividade vascular, com solução de Krebs-Henseleit, continuamente borbulhados com 95% de $O_2$ e 5% de $CO_2$, pH aproximadamente entre 7,2 a 7,4 e mantidos a 37 °C, porém sem leito mesentérico.

### 3.6.2 Protocolos experimentais.

#### *3.6.2.1 Estudo da cinética dos doadores de $H_2S$.*

Após calibrar o pH-metro usando soluções tampão, deixar o eletrodo de vidro sensível a $H^+$ estabilizar na câmara, registrando pH entre 7,2 a 7,4. Após trinta minutos de estabilização foi colocada uma concentração de 30 µM de cada composto, separadamente nas câmaras, Na2S, NaHS e GYY 4137, e houve a medição do pH a cada um minuto durante dez minutos e depois foi medido a cada cinco minutos durante quarenta minutos.

Este experimento foi repetido na concentração de 300 µM.

#### *3.6.2.2 Construção das curvas de concentração pH para os diversos doadores de $H_2S$.*

Após trinta minutos de o eletrodo de vidro sensível a $H^+$estabilizar na câmara, registrando pH entre 7,2 a 7,4, foi analisado a curva de concentração pela adição de concentrações cumulativas de $Na_2S$, NaHS e GYY 4137 (3 nM até 3 mM), em câmaras separadas, e foi medido o pH a cada dois minuto durante vinte quatro minutos.

## 3.7 Análise de expressão gênica de COX-1, COX-2, nNOS, eNOS e iNOS na artéria mesentérica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

### 3.7.1 Obtenção das amostras.

As amostras de artéria mesentérica foram removidas, congeladas imediatamente em gelo seco e armazenadas em tubos contendo 1 mL de reagente para extração de RNA (TRIZOL™,Invitrogen, Carslbad, CA, EUA) em freezer a -80 °C.

### 3.7.2 Extração do RNA e preparação do cDNA (transcrição reversa).

O RNA total das artérias mesentéricas foi extraído com TRIZOL™ (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. De forma sucinta, as amostras foram homogeneizadas em Trizol (1 mL/ 100 mg de tecido) em Homogeneizador tipo TURRAX (Marconi – MA102/ MINI). Após 5 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 200 µl de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24/ 1 v/ v). Após agitação vigorosa para a extração dos lipídios, os tubos foram deixados em repouso por 10 minutos e posteriormente centrifugados a 12.000 *g* durante 15 minutos a 4 °C. Dessa forma, obtiveram-se três fases: a fase aquosa que contém o RNA (superior), uma fase turva que contém o DNA (intermediária) e uma fase sólida inferior (precipitado) que contém proteínas e lipídios. A fase aquosa sobrenadante (~500 µl) foi separada e o RNA precipitado pela adição de 500 µl de isopropanol. Após 10 minutos a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (12.000 *g*, durante 10 minutos a 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado de RNA foi lavado com 500 µl de etanol 95%. Após centrifugação (7.000 *g*, durante 5 minutos a 4 °C), os sobrenadantes foram desprezados, e os precipitados lavados novamente com etanol a 75%, centrifugados (7.000 *g*, durante 5 minutos a 4 °C) e os tubos foram invertidos e apoiados sobre papel de filtro para eliminar os restos de etanol. Finalmente, o precipitado foi dissolvido com 30 µl de água tratada com DEPC.

A quantificação do RNA total foi realizada em leitor Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). As concentrações de RNA total foram calculadas em ng/µl.

Dez microlitros das amostras foram submetidas à eletroforese (voltagem fixada em 70 V) em gel de agarose a 1% para verificação da integridade do RNA extraído, o qual foi relacionado à qualidade das bandas de RNA correspondentes às subunidades ribossomais 18S e 28S.

3.7.3 Purificação e transcrição reversa (RT) do RNA total.

Primeiramente, 85 ng de RNA total das amostras (diluídas com água tratada com DEPC, q.s.p. 10 µL), foram tratadas com 1 µL de DNase (DNase I, Fermentas Life Science) e 1 µL de tampão para DNase (Fermentas Life Science). Brevemente, as amostras foram aquecidas a 37 °C por 15 minutos e em seguida a 75 °C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram deixadas a 42 °C por 2 minutos.

A transcrição reversa foi realizada incubando-se o RNA tratado com DNAse com uma mistura contendo 0,5 µL de inibidor de RNAses (RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor, Fermentas Life Science), 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 µL de oligo dT (100 µM, Fermentas Life Science), 2 µL de dNTPs (10 mM, Fermentas Life Science) e 1 µL da enzima transcriptase reversa (RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas Life Science) a 42 °C durante 1 hora, seguido de 5 minutos a 70 °C e 2 minutos a 37 °C. Os produtos de cDNA obtidos foram mantidos a -20 °C até serem utilizados.

3.7.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Os primers para COX-1, COX-2, nNOS, eNOS, iNOS e HPRT (hipoxantina guanina fosforibosiltransferase, utilizado como gene normalizador) foram desenhados utilizando o programa Primer 3 (desenvolvido por Steve Rozen e Helen J. Skaletsky) e disponível online em *http://frodo.wi.mit.edu.* Os primers foram selecionados de acordo com as seguintes características: composição entre 18 e 24 bases (ótimo entre 20-22), temperatura de fusão (melting; -$T_m$) entre 59,5 e 60,5 °C (ótima $T_m$ 60 °C), conteúdo de G+C entre 40 e 60% (ótimo 50%) e produtos de amplificação entre 80-200 pares de bases (pb). As sequências selecionadas foram analisadas com relação à especificidade do gene utilizando o programa BLAT *(http://genome.ucsc.edu)*.

As sequências dos primers utilizados são mostradas no quadro abaixo:

**Tabela 1**- Sequência dos primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real

| Gene | Sequências | Tamanho do Produto (pb) |
|---|---|---|
| **HPRT** | 5´: AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA<br>3´: TGATTCAAATCCCTGAAGTGC | 129 |
| **COX-1** | 5´: CGTGTGTGTGACTTGCTGAA<br>3´: GGTTGCGATACTGGAACTGG | 196 |
| **COX-2** | 5´: ACATTCCCTTCCTTCGGAAT<br>3´: AAGGGCCCTGGTGTAGTAGG | 146 |
| **nNOS** | 5´: CACCTGAAGAGCACACTGGA<br>3´: GGCTAGAGGGAAGAGCTGGT | 126 |
| **eNOS** | 5´: AGCATGAGGCCTTGGTATTG<br>3´: CCCGACATTTCCATCAGC | 100 |
| **iNOS** | 5´:AAAATGGTTTCCCCCAGTTC<br>3´: GTCGATGGAGTCACATGCAG | 82 |

**Fonte: Muscará, 2011.**

Como controle negativo, reações foram realizadas na ausência de cDNA. Cada reação foi realizada em duplicata e continha 3 µL de cDNA diluído 3 vezes, 6 µL de SyBr Green (KAPA SYBR Fast qPCR Master mix, Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts, EUA) e 3 µL de primers (concentração final de 300 nM). O protocolo consistiu de uma etapa de 3 minutos de desnaturação a 95 °C e 40 ciclos de amplificação a 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 20 segundos. Todos os ensaios foram realizados no Mx3005P® qPCR System (Stratagene) e a análise quantitativa foi realizada com a versão 4.1 do software MxPro (Stratagene), que estimou os valores de “threshold cycle” (Ct; ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção) para cada amostra. A expressão gênica relativa do gene de interesse foi normalizada em relação ao HPRT, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ através da equação $2^{-[\Delta Ct\ (teste)\ -\ \Delta Ct\ (HPRT)]}$ de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

Considerando o valor do grupo veículo como 1, os dados foram expressos como a média ± E.P.M.

## 3.8 Reagentes e diluições

Todos os componentes da solução de Krebs-Henseleit foram adquiridos da Synth (Brasil). Com relação aos agentes utilizados no estudo: cloridrato de acetilcolina (ACh) (cód. A-6625), nitroprussiato de sódio (SNP) (cód. 71778), fenilefrina (Phe) (cód.P-6126), SC560 (cód. S-2064), U-46619 (cód.D-8174), indometacina (cód.17278), L -NAME (cód. A5131), 1400W (cód. W4262), ODQ (cód. O3636), Sildenafil (cód. PZ0003), NaHS (cód. 161527), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA), Na2S foi adquirida da Dinâmica. E o NS398 e Gyy 4137 foram doados. Todas as drogas foram diluídas em água destilada, exceto para SC560, U-46619, NS398 e Sildenafil que foram diluídas em DMSO (1mg/ mL).

Peróxido de hidrogênio e azul de metileno utilizados na análise da perda óssea foram adquiridos pela Synth.

Todas as soluções-estoque foram mantidas a -20 ºC e as diluições utilizadas nas curvas de concentração-resposta foram preparadas antes do experimento.

## 3.9 Apresentação dos resultados e análise estatística

Na avaliação do peso corporal foi calculado o delta das médias dos pesos iniciais e finais.

Análise macroscópica da perda óssea alveolar foi calculada em milímetros o somatório entre o JCE e COA.

Para a reatividade vascular, os anéis de artéria mesentérica, dos grupos Ligadura e Sham, a resposta de contração das curvas de concentração-resposta da Phe foi calculada como tensão vascular ativa (aumento da força a partir da tensão basal dividida por duas vezes o comprimento de cada anel arterial, mN/mm) (Mulvany, Halpern, 1977). A resposta de relaxamento das curvas de concentração-resposta dos agentes ACh, SNP, Sildenafil, $Na_2S$ e NaHS, foram concluídas como porcentagem de relaxamento, a partir da pré-contração (relacionado com o basal). A resposta máxima (Emáx) e o -log do EC50 (pD2, concentração do fármaco necessário para causar 50% da resposta) foram calculados a partir das curvas de concentração-resposta, estes resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

Os dados de RT-PCR, a expressão gênica foi normalizada em relação ao HPRT, através da equação $2^{-[\Delta Ct\ (teste)\ -\ \Delta Ct\ (HPRT)]}$. Considerando o valor do grupo veículo como 1, os dados foram expressos como a média ± E.P.M.

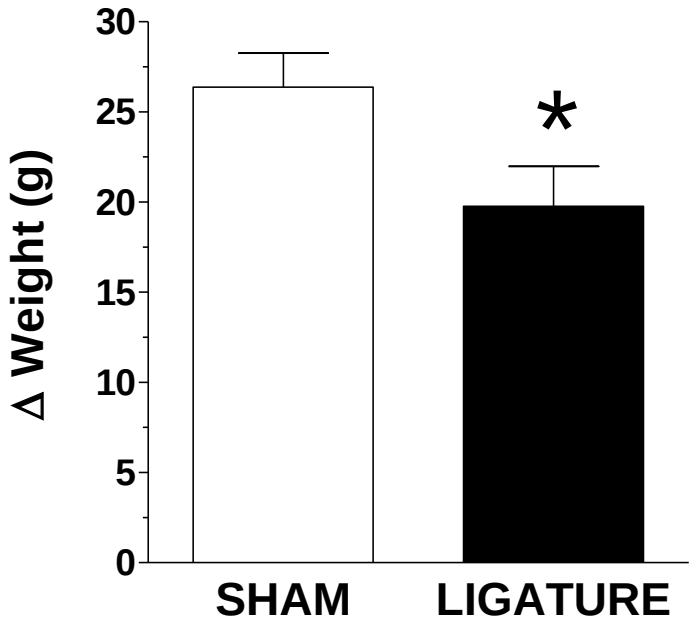
Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Student *t*- test, dados não-pareados, quando apropriado (aplicado pelo GraphPad Prism Software, EUA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes com o nível mínimo aceitável para valores de $p<0,05$.

# 4 RESULTADOS

## 4.1 Avaliação do peso corporal

Ambos os grupos (Sham e Ligadura) tiveram a média do peso inicial semelhante, o grupo sham 268,8 g e o grupo ligadura 267,4 g, após sete dias do procedimento, o grupo de animais com Ligadura apresentaram diminuição no ganho ponderal do peso quando comparado ao grupo Sham (Sham: 26,4±1,9 vs. Ligadura: 19,8±2,2, P<0,05; Figura 2).

**Figura 2**- Peso corporal dos grupos de animais Sham e Ligadura.

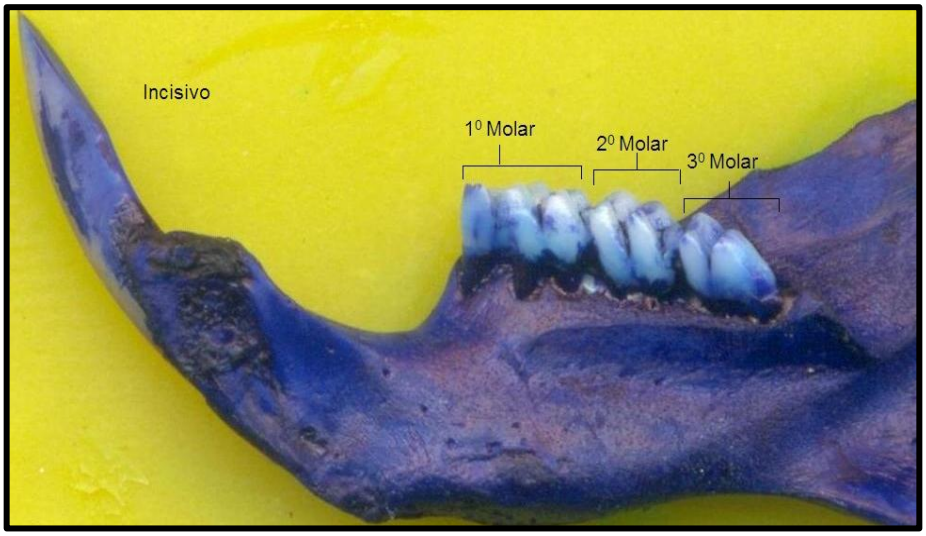



Peso corporal dos grupos de ratos Sham e com Ligadura (n= 20 e 18 ratos/ grupo, respectivamente). *P<0,05 vs. sham, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

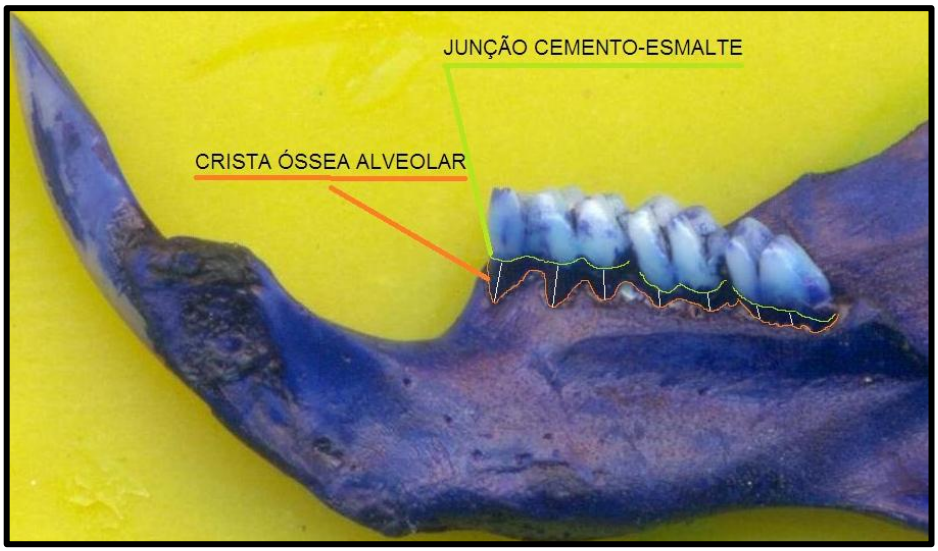
## 4.2 Análise macroscópica da perda óssea alveolar.

**Figura 3-** Imagens representativas da medição da perda óssea alveolar das hemi-mandíbulas.

**A**

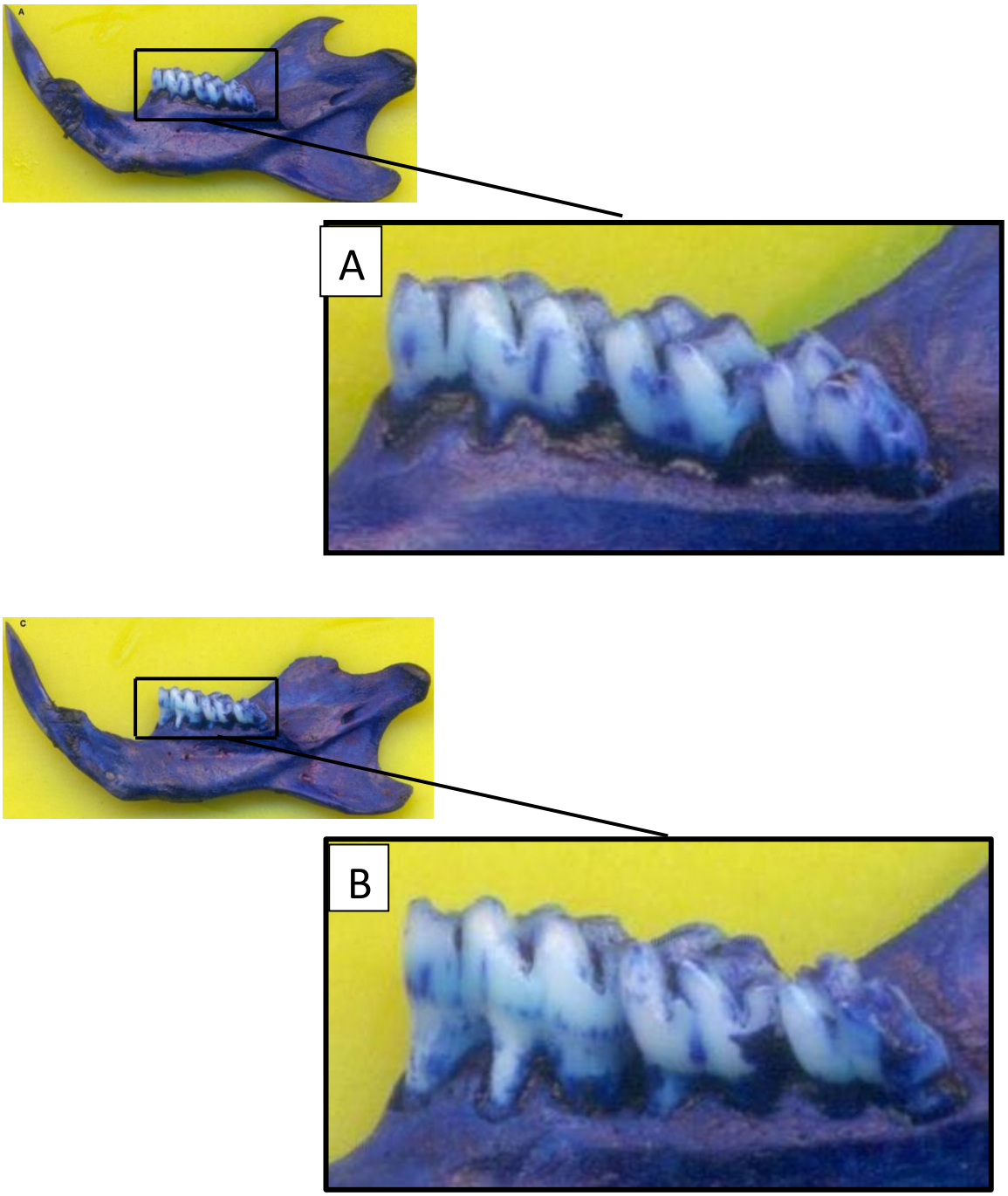



**B**




Análise de perda óssea para hemi-mandíbula do lado direto. Identificação dos dentes molares e coloração com azul de metileno (A); Delimitação da JCE, em verde, e da COA, em vermelho. As medidas foram realizadas entre a JCE e COA, demonstradas através das linhas brancas verticais (B).

**Figura 4-** Imagens representativas da perda óssea alveolar das hemi-mandíbulas.

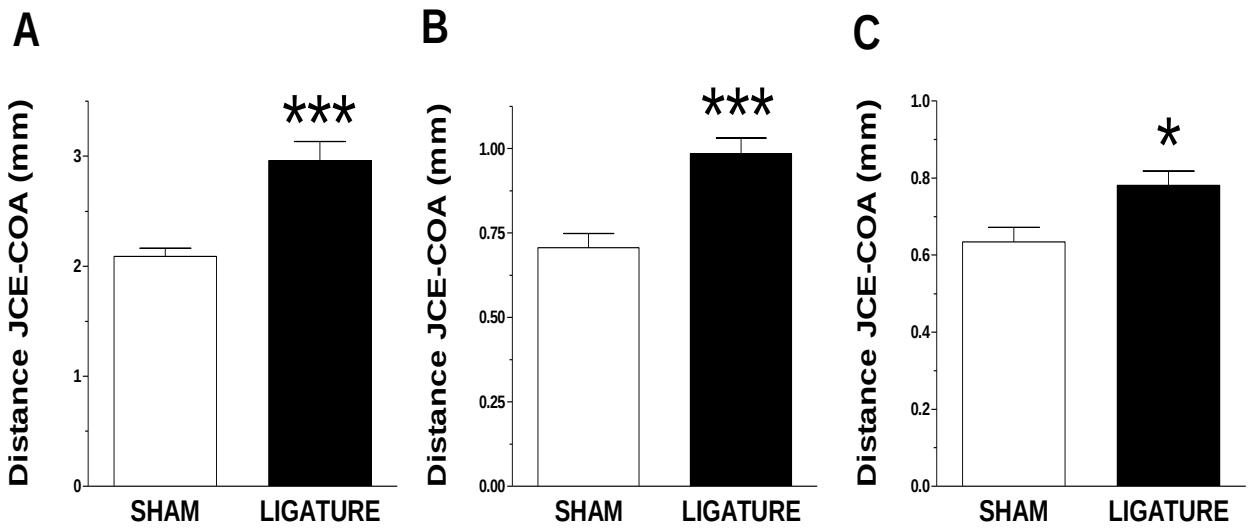



Efeito da presença de ligadura durante sete dias, hemi-mandíbulas dos grupos de animais Sham e Ligadura, face lingual – lado direito. (Sham: painel A e Ligadura: painel B).

4.2.3 Perda óssea alveolar das hemi-mandíbulas do lado direito.

Como apresentado na Figura 5, grupo de ratos com sete dias de ligadura com aumento significativo da distância (mm) entre a JCE e COA dos molares, primeiro molar (Sham: 2,1±0,1 vs. Ligadura 3,0±0,2, P<0,001; painel A), segundo molar (Sham: 0,7±0,04 vs. Ligadura 1,0±0,04, P<0,001; painel B) e terceiro molar (Sham: 0,6±0,04 vs. Ligadura 0,8±0,04, P<0,05; painel C), das hemi-mandíbulas do lado direito, quando comparados com grupo de animais Sham.

**Figura 5**- Efeito da presença de ligadura durante sete dias sobre a perda óssea alveolar dos molares, hemi-mandíbulas do lado direito, dos grupos Sham e Ligadura.

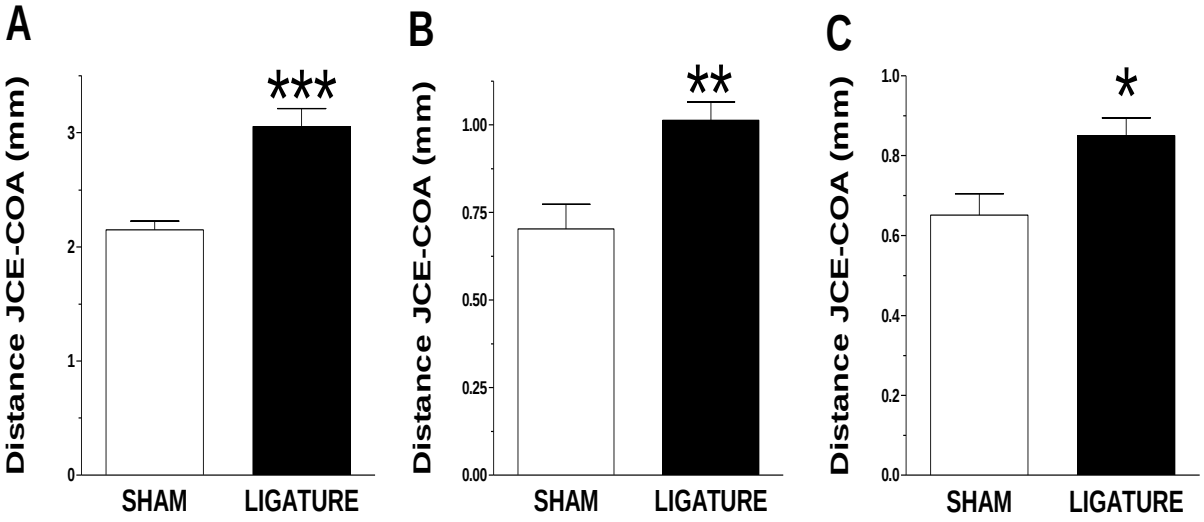



Efeito da ligadura em ratos na perda óssea alveolar dos molares, primeiro molar (painel A), segundo molar (painel B), terceiro molar (painel C), das hemi-mandíbulas do lado direito, grupos de animais Sham e Ligadura (n= 8 ratos/ grupo). *P<0,05 e ***P<0,001 vs. Sham, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.2.4 Perda óssea alveolar das hemi-mandíbulas do lado esquerdo.

Como observado na Figura 6, animais com ligadura apresentam aumento estatisticamente significativo da distância (mm) entre a JCE e COA dos molares, primeiro molar (Sham: 2,1±0,1 vs. Ligadura 3,0±0,2, P<0,001; painel A), segundo molar (Sham: 0,7±0,1 vs. Ligadura 1,0±0,05, P<0,01; painel B) e terceiro molar (Sham: 0,7±0,05 vs. Ligadura 0,8±0,04, P<0,05; painel C), das hemi-mandíbulas do lado esquerdo, quando comparados com grupo de animais Sham.

**Figura 6**- Efeito da indução de periodontite, avaliado no sétimo dia após a colocação da ligadura, sobre a perda óssea alveolar dos molares, hemi-mandíbulas do lado esquerdo, dos grupos Sham e Ligadura.



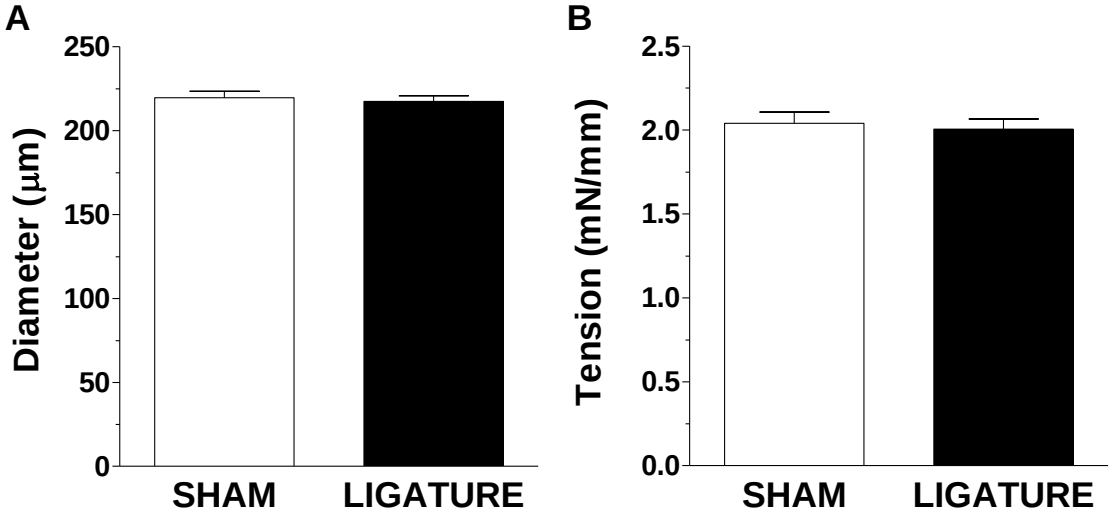

Efeito da ligadura em ratos na perda óssea alveolar dos molares, primeiro molar (painel A), segundo molar (painel B), terceiro molar (painel C), das hemi-mandíbulas do lado esquerdo, grupos de animais Sham e Ligadura (n= 8 ratos/ grupo). *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 vs. Sham, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

## 4.3 Reatividade vascular em artéria mesentérica de resistência.

### 4.3.1 Diâmetro luminar e tensão vascular ativa.

Não foram observadas diferenças significativas no diâmetro interno (Sham: 219,7±3,9 vs. Ligadura 217,3±3,6, Figura 7 A) e na tensão ativa (Sham: 2,0±0,1 vs. Ligadura 2,0±0,1, Figura 7 B) das artérias mesentéricas de resistência entre os grupos Sham e Ligadura.

**Figura 7**- Diâmetro interno e a tensão ativa em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.

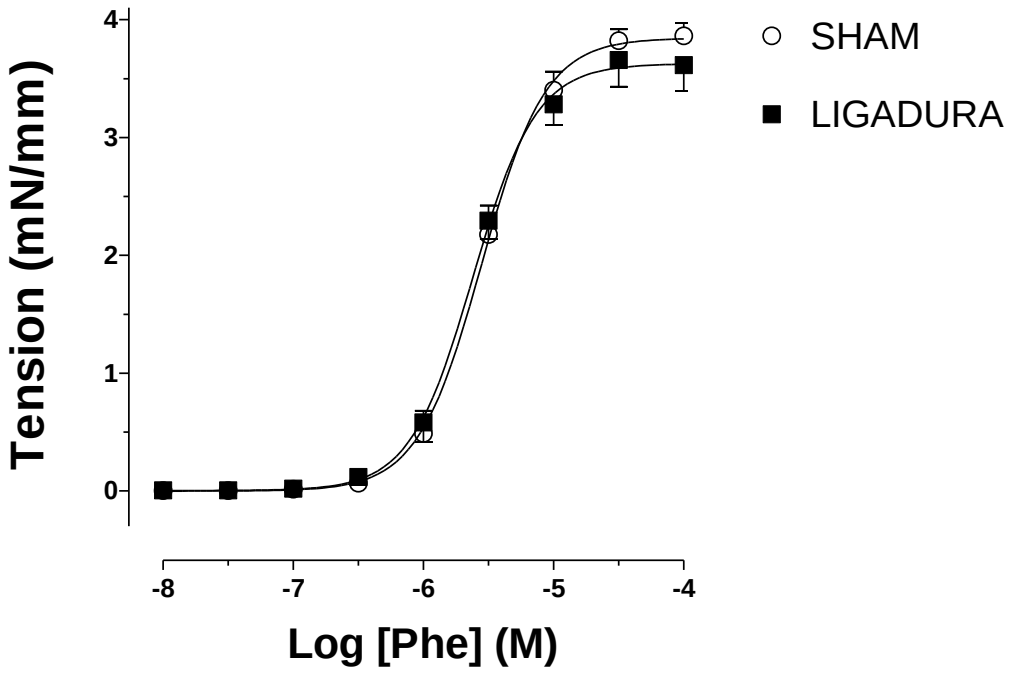



Tensão ativa de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e Ligadura, Diâmetro (µm, n= 81 e 77 ratos/ grupo, respectivamente, painel A) e resposta contrátil ao KCl 120 mM (mN/mm, n= 43 e 47 ratos/ grupo, respectivamente, painel B), de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.2 Resposta vasoconstritora à fenilefrina.

A fenilefrina promoveu contração dependente da concentração, em segmentos de artérias mesentéricas dos grupos Sham e Ligadura (Figura 8). Não houve diferenças na resposta máxima ($E_{max}$: Sham 3,9±0,1 vs. Ligadura 3,6±0,2), nem na sensibilidade ($pD_2$: Sham 5,5±0,08 vs. Ligadura 5,7±0,06) à contração induzida por este agonista entre os grupos avaliados.

**Figura 8**- Curva de contração em função da concentração de fenilefrina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.

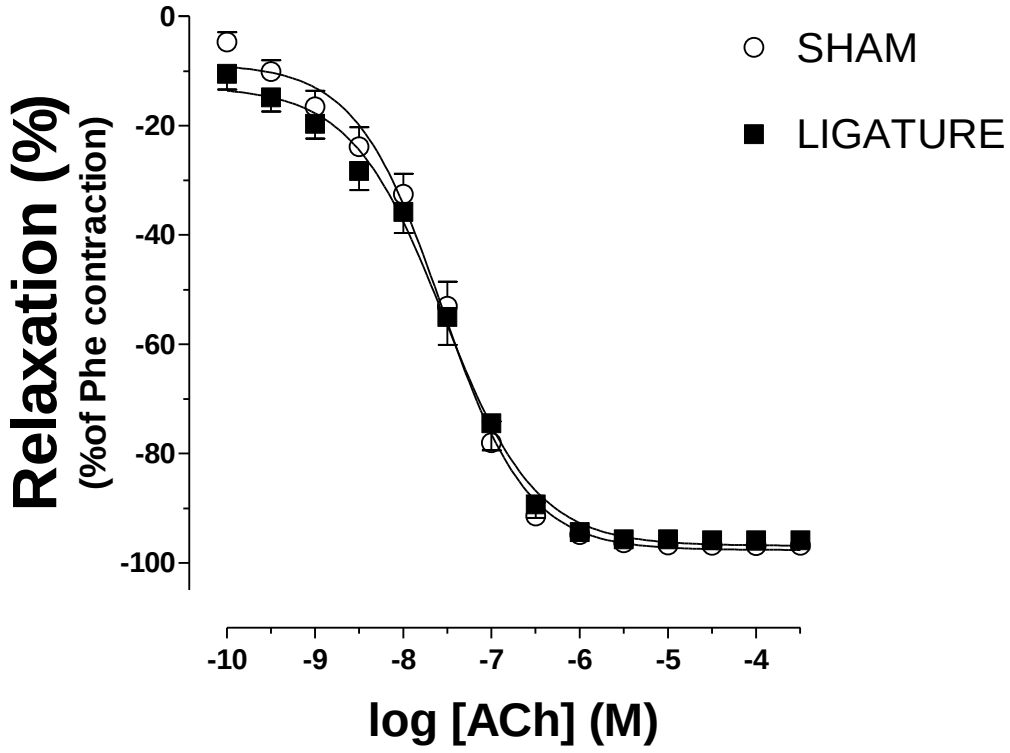



Curva de contração *in* vitro de segmentos de artéria mesentérica isolada de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentração crescente à fenilefrina. Valores expressos como média ± E.P.M. (n= 17 e 18 ratos/ grupo, respectivamente), de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.3 Resposta vasorelaxante dependente do endotélio.

A acetilcolina (ACh) promoveu relaxamento dependente da concentração nos segmentos de artérias mesentéricas, previamente contraídas com fenilefrina (10 µM), dos grupos estudados (Figura 9). Não foi observada diferença significativa na curva de concentração-resposta à ACh do grupo Sham em relação ao grupo Ligadura ($pD_2$: Sham 7,6±0,1 vs. Ligadura 7,5±0,1, $E_{max}$: Sham 98,0±0,7 vs. Ligadura 97,0±1,1).

**Figura 9**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.

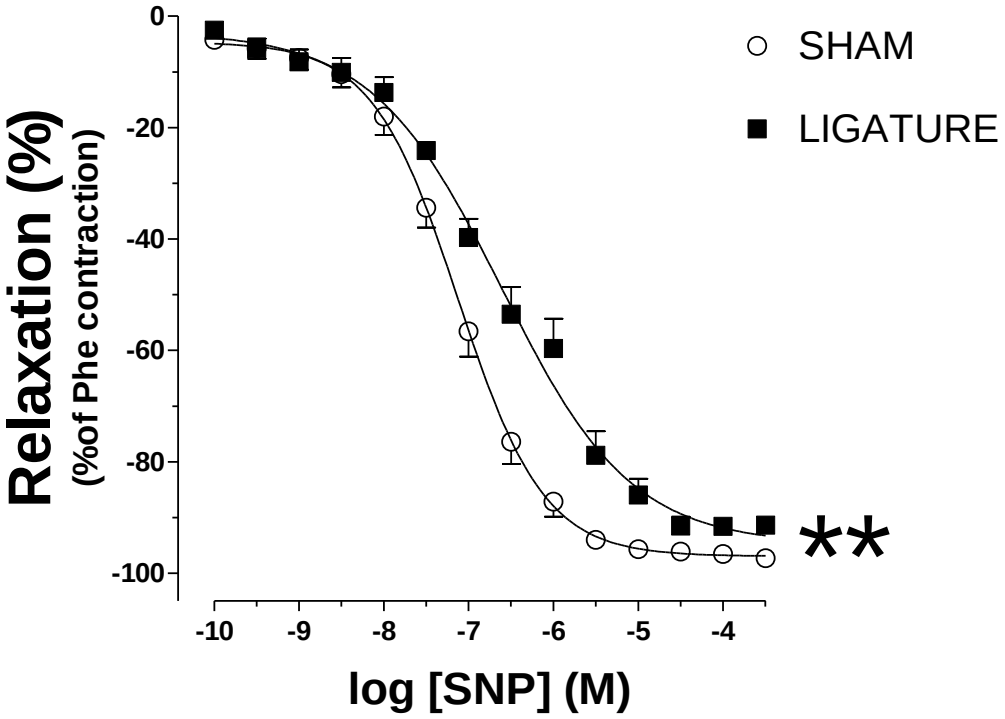



Curva de relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentrações crescentes à acetilcolina. Valores expressos como média ± E.P.M. (n= 21 e 15 ratos/ grupo, respectivamente), de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.4 Resposta vasorelaxante independente do endotélio ao nitroprussiato de sódio.

O nitroprussiato de sódio (SNP) em concentrações crescentes promoveu o relaxamento das artérias mesentéricas de resistência de ambos os grupos, previamente contraídas com fenilefrina (10 µM, Figura 10). Foram observadas diferenças significativas na potência ($pD_2$: Sham 7,1±0,1 vs. Ligadura 6,4±0,2, P<0,01) ocorrendo uma menor sensibilidade do grupo Ligadura ao relaxamento induzido pelo SNP. Não houve diferença na resposta máxima ($E_{max}$: Sham 97,0±0,8 vs. Ligadura 94,4±2,4) ao relaxamento induzido pelo SNP do grupo Ligadura comparado ao grupo Sham.

**Figura 10**- Curva de relaxamento em função da concentração do SNP em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.

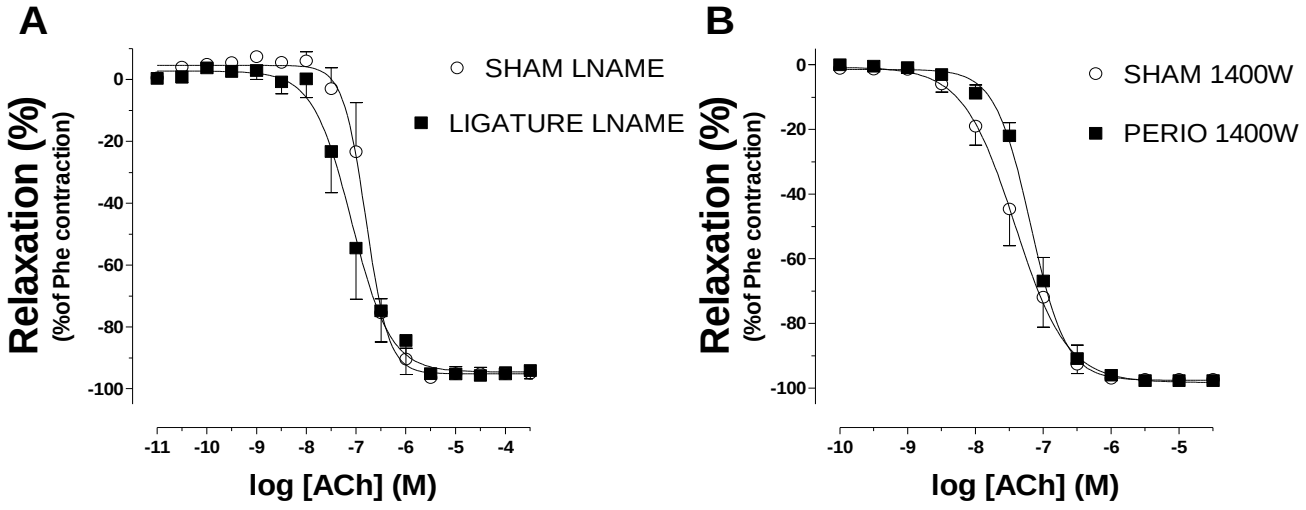



Curva de relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio. Valores expressos como média ± E.P.M. (n= 17 e 11 ratos/ grupo, respectivamente). **P<0,01 vs. Sham, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.5 Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasorelaxante à acetilcolina.

As artérias foram incubadas com L-NAME (inibidor não específico das isoformas da NOS, 100 µM, painel A) e 1400W (inibidor específico da isoforma iNOS, 10 µM, painel B). A ACh promoveu o relaxamento dependente da concentração nos segmentos de artérias mesentéricas, previamente contraídas com fenilefrina (10 µM) dos grupos Sham e Ligadura (Figura 11). Não foi observadas diferenças no pD2 (LNAME: Sham 6,9±0,1 vs. Ligadura 7,4±0,4 e 1400W: Sham 7,4±0,1 vs. Ligadura 7,2±0,1) e $E_{max}$ (LNAME: Sham 95,4±2,0 vs. Ligadura 95,7±1,2 e 1400W: Sham 97,6±0,9 vs. Ligadura 98,3±0,4) nas curvas concentração-resposta à acetilcolina entre os grupos Sham e Ligadura.

**Figura 11**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura, incubadas com L-NAME (painel A) e 1400W (painel B).

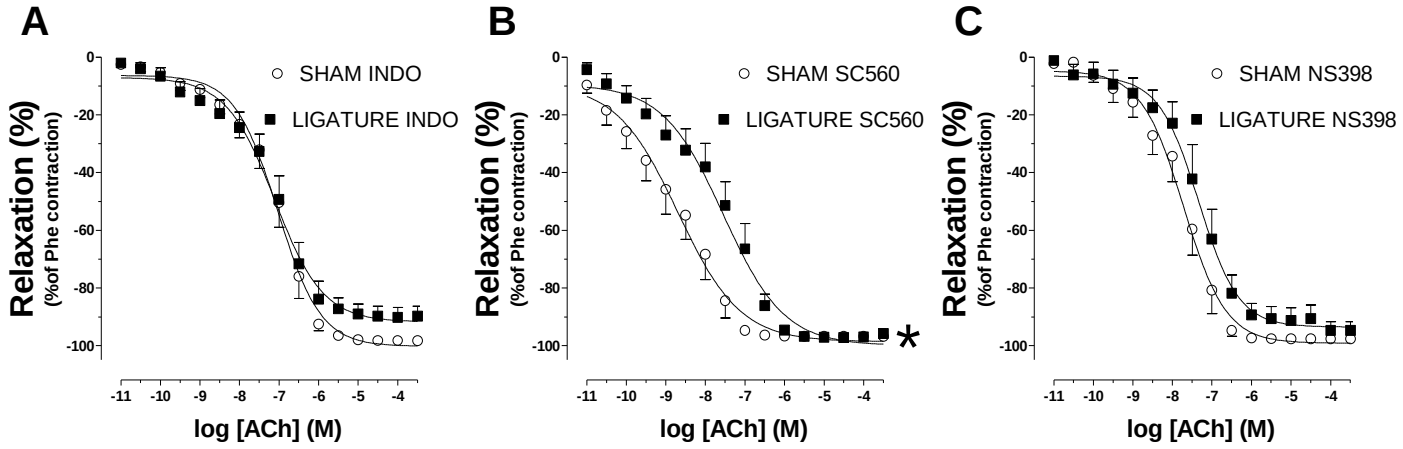



Curva de relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentrações crescentes à acetilcolina, previamente incubadas com L-NAME (n= 6 ratos/ grupo, painel A) e 1400W (10 e 9 ratos/ grupo, respectivamente, painel B). Valores expressos como média ± E.P.M, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados

4.3.6 Efeito da inibição das isoformas de ciclooxigenases sobre a resposta vasorelaxante à acetilcolina.

Para a inibição da enzima COX, as artérias foram incubadas com Indometacina (inibidor não seletivo da COX, INDO, 10 µM), SC560 (inibidor seletivo COX-1, 1 µM). NS398 (inibidor seletivo da COX-2, 10 µM). A ACh promoveu relaxamento dependente da concentração utilizada nos segmentos de artérias mesentéricas, contraídas com fenilefrina (10 µM) dos grupos Sham e Ligadura (Figura 12). Não houve diferenças significativas nas curvas de concentração-resposta à ACh com os inibidores INDO ($pD_2$: Sham 7,0±0,2 vs. Ligadura 7,1±0,3 e $E_{max}$: Sham 99,5±0,4 vs. Ligadura 94,0±3,7, painel A) e NS398 ($pD_2$: Sham 7,8±0,2 vs. Ligadura 7,3±0,2 e $E_{max}$: Sham 98,7±0,3 vs. Ligadura 92,1±4,2, painel B). Entretanto, a incubação com SC560 deslocou a curva de relaxamento à ACh do grupo Ligadura para a direita com relação ao grupo Sham. ($pD_2$: Sham 9,0±0,5 vs. Ligadura 7,7±0,3 e $E_{max}$: Sham 98,2±1,8 vs. Ligadura 98,0±1,1, P<0,05; painel C).

**Figura 12**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais sham e ligadura, previamente incubadas com Indometacina (painel A), SC560 (painel B) e NS398 (painel C).

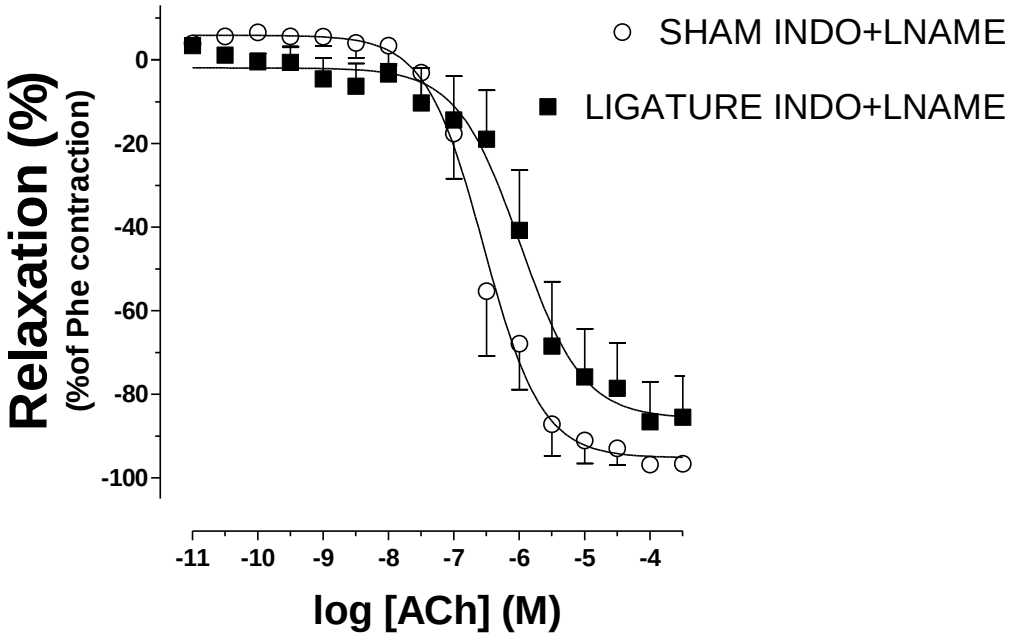



Curva de relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentérica isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentração crescentes à acetilcolina, previamente incubadas com indometacina (n= 9 e 7 ratos/ grupo, respectivamente, painel A), SC560 (n= 8 e 13 ratos/ grupo, respectivamente, painel B) e NS398 (n= 6 ratos/ grupo, painel C). Valores expressos como média ± E.P.M, *P<0,05 vs. Sham, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.7 Efeito da inibição da enzima cicloxigenase e da síntese do óxido nítrico sobre a resposta vasorelaxante à acetilcolina.

As artérias mesentéricas de resistência de ambos os grupos foram incubadas com Indometacina (10 µM) e L-NAME (100 µM), (inibidor inespecífico da COX e da síntese do NO, respectivamente). Para induzir o relaxamento dependente da concentração foi utilizada acetilcolina em segmentos de artérias, contraídas com fenilefrina (10 µM), dos grupos estudados (Figura 13). Não foram observadas diferenças significativas na curva de concentração-resposta à acetilcolina entre os grupos Sham e Ligadura ($pD_2$: Sham 6,2±0,4 vs. Ligadura 6,3±0,3 e $E_{max}$: Sham 95,7±1,8 vs. Ligadura 81,1±11,5, Figura 11).

**Figura 13**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais Sham e Ligadura, incubadas com Indometacina e L-NAME.

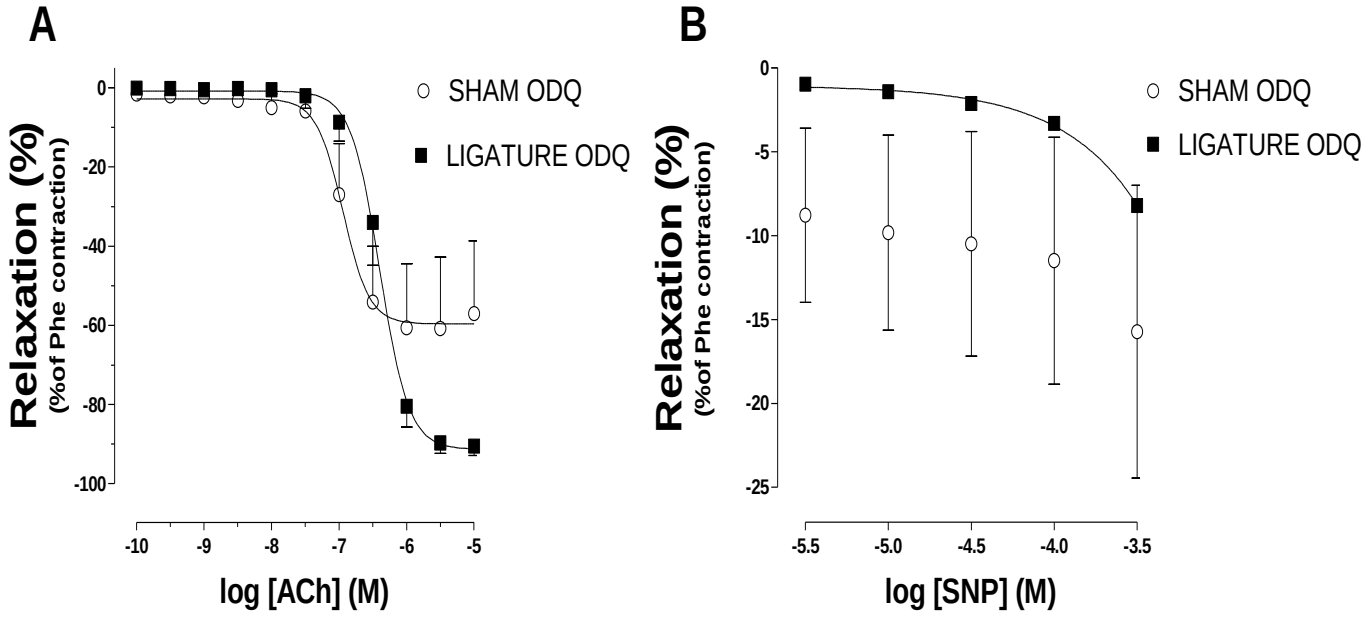



Curva relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e com Ligadura em resposta a concentrações crescentes à acetilcolina, com incubação de Indometacina + L-NAME. Valores expressos como média ± E.P.M. (n= 6 ratos/ grupo), de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.8 Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel sobre a resposta vasorelaxante.

As artérias mesentéricas foram incubadas com ODQ (10 µM) para a inibição da enzima da guanilato ciclase solúvel. A ACh (painel A) e SNP (painel B) promoveram relaxamento dependente da concentração, pré-contraídas com fenilefrina (10 µM), tanto em segmentos de artérias mesentéricas do grupo Sham quanto do grupo Ligadura (Figura 14). Não foram observadas diferenças nas curvas à ACh ($pD_2$: Sham 6,8±0,1 vs. Ligadura 6,4±0,1 e $E_{max}$, Sham 62,2±15,8 vs. Ligadura 91,2±2,6) e SNP ($pD_2$: Sham 4,0±0,4 vs. Ligadura 3,7±0,6 e $E_{max}$: Sham 13,17±3,7 vs. Ligadura 10,0±3,1) do grupo Ligadura comparado ao grupo Sham.

**Figura 14**- Curva de relaxamento em função da concentração da acetilcolina (painel A) e ao nitroprussiato de sódio (painel B) em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais Sham e Ligadura, incubadas com inibidor ODQ.

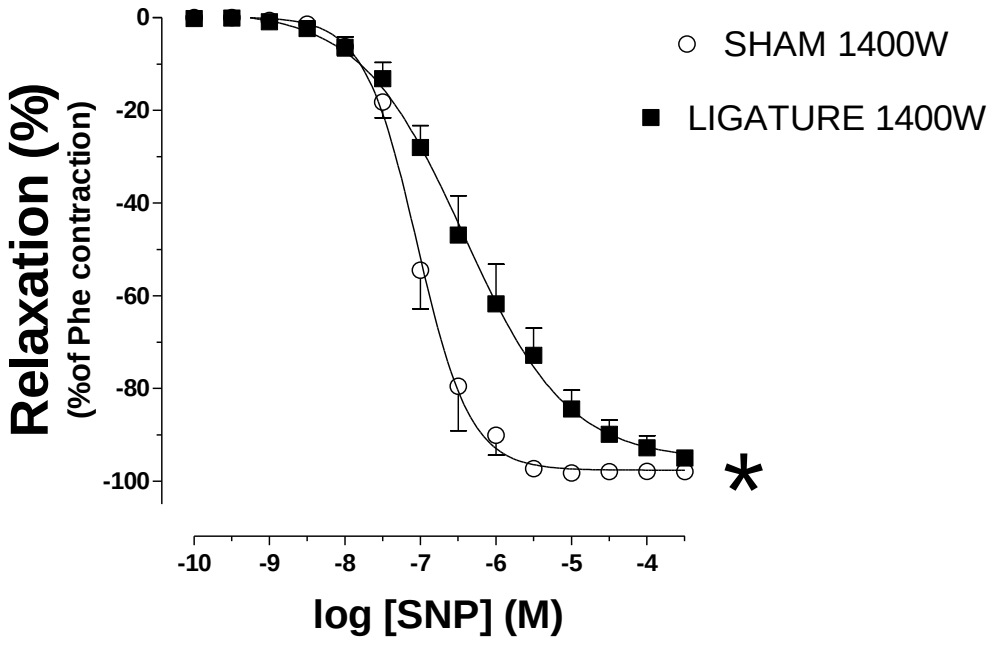



Curva relaxamento *in* vitro de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentrações crescentes à acetilcolina (n= 7 e 6 ratos/ grupo, respectivamente, painel A) e ao nitroprussiato de sódio (n= 9 e 7 ratos/ grupo, respectivamente, painel B) com incubação de ODQ. Valores expressos como média ± E.P.M., de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.9 Efeito da inibição da síntese do óxido nítrico, isoforma induzível (iNOS), sobre a resposta vasorelaxante ao nitroprussiato de sódio.

As artérias mesentéricas de resistência de ambos os grupos foram incubadas com 1400W (inibidor específico da iNOS, 10 µM). Administração de SNP promoveu relaxamento dependente da concentração nos segmentos de artérias mesentéricas previamente contraídas com fenilefrina (10 µM) dos grupos estudados (Figura 15). Foi observada diferença significativa na curva de concentração-resposta ao SNP, havendo uma menor sensibilidade ao grupo Ligadura quando comparado ao grupo Sham ($pD_2$: Sham 7,0±0,1 vs. Ligadura 6,4±0,2 e $E_{max}$: Sham 98,7±0,7 vs. Ligadura 95,0±2,5, P<0,05;).

**Figura 15**- Curva de relaxamento em função da concentração do SNP em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura, incubadas com 1400W.

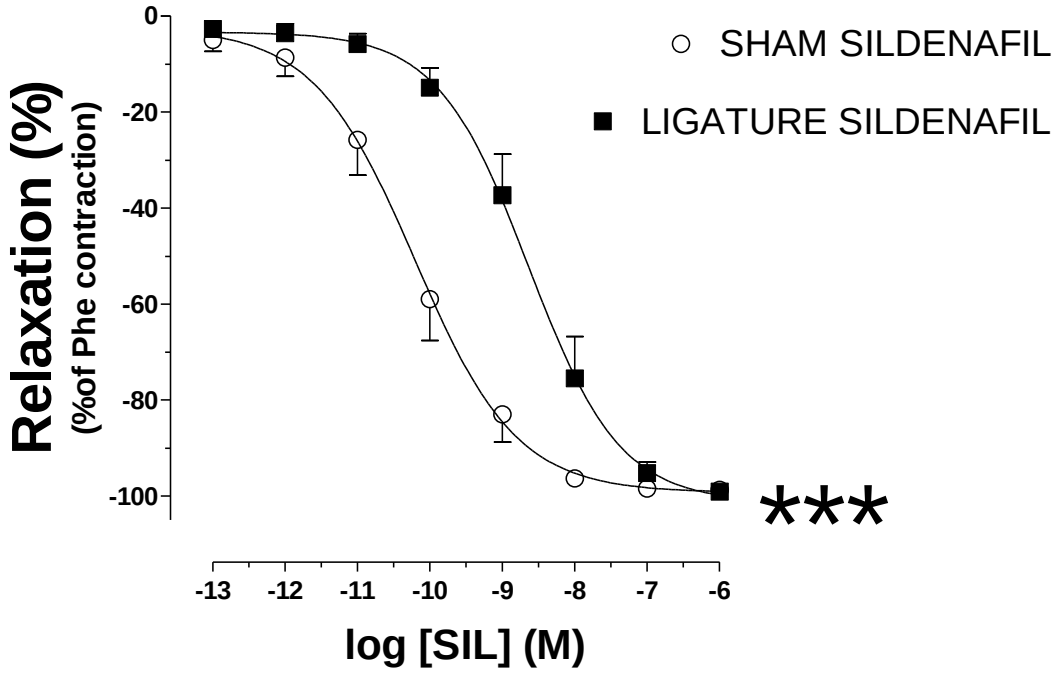



Curva relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentrações crescentes à acetilcolina, com incubação de 1400W. Valores expressos como média ± E.P.M. (n= 8 ratos/ grupo). *P<0,05 vs. Sham, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.10 Efeito da inibição da fosfodiesterase V sobre a resposta vasorelaxante.

A administração de sildenafil (SIL) promoveu relaxamento dependente da concentração nos segmentos de artérias mesentéricas, previamente contraídas com fenilefrina (10 µM), dos grupos estudados (Figura 16). Foram observadas diferenças significativas na potência ($pD_2$: Sham 10,3±0,2 vs. Ligadura 8,6±0,2, P<0,001), ocorrendo uma menor sensibilidade do grupo Ligadura ao relaxamento induzido pelo SIL. Não houve diferença na resposta máxima ($E_{max}$: Sham 98,5±0,6 vs. Ligadura 100,4±1,0) ao relaxamento induzido pelo SIL do grupo Ligadura comparado ao grupo Sham.

**Figura 16**- Curva de relaxamento em função da concentração de SIL em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.

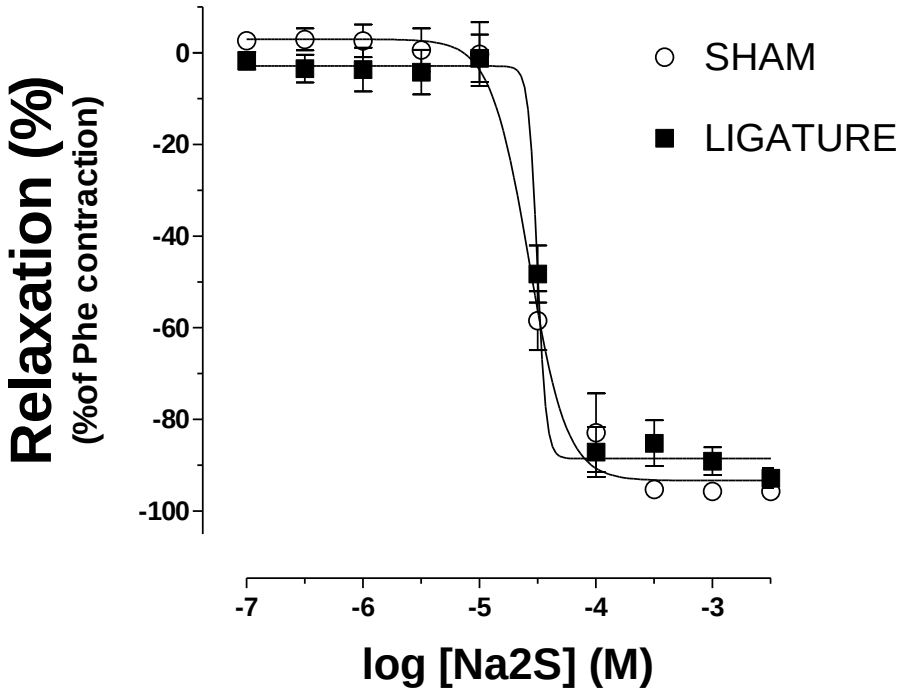



Curva relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e com Ligadura em resposta a concentrações crescentes ao sildenafil. Valores expressos como média ± E.P.M. (n= 9 e 7 ratos/ grupo, respectivamente). ***P<0,001 vs. Sham, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.11 Efeito do sulfeto de sódio sobre a resposta vasorelaxante.

O sulfeto de sódio ($Na_2S$) promoveu relaxamento dependente da concentração nos segmentos de artérias mesentéricas, previamente contraídas com fenilefrina (10 µM), dos grupos estudados (Figura 17). Não foi observada diferença significativa na curva de concentração-resposta ao $Na_2S$ do grupo Sham em relação ao grupo Ligadura ($pD_2$: Sham 4,4±0,1 vs. Ligadura 4,2±0,4, $E_{max}$: Sham 97,3±1,9 vs. Ligadura 93,9±2,3).

**Figura 17**- Curva de relaxamento em função da concentração de sulfeto de sódio em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura.

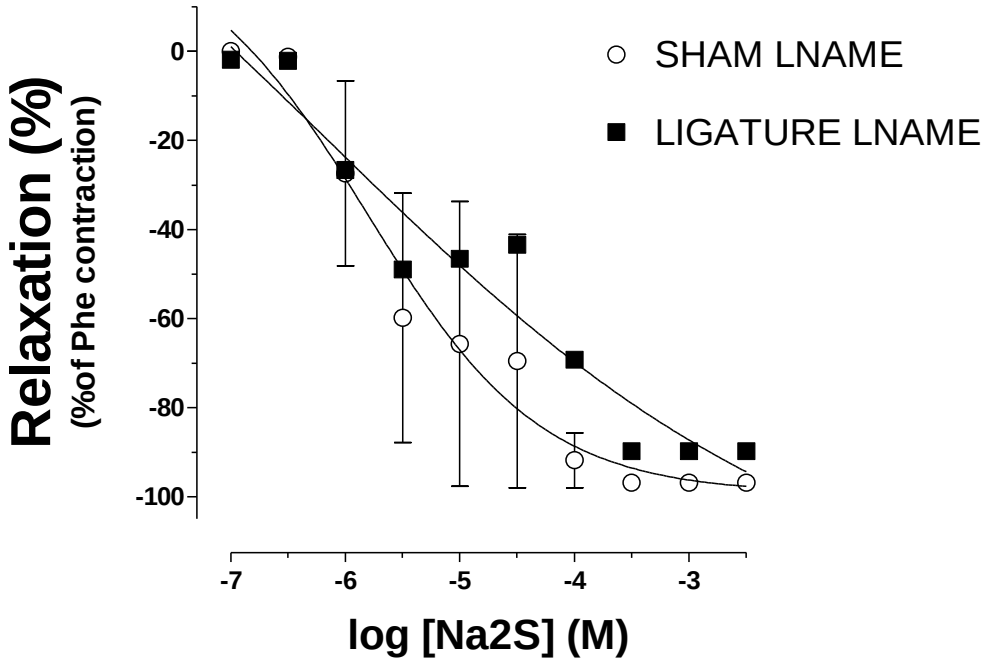



Curva de relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentrações crescentes ao sulfeto de sódio. Valores expressos como média ± E.P.M. (n= 7 e 9 ratos/ grupo, respectivamente), de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.12 Efeito da inibição da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasodilatadora ao sulfeto de sódio.

As artérias foram incubadas com L-NAME (inibidor não específico das isoformas da NOS, 100 µM). O $Na_2S$ promoveu o relaxamento dependente da concentração nos segmentos de artérias mesentéricas, previamente contraídas com fenilefrina (10 µM) dos grupos Sham e Ligadura (Figura 18). Não foram observadas diferenças no pD2 (Sham 5,3±0,6 vs. Ligadura 5,0±1,0) e no $E_{max}$ (Sham 96,9±1,1 vs. Ligadura 89,8±9,1) nas curvas concentração-resposta ao $Na_2S$ entre os grupos Sham e Ligadura.

**Figura 18**- Curva de relaxamento em função da concentração de sulfeto de sódio em segmentos de artérias mesentéricas de grupos Sham e Ligadura, incubadas com L-NAME.

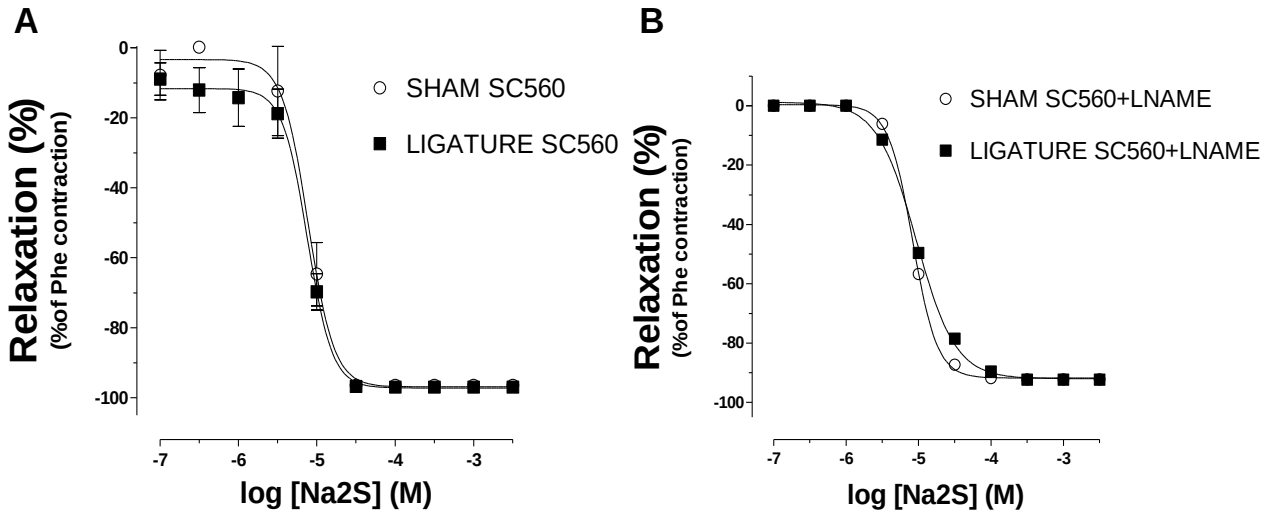



Curva de relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentrações crescentes ao sulfeto de sódio, previamente incubadas com L-NAME (n= 3 e 2 ratos/ grupo, respectivamente). Valores expressos como média ± E.P.M, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados

4.3.13 Efeito da inibição da cicloxigenase-1 e da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasodilatadora ao sulfeto de sódio.

Para a inibição da enzima COX, as artérias foram incubadas com SC560 (inibidor seletivo COX-1, 1 µM) e L-NAME (inibidor não específico das isoformas da NOS, 100 µM). O $Na_2S$ promoveu relaxamento dependente da concentração utilizada nos segmentos de artérias mesentéricas, contraídas com fenilefrina (10 µM) dos grupos Sham e Ligadura (Figura 19). Não houve diferenças significativas na curva de concentração-resposta ao $Na_2S$ com o inibidor SC560 ($pD_2$: Sham 5,1±0,1 vs. Ligadura 5,1±0,02 e $E_{max}$: Sham 96,6±0,6 vs. Ligadura 97,4±0,4, painel A).

**Figura 19**- Curva de relaxamento em função da concentração de sulfeto de sódio em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais Sham e Ligadura, previamente incubadas com SC560 (painel A), SC560 + Lname (painel B).

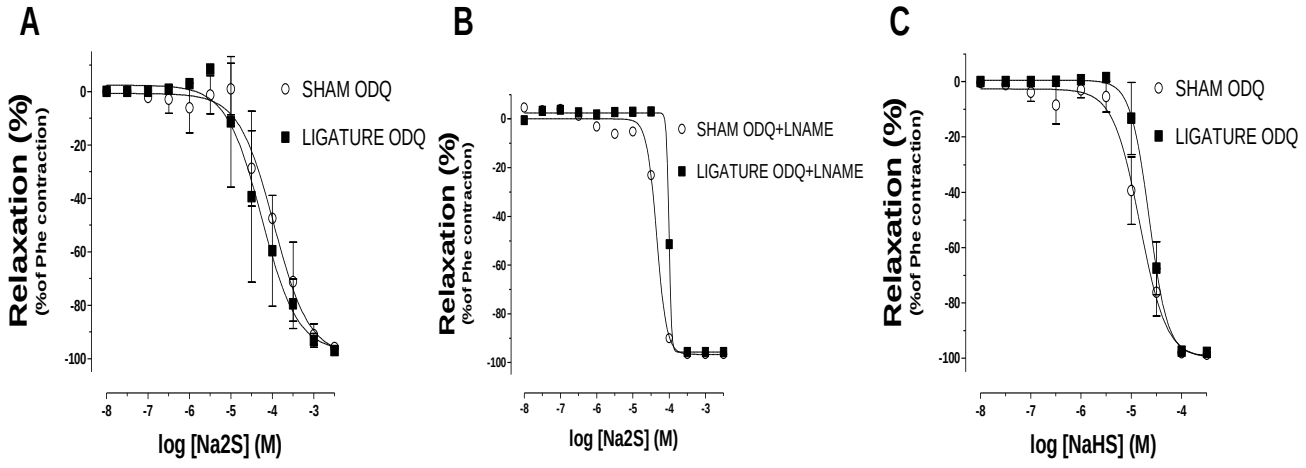



Curva de relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentérica isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentração crescentes ao sulfeto de sódio, previamente incubadas com SC560 (n= 3 e 4 ratos/ grupo, respectivamente, painel A), SC560 + Lname (n= 1 ratos/ grupo, painel B). Valores expressos como média ± E.P.M, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.3.14 Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel e da síntese de óxido nítrico sobre a resposta vasorelaxante.

As artérias mesentéricas foram incubadas com ODQ (10 µM) para a inibição da enzima da guanilato ciclase solúvel e L-NAME (inibidor não específico das isoformas da NOS, 100 µM). O $Na_2S$ (painel A e B) e NaHS (painel C) promoveram relaxamento dependente da concentração, pré-contraídas com fenilefrina (10 µM), tanto em segmentos de artérias mesentéricas do grupo Sham quanto do grupo Ligadura (Figura 20). Não foram observadas diferenças nas curvas ao $Na_2S$ ($pD_2$: Sham 3,7±0,3 vs. Ligadura 4,3±0,4 e $E_{max}$, Sham 96,1±0,3 vs. Ligadura 95,5±1,4, painel A) e NaHS ($pD_2$: Sham 4,9±0,2 vs. Ligadura 4,6±0,1 e $E_{max}$: Sham 99,2±1,0 vs. Ligadura 97,9±0,3) do grupo Ligadura comparado ao grupo Sham.

**Figura 20**- Curva de relaxamento em função da concentração de sulfeto de sódio (painel A e B) e ao hidrossulfeto de sódio (painel C) em segmentos de artérias mesentéricas de grupos de animais Sham e Ligadura, incubadas com inibidor ODQ (painel A e C) e ODQ+Lname (painel B).



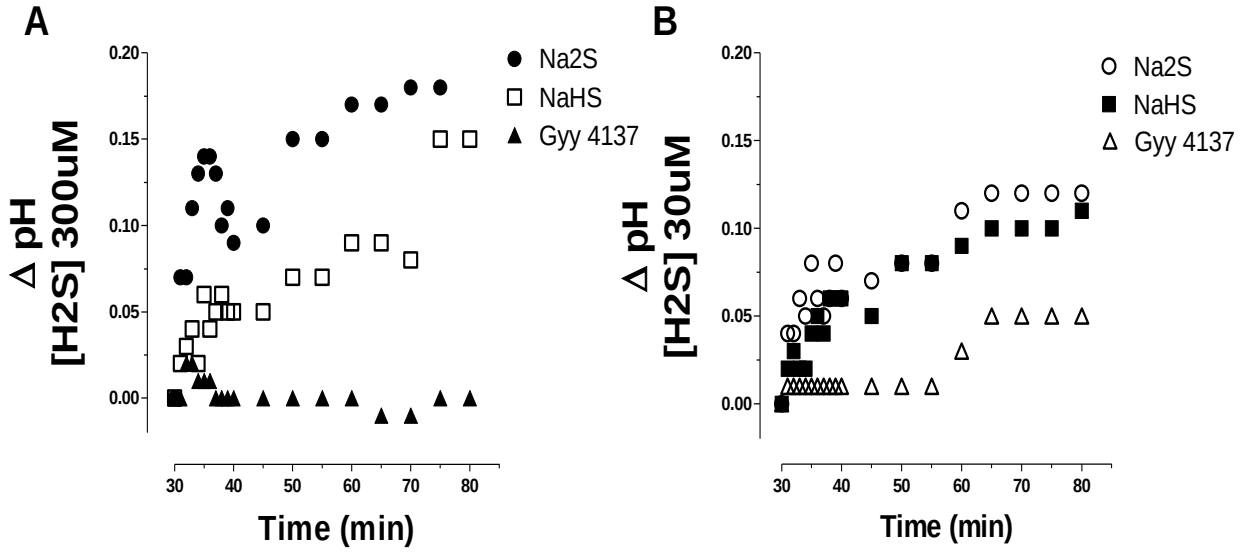

Curva relaxamento *in* vitro de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos Sham e Ligadura em resposta a concentrações crescentes ao sulfeto de sódio (n= 2 e 3 ratos/ grupo, respectivamente, painel A), sulfeto de sódio (n= 1 ratos/ grupo, painel B) e ao hidrossulfeto de sódio (n= 5 ratos/ grupo, painel C) com incubação de ODQ e ODQ+Lname. Valores expressos como média ± E.P.M., de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

## 4.4 Estudo da perda de $H_2S$ no miógrafo pela medição do pH

### 4.4.1 Estudo da cinética dos doadores de $H_2S$.

Com uma única concentração de 300 µM (Figura 21, Painel A) e 30 µM (Figura 21, Painel B) dos doadores de $H_2S$. Foi observado diferenças à resposta ao pH entre os doadores de $H_2S$, a qual o doador GYY 4137 se manteve mais estável no decorrer do tempo, quando comparado aos outros doadores de $H_2S$ ($Na_2S$ e NaHS).

**Figura 21**- Medição do pH com única concentração de doadores de sulfeto de sódio na câmara do miógrafo.

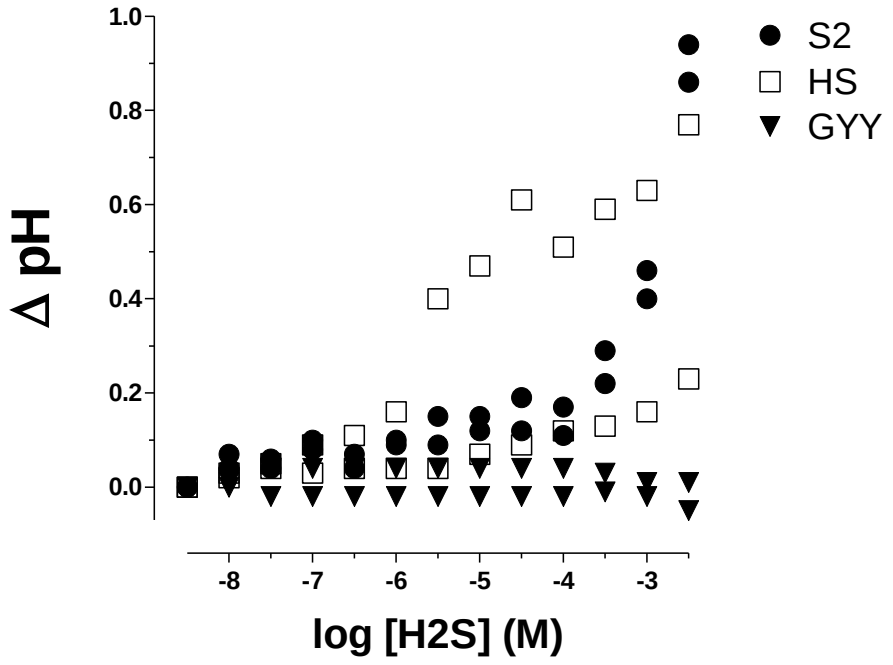



Medição do pH com única concentração (painel A: 300 µM e painel B: 30 µM), de doadores de sulfeto de sódio, $Na_2S$, NaHS e GYY 4137, na câmara do miógrafo.

4.4.2 Efeito dos doadores de sulfeto de sódio sobre a medição do pH

Curva dependente da concentração com doadores de $H_2S$ (Figura 22). Foi observado diferenças à resposta ao pH entre os doadores de $H_2S$, a qual a concentração cumulativa do doador GYY 4137 se manteve mais estável com relação ao pH, quando comparado aos outros doadores de $H_2S$ ($Na_2S$ e NaHS).

**Figura 22**- Curva de concentração-resposta aos doadores de sulfeto de sódio na câmara do miógrafo.



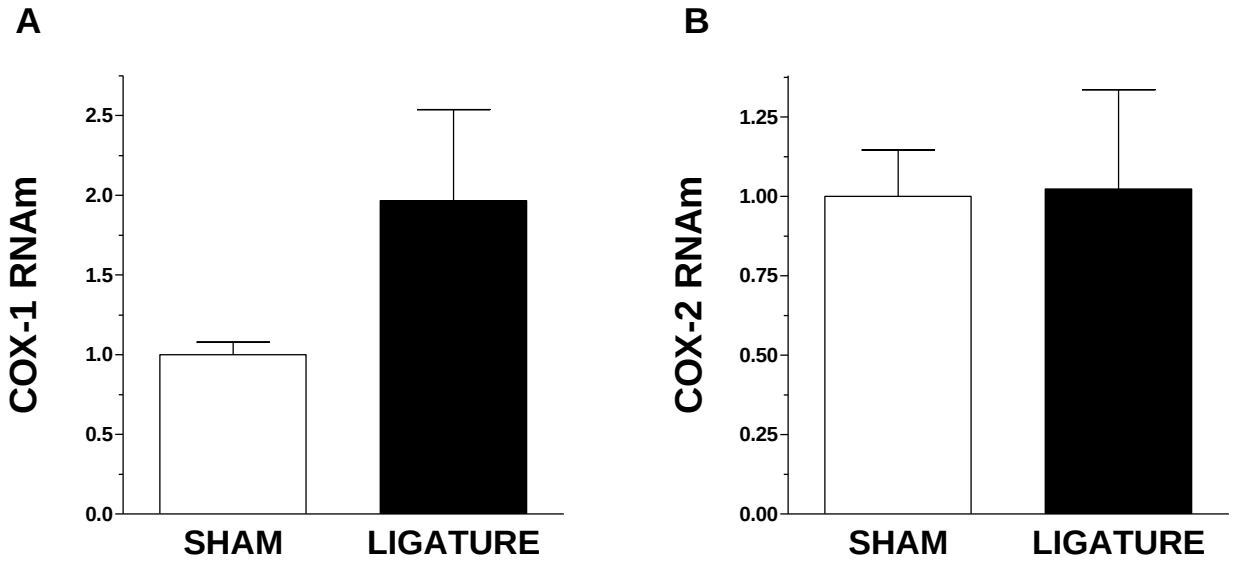

Curva de concentrações crescentes aos doadores de sulfeto de sódio ($Na_2S$, NaHS e GYY 4137, n= 2 para cada droga), na câmara do miógrafo.

## 4.5 Expressão gênica de COX-1, COX-2, nNOS, eNOS e NOS em artéria mesentérica de resistência pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

### 4.5.1 Expressão do RNAm para COX-1 e COX-2.

Como apresentado na Figura 23, a expressão RNAm de COX-1 (Sham 1,0±0,1 vs. Ligadura 2,0±0,6, painel A) e COX-2 (Sham 1,0±0,1 vs. Ligadura 1,0±0,3, painel B) foram semelhantes em artérias mesentéricas entre grupos Sham e Ligadura.

**Figura 23**- Efeito da presença de ligadura, durante sete dias, sobre a expressão de RNAm para COX-1 e COX-2 em artéria mesentérica dos grupos Sham e Ligadura.

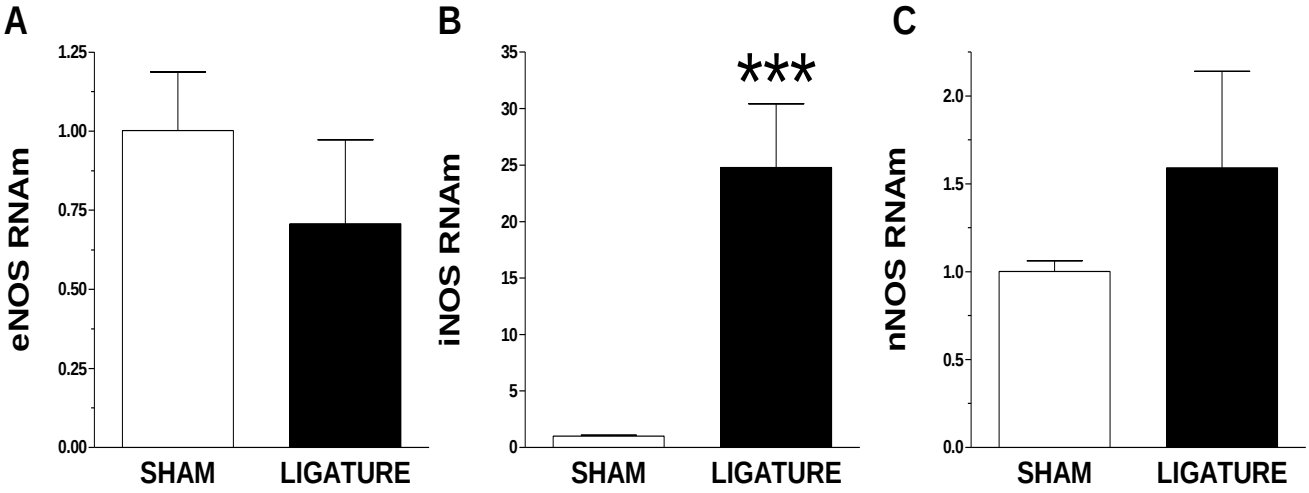



Expressão de RNAm das enzimas COX-1 (n= 8 e 7 ratos/ grupo, respectivamente, painel A) e COX-2 (= 8 e 6 ratos/ grupo, respectivamente, painel B) em segmentos de artérias mesentéricas dos grupos Sham e Ligadura. Valores expressos como média ± E.P.M, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

4.5.2 Expressão do RNAm para eNOS, nNOS e iNOS.

Como observado, animais induzidos com ligadura apresentam um aumento da expressão RNAm para iNOS (Sham 1,0±0,1 vs. Ligadura 24,8±5,6, P<0,001; painel B) quando comparados com grupo Sham em artéria mesentéricas. Entretanto, não houve diferença significativa nas expressões de RNAm das outras duas isoformas, eNOS (Sham 1,0±0,2 vs. Ligadura 0,7±0,3, painel A) e nNOS (Sham 1,0±0,1 vs. Ligadura 1,6±0,5, painel C) em artérias mesentéricas entre o grupo Sham comparado ao grupo Ligadura (Figura 24).

**Figura 23**- Efeito da indução de periodontite avaliada no sétimo dia, após a colocação da ligadura, sobre a expressão de RNAm para eNOS, iNOS e nNOS em artéria mesentérica dos grupos Sham e Ligadura.




Expressão de RNAm das isoformas eNOS (n= 8 e 7 ratos/ grupo, respectivamente, painel A), iNOS (n= 9 e 5 ratos/ grupo, respectivamente, painel B) e nNOS (n= 7 e 6 ratos/ grupo, respectivamente, painel C) e, em segmentos de artérias mesentéricas dos grupos Sham e Ligadura. Valores expressos como média ± E.P.M. *P<0,001 vs. Sham, de acordo com o teste *t* de Student para dados não-pareados.

# 5 DISCUSSÃO

No presente estudo mostram-se evidências de que a inflamação periodontal induzida por ligadura bilateral dos primeiros molares inferiores de ratos pode contribuir para o desenvolvimento de alterações funcionais da vasomotricidade da artéria mesentérica, assim sugerindo que ocorrem efeitos à distância do processo inflamatório gerado localmente.

O modelo de inflamação periodontal induzido por ligadura em roedores está bem estabelecido (Lohinai et al., 1998; Rovin et al., 1966) e baseia-se na facilitação da formação da placa bacteriana no local de colocação da ligadura. Neste estudo foi demonstrado que a presença das ligaduras de algodão, durante sete dias, dos primeiros molares e em ambos os lados, direito e esquerdo, promoveram aumento da perda óssea alveolar (medida pela distância entre a junção cemento-esmalte e crista osso-alveolar) em todos os molares, o que não foi observado no grupo Sham. Estes dados estão de acordo com estudos prévios realizados em nosso laboratório (Herrera et al., 2011a e 2011b), fato que caracteriza a efetiva presença de periodontite.

No presente estudo foi observado diminuição do ganho ponderal, no grupo de ratos com ligadura avaliados no sétimo dia. Tanto o grupo Sham como o Ligadura tiveram a média do peso inicial semelhantes, evidenciando uma população homogênea de animais e confirmando que a diferença de ganho ponderal entre os grupos esta relacionada à presença das ligaduras em torno dos primeiros molares inferiores, provavelmente por dificultar a ingestão da ração.

A dieta é um importante fator para o desenvolvimento de um modelo de doença periodontal de qualidade. De fato, Branch-Mays e colaboradores (2008) observaram que macacos Rhesus (*macaca mulatta*) com periodontite, induzida por ligadura durante 3 meses, que recebiam dieta normal *ad libitum*, tiveram maior perda óssea do que aqueles que tiveram 30% de redução na ingestão calórica, demonstrado pela diminuição significativa na profundidade da sondagem, no nível de inserção clínica, no índice gengival modificado e no sangramento durante a sondagem ou seja, diminuindo a resposta inflamatória consequentemente a destruição periodontal. (Branch-Mays et al., 2008). Apesar destas evidências o nosso modelo animal, grupo Ligadura, mesmo com diminuição do peso, desenvolveu periodontite de forma significativa quando comparado ao grupo Sham,

demonstrando a eficácia da ligadura de algodão no desenvolvimento da doença periodontal apesar da possível diminuição da ingestão alimentar.

A periodontite é uma doença multifatorial que tem como principal fator o estímulo bacteriano. Em resposta a uma agressão externa ocorre o processo inflamatório, envolvendo aumento de neutrófilos e linfócitos no local da lesão. Em consequência deste acúmulo haverá liberação de mediadores diversos, tais como interleucina (IL)-1β, o fator de necrose tumoral (TNF)-α e prostaglandina E2, o que também leva à destruição tecidual do hospedeiro (que no caso específico deste modelo experimental é o periodonto) (Roberts et al., 1997; Tatakis, Kumar, 2005).

A intensa participação das citocinas, principalmente IL-1, IL-6, IL-11, IL 17, TNF- α e as prostaglandinas, na doença periodontal, promovem a diferenciação de osteoclastos precursores em osteoclastos ativos levando a reabsorção óssea, o que, a longo prazo resulta na perda de inserção do dente (Albraith et al., 1997; Bezerra et al., 2000; Cochran, 2008; Holzhausen et al., 2005; Lima et al., 2000; Toker et al., 2009). Além disso, já foi demonstrado que em animais com ligadura tratados com inibidores não seletivos de NOS (L-NAME) ou seletivos de iNOS (aminoguanidina; Herrera et al., 2011a e 2011b, respectivamente) ocorre diminuição da perda óssea secundária à periodontite induzida, mostrando que o óxido nítrico (NO) proveniente da iNOS contribui para o processo de reabsorção óssea.

Na decorrência de infecções crônicas pode ocorrer a disseminação de bactérias ou de produtos bacterianos, tais como o LPS, para o sangue (isto é, septicemia) (Hunter, 1900), como também a liberação excessiva de mediadores inflamatórios devido à resposta imunológica do hospedeiro, o que pode resultar em consequências sistêmicas (Loeshe, 1997; Persson, Persson, 2008).

O endotélio vascular é uma monocamada de células que recobre internamente os vasos sanguíneos, que participam do controle do tônus vascular por meio da síntese de diversos fatores, tanto dilatadores como contráteis. Frente a alterações na funcionalidade do endotélio vascular, o organismo tenta manter a homeostase através de vias fisiológicas compensatórias (Triggle et al., 2012).

Nesse sentido, nossos resultados referentes ao diâmetro luminar dos segmentos de artérias mesentéricas, isoladas de ratos, não mostraram diferenças significativas entre os grupos. Da mesma forma, a resposta de vasorelaxamento da artéria mesentérica a concentrações crescentes de um vasorelaxante dependente do endotélio (a acetilcolina - ACh) não foi significativamente diferente entre os

grupos de animais Sham e Ligadura. Porém, quando verificamos o vasorelaxamento independente do endotélio dos segmentos em reposta ao nitroprussiato de sódio (SNP), composto amplamente utilizado como doador de NO, nós observamos diferença significativa entre os valores de $pD_2$, indicando que as artérias mesentéricas de ratos com ligadura tem menor sensibilidade ao NO do que os correspondentes tecidos do grupo Sham. Assim, tais dados sustentam a hipótese de que a presença de ligadura induz alterações na resposta da musculatura lisa destas artérias ao relaxamento promovido pelo NO.

Com base nestes resultados, decidimos estudar a via NO-sGC-GMPc com o propósito de investigar estas possíveis alterações. Assim, na decorrência de inibição da sGC pelo ODQ, foi observado no grupo Sham, mas não no grupo Ligadura, uma forte tendência de diminuição da resposta relaxante máxima ($E_{max}$) à ACh. Juntando este resultado com o resultado da curva ao SNP, sugerimos que a via NO-sGC-GMPc pode estar sendo prejudicada em animais com ligadura e que vias alternativas devem ser relevantes no vasorelaxamento dependentes do endotélio, como mecanismos de compensação. Em contrapartida, sob condições de inibição da sGC, o relaxamento ao SNP (ainda em altas concentrações) foi grandemente inibido em ambos os grupos experimentais e de forma semelhante.

A síntese de NO derivado do endotélio ocorre após a ligação da ACh aos receptores muscarínicos M3 acoplados a proteína Gq, o que resultará na formação dos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). Este último é capaz de ativar receptores de IP3 na membrana do retículo endoplasmático, estimulando a liberação de cálcio desta organela, o qual estimula a atividade da eNOS, (Pollock et al., 1991; Vanhoutte et al., 1989). Em geral, as NOS utilizam o aminoácido L-arginina e oxigênio molecular para a síntese do NO (e gerando L-citrulina como subproduto) (Leoni et al., 1991; Palmer et al., 1988). Dentre outras ações, o NO irá ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), presente na musculatura lisa vascular e que possui em sua estrutura um grupo heme. A enzima quando ativada pelo NO (após a ligação deste ao $Fe^{2+}$ do grupo heme) passa ter a função de catalisar a formação do segundo mensageiro GMPc, resultando na diminuição da concentração de cálcio ($Ca^{2+}$) intracelular devido à diminuição do influxo de $Ca^{2+}$, a captação do $Ca^{2+}$pelo retículo sarcoplasmático, ou aumento da extrusão de $Ca^{2+}$através da membrana celular. Assim, não ocorrendo à formação do complexo $Ca^{2+}$-CAM (calmodulina), sendo insuficiente para a ativação da cadeia

leve de miosina fosforilada, a baixa atividade da ATPase torna a contração inibida ocorrendo o relaxamento vascular (Derbyshire, Marletta, 2012, Sutherland, Walsh, 2012; Vanhoutte et al., 1989; Wood, Ignarro; 1987).

Contudo, a ação vasodilatadora do NO não é apenas mediada pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel. Estudo realizado por Bolotina et al. (1994) em aorta de coelho, demonstrou, mediante técnicas de “patch-clamp” e farmacologicamente, que o NO é capaz de ativar diretamente canais de $K^+$ dependentes de cálcio ($K^+_{ca}$), ao terem observado que uma considerável fração do efeito vasorelaxante do NO ainda persistia sob condições de inibição da guanilato ciclase por azul de metileno, sendo apenas abolido pela adição de charibdotoxina (um inibidor específico de $K^+_{Ca}$) (Bolotina et al., 1994).

Assim, os nossos resultados podem confirmar a importância da hiperpolarização mediada pelos $K^+_{Ca}$ das células da musculatura lisa vascular e o consequente vasorelaxamento, conforme evidenciado pelas curvas de relaxamento à ACh na presença de ODQ no grupo Ligadura, apesar de não termos observado este comportamento nas curvas de relaxamento com SNP, indicando, além de uma possível alteração na via NO-sGC-GMPc, diferenças entre o NO exógeno e o NO/EDRF produzido em resposta à ACh.

Desta maneira, decidimos realizar curvas de relaxamento concentração-resposta à ACh sem interferência do NO, com o uso do inibidor não seletivo das isoformas de NOS (LNAME). Foi observado que o grupo Ligadura não apresentou diferenças significativas no relaxamento vascular, quando comparado ao grupo Sham. Em acréscimo, não houve diferenças estatísticas entre os grupos de animais a expressão de RNAm para eNOS e nNOS. Logo, foi demonstrado que o vasorelaxamento não foi abolido com o inibidor L-NAME, evidenciando, como observado anteriormente, que a artéria mesentérica possui outros mecanismos que atuam no vasorelaxamento. De fato, estudo realizado por Dowell et al. (1996) corrobora nossos dados por mostrarem que em ratos tratados com L-NAME (crônica ou agudamente) a resposta relaxante dependente de endotélio de vasos de resistência não é abolida, diferentemente do observado em vasos de condutância; assim, podemos concluir que o NO não é o principal fator derivado do endotélio responsável pela vasodilatação da artéria mesentérica (Dowell et al., 1996).

Durante eventos inflamatórios, pode ocorrer aumento da expressão da isoforma induzível da NOS (iNOS), a qual produz grandes quantidades de NO

durante longos períodos, como ferramenta de proteção do hospedeiro contra organismos invasores, atuando na eliminação do patógeno (Marin, Rodriguez-Matinez, 1997). Entretanto, altas concentrações de NO, em decorrência de processos inflamatórios, podem induzir alterações hemodinâmicas sistêmicas mediadas pela interação direta do NO com diversas biomoléculas (tais como, proteínas, lipídios e DNA) (Ji, Choi, 2013). Neste sentido, o nosso grupo demonstrou que o aumento na produção de NO que ocorre no modelo de periodontite, induzida por ligadura em ratos, promove efeitos sistêmicos, como por exemplo, o aumento da nitração de resíduos protéicos de tirosina em tecido cardíaco (Herrera et al., 2011).

No presente trabalho, a quantificação de RNAm para a enzima iNOS, em amostras de artéria mesentérica, mostrou aumento significativo da transcrição deste gene no grupo Ligadura em relação ou grupo Sham, o qual pode estar relacionado com aumento da produção de NO no grupo Ligadura, o que pode indicar que a ligadura pode estar desencadeando efeitos da inflamação na artéria mesentérica, além disso, o NO é capaz de ativar canais $K^{+}_{Ca}$ como comentado anteriormente.

Neste sentido, é descrito na literatura que em tecidos vasculares (como a aorta), o NO é capaz de aumentar a atividade da enzima cistationina gama-liase (CSE), principal enzima produtora de sulfeto de hidrogênio ($H_2S$), um mediador reconhecido atualmente, ao lado do NO, como um importante vasodilatador (Zhao et al., 2001). Considerando o possível aumento de produção de NO derivado de iNOS nas artérias mesentéricas do grupo de ratos com ligadura, pode ocorrer um aumento da síntese de $H_2S$, devido à maior atividade de CSE, e assim explicar a tendência de maior relaxamento á ACh com o inibidor de ODQ na reposta máxima das artérias mesentéricas do grupo Ligadura.

Com base nestas evidências e para melhor entendimento do mecanismo, é aceitável que NO proveniente da iNOS possa estar compensando a disfunção que ocorre no músculo liso vascular do grupo Ligadura, por meio de mecanismo relacionado à hiperpolarização para manter o equilíbrio sistêmico (Triggle et al., 2012). Apesar de não observarmos diferenças entre ambos os grupos com o inibidor L-NAME, o aumento da expressão gênica da iNOS, nas artérias mesentéricas do grupo Ligadura, chamou a atenção e resolvemos investigar, na reatividade vascular, usando inibidor seletivo da iNOS (1400W) em curva de relaxamento ao SNP e observamos diferença significativa entre os valores de $pD_2$, sugerindo que as artérias mesentéricas no grupo Ligadura tem menor sensibilidade ao NO quando

comparadas ao grupo Sham. Sabendo que a ACh é responsável pela ativação da isoforma eNOs nos vasos (estimulados por $Ca^{2+}$, dependentes de camodulina) e não pela isoforma iNOS (ativada através de produtos bacterianos e citocinas) (Marin, Rodriguez-Matinez, 1997; Parrilo, 1993; Pollock et al.,1991). Desta forma, em curva de relaxamento à ACh com inibidor de 1400W, não foi observada diferenças entre grupos Sham e Ligadura. Concluímos que NO pode estar ativando vias alternativas, como comentado anteriormente, mas não é responsável pela alteração observada na musculatura lisa vascular, entretanto, esta disfunção pode estar relacionada com a enzima sGC.

A importância do papel da via sGC na vasodilatação e regulação da pressão sanguínea está bem evidenciada (Kagota et al., 2001; Sips, Buys, 2013; Thoonen et al., 2013). Estudo realizado por Kagota et al. (2001) mostraram que em aorta de ratos SHR, com ingestão de sal, houve diminuição da resposta relaxante dependente (ACh) e independente (SNP) de endotélio, assim reduzindo a produção de GMPc e alterando no relaxamento vascular em resposta ao NO, mas o efeito foi revertido com o ativador de GMPc (A23187). Contudo, foi observada a expressão protéica com o aumento de eNOS e diminuição da sGC, indicando que ocorre diminuição da função sGC sem prejudicar a produção de NO proveniente da eNOS (Kagota et al., 2001).

Estudos mostram que a atividade da sGC pode ser regulada por diversos fatores, dentre eles os oxidantes. Já é conhecido que as espécies reativas podem agir diretamente na diminuição da biodisponibilidade do NO prejudicando na produção de GMPc, além do que, um ambiente redox faz com que a enzima sGC tenha menor afinidade ao NO devido à oxidação direta com o grupo heme $Fe^{+2}$, que passa a ser $Fe^{+3}$ (estado férrico), o que leva a inativação da sGC. Outra maneira da enzima sGC tornar insensível ao NO é através dos resíduos de cisteína que pode levar a formação S-nitrosilação na sGC (Brandwein et al., 1981; Braughler, 1983; Kojda, Harrison, 1999; Schrammel et al., 1996; Zhao et al., 2000). Ainda, pode acontecer a oxidação de tióis na sGC resultando na formação de nitrosotiol, que já foi sugerida como responsável pela inibição da enzima Cys-78 e Cys-122 na subunidade β1, consequentemente, não ocorrendo à ativação completa da sGC ao NO, devido à alteração conformacional da enzima (Fernhoff et al., 2012; Stone, Marletta, 1996; Zhao et al., 2000).

Com o intuito de conhecer um pouco mais sobre a via da NO-sGC-GMPc, resolvemos investigar a enzima fosfodiesterase (PDE) tipo-V. Esta enzima tem como função catalisar a hidrólise de GMPc para 5'-GMP e assim, diminuindo os níveis citoplasmáticos de GMPc, consequentemente, inativando um dos principais mediadores responsáveis pelo vasorelaxamento (Appleman, Terasaki, 1975; Harris et al., 1989; Lugnier et al., 1986). O Sildenafil, inibidor da enzima PDE-V, é uma boa ferramenta para modelos *in vitro*, em estudo de cultura de células RFL-6 (fibroblastos de pulmão de feto de rato) foi observado diminuição dos níveis de GMPc, na passagem 14, na presença de SNP e sildenafil quando comparado a outras passagens, com redução de 98% na expressão gênica da subunidade α-1 da sGC, na passagem 9. Isso demonstra à baixa regulação de umas das subunidades da sGC ocorrendo alteração da via NO-sGC-GMPc (Kraft et al., 2004).

Desta maneira, estudamos a inibição da enzima PDE-V por concentrações crescentes de sildenafil, em artérias mesentéricas de ratos, constatamos diferença significativa entre os grupos, na qual o grupo Ligadura teve menor sensibilidade ao NO endógeno do que o grupo Sham. Foi evidenciado que o uso do sildenafil resultou no aumento dos níveis de GMPc devido da ativação da via NO-sGC-GMPc, que esta diferença observada no grupo ligadura está relacionada com a possível diminuição na função da sGC. Entretanto, em nosso trabalho é necessário experimentos mais específicos, utilizando ativadores que se ligam ao grupo heme prostético da sGC, como por exemplo, BAY 58-2667 (cinaciguat), para melhor elucidar o papel desta enzima na DP (Friebe, Koesling, 2003).

Outro fator de relaxamento derivado do endotélio é a prostaciclina (PGI2), mediador lipídico de atividade antitrombótica, e sintetizada pela enzima ciclooxigenase (COX) a partir do ácido araquidônico (tendo como produto intermediário a prostaglandina $H_2$ - $PGH_2$), a qual também dará origem a uma variedade de outros prostanóides, dentre eles a $PGE_2$, o tromboxano A2, etc. Duas isoformas de COX têm sido caracterizadas (COX-1 e COX-2), as quais estão divididas de acordo com suas funções e localizações. Assim, em situações inflamatórias, a COX-2 atua com a produção de prostanóides, além do seu conhecido papel importante no sistema vascular pela produção da $PGI_2$ pelas células endoteliais (Ricciotti, FitzGerald, 2011). Estudo realizado por Muscará et al. (2000) mostrou que os inibidores de COX-2 podem acarretar em disfunções vascular e renal, em ratos normais e hipertensos tratados com celecoxibe por três semanas,

foi observado aumento da pressão sanguínea, da aderência leucocitária no endotélio e da agregação plaquetária. Ainda, os metabólitos da prostaciclina, que se mostraram aumentados em ratos hipertensos, foi diminuída após o tratamento com celecoxibe, demonstrando o importante papel da prostaciclina na homeostase vascular, apesar de que este inibidor pode ser eficiente como antinflamatórios (Muscará et al., 2000).

Estudos demonstram que na periodontite a COX-2 atua na regulação da inflamação e na perda óssea, considerando que ratos com ligadura tratados com inibidores seletivos de COX-2 mostraram menor perda óssea quando comparados aos animais não tratados (Holzhausen et al., 2005). Em nossos experimentos, a presença do inibidor específico de COX-2, NS398, no banho, não mostrou efeitos diferenciais entre os grupos experimentais quanto ao relaxamento das artérias mesentéricas induzido pela ACh. Adicionalmente, a expressão de RNAm para isoenzima COX-2, na artéria mesentérica, não foi estatisticamente diferente entre os grupos de animais Sham ou Ligadura.

Estudo realizado por Kirkby et al. (2012) mostrou que, ao contrário do conceito amplamente aceito no sistema vascular, a prostaciclina é produzida pela isoforma COX-1 e não pela COX-2, conforme estudos anteriores baseados em medidas da excreção urinária do metabólito da prostaciclina, o 2,3-dinor-6keto-PGF1alfa após tratamento com inibidores seletivos de COX-2 (Catella-Lawson et al., 1999; McAdam et al., 1999). No nosso estudo, avaliamos o relaxamento das artérias mesentéricas à ACh na presença do inibidor específico de COX-1, o SC560, e observamos que a curva do grupo Sham teve deslocamento para a esquerda quando comparada com a do grupo Ligadura. Estes resultados evidenciam que nos animais com ligadura há menor participação de fatores contráteis derivados de COX-1 (tais como PGG2/PGH2, TxA2) produzidos pela artéria mesentérica de animais controle. Considerando a tendência ao aumento da expressão gênica vascular desta isoenzima em animais com ligadura, o que pode estar relacionada com mecanismos de compensação devido à diminuição da atividade da COX-1. Importante considerar que a COX-1 é constitutiva em muitos tecidos e que os prostanóides produzidos são responsáveis por diversas funções fisiológicas, como por exemplo, citoproteção do epitélio gástrico ou nos vasos, como regulador da adesão e agregação plaquetária (Ricciotti et al., 2011).

Interessantemente, e apesar de possível diferença quanto a fatores contráteis entre ambos os grupos experimentais, nós não detectamos diferenças significativas entre a tensão vascular ativa em reposta contrátil ao KCl e as curvas concentração-resposta de contração à fenilefrina. Entretanto, resultados prévios do nosso laboratório mostram que a presença de periodontite em ratos com ligadura, durante sete dias, resulta no aumento da resposta máxima contrátil de anéis de aorta à norapinefrina *in vitro*, quando comparados aos ratos controle, evidenciando diferenças mecanísticas entre ambos os leitos vasculares.

Curiosamente, quando estudamos o relaxamento das artérias mesentéricas à ACh na presença do inibidor não seletivo de COX, a indometacina, observamos que não houve diferenças entre as curvas dos grupos estudados. Ainda que evidenciamos diferença com o inibidor específico da COX-1, no momento, não temos qualquer hipótese que sustente estas observações.

No entanto, podemos observar que na decorrência da inibição simultânea dos dois fatores de relaxamento dependentes do endotélio, principalmente a $PGI_2$ derivada da(s) ciclooxigenase(s) pela indometacina e o NO pelo L-NAME, não foi mostrado diferenças estatisticamente significativas no pD2 e na resposta máxima (Emax). Novamente, foi observado que o relaxamento não foi completamente abolido mesmo com inibidores de mecanismos diferentes, o que sustenta a hipótese de que há um terceiro mecanismo de relaxamento dependente do endotélio importante que está relacionado à hiperpolarização, tal como o $H_2S$.

Neste sentido, o $H_2S$ é uma importante molécula que atua na inflamação e no sistema cardiovascular ativando o mecanismo da hiperpolarização (Witheman, et al., 2006; Zhao et al., 2001). Witheman e colaboradores observaram que em linha celular derivada de macrófagos murinos em cultura (RAW264.7) o tratamento com SNP produziu aumento de GMPc, mas não quando NaHS foi adicionado concomitantemente. Entretanto, a adição de $Cu^{2+}$ reverteu esta inibição pela formação de CuS e a consequente liberação do NO. Conclui-se que o nitrosotiol formado por reação entre o H2S e o NO tem características diferentes de outros nitrosotiois de baixo peso molecular, tais como s-nitrosocisteina (George, Shibata, 1995; Witheman et al., 2006), S-nitrosoglutationa (Angulo et al., 2000; Witheman, et al., 2006), em vista de que estes compostos efetivamente estimulam a guanilato ciclase solúvel via liberação de NO e resultando em aumento de GMPc. Estas observações sugerem que o nitrosotiol resultante da reação entre o NO e o H2S não

seja capaz de doar NO por trans-nitrosação/nitrosilação, de forma que se observa a inibição dos efeitos farmacológicos do NO e/ou do $H_2S$ (Witheman et al., 2006).

Com intuito de especular se a via da hiperpolarização participa das alterações observadas no decorrer do trabalho, foram realizadas curvas de relaxamento de concentração-resposta ao $Na_2S$ e utilizando inibidores, tais como LNAME, SC560, ODQ. Foi realizado também curvas de relaxamento de concentração-resposta ao NaHS, a qual as artérias mesentéricas foram incubadas com ODQ. Porém, não observamos diferenças significativas entre os grupos com relação a todas as curvas realizadas, com estes doadores de $H_2S$.

Os doadores de $H_2S$, NaHS e $Na_2S$, são bem solúveis em solução tampão, ocorrendo à dissociação destes sais e resultando em íons $Na^+$, $HS^-$ ou $S^{2-}$. Desta forma, acontecerá a introdução do sulfeto na solução.

$$Na_2S \longrightarrow S^{2-} + Na^+$$

Quando ocorre a dissolução do sal, o pH do meio pode mudar devido ao equilíbrio de protonação, e assim, haverá perda de $H_2S$ para manter o pH. Conforme ilustrado abaixo, a equação do equilíbrio de protonação (Nagy et al., 2014).

$$S^{2-} + H^+ \rightleftharpoons HS^-$$
$$HS^- + H^+ \rightleftharpoons H_2S$$
$$H_2S\ (aquoso) \rightleftharpoons H_2S\ (gasoso)$$

Adicionalmente, o $CO_2$ borbulhado na solução tampão na câmara tem como objetivo ajudar a manter o pH do meio, porém este gás liberado aumenta a força de arraste do $H_2S$ para o meio exterior, que aumenta o processo de $H_2S$ aquoso para o estado $H_2S$ gasoso. Este efeito é um dos principais motivos da perda de $H_2S$ na solução da câmara do miógrafo.

$$H_2S\ (aquoso) \xrightarrow{O_2/CO_2} H_2S\ (gasoso)$$

No entanto, no nosso estudo avaliamos a perda de $H_2S$ no miógrafo com a medição do pH com o pHmetro, devidamente calibrado, e testamos três doadores de

$H_2S$, o $Na_2S$, o NaHS e GYY 4137 (um composto orgânico doador “lento” de $H_2S$). Observamos que com uma única dose da droga tanto na concentração 30 µM como na concentração 300 µM e também quando avaliamos as estas três drogas realizando curvas de concentração-resposta, os doadores de H2S, o $Na_2S$ e o NaHS, mostraram aumento do pH na solução tampão, continuamente borbulhados com 95% de $O_2$ e 5% de $CO_2$, já o Gyy 4137 demonstrou ser mais estável, com mínima elevação no pH. A solução tampão e principalmente, a composição do gás borbulhado, são importantes na manutenção do pH da câmara, fazendo com que o equilíbrio de protonação e o arraste do $H_2S$ resulte no aumento do pH do meio, a qual quanto maior pH maior é a perda de $H_2S$. Estes resultados sugerem que alguns doadores de H2S não garantem a concentração final desejada em curvas de concentração-resposta, sendo necessário o uso de doadores mais estáveis, no caso GYY 4137.

De encontro com nossos dados, estudo realizado por DeLeon et al. (2012) observaram considerável perda de $H_2S$ em três experimentos tradicionais, importantes na pesquisa biológica. Em particular, através de eletrodos polarográficos em tempo real, foi confirmada a perda de $H_2S$, por doadores de $H_2S$ (NaHS), em menos de 4 minutos no experimento realizado no miógrafo, atribuindo, em parte, a incompleta conversão de NaHS para $H_2S$. A solução tampão juntamente com o gás que é borbulhado para a manutenção do pH, como também ajuda dispersar a droga na câmara, reduziu as concentrações de H2S no banho, na qual quando o gás utilizado é 100% oxigênio a meia vida foi um pouco mais longa quando utilizaram 100% nitrogênio, e esta perda do $H_2S$ foi diminuída quando retiraram os gases que promoviam o borbulhamento e agitaram à mão com cilindro (DeLeon et al.,2012). Estes resultados indicam que em curvas cumulativas de $H_2S$ a concentração final está aquém do esperado, contestando a validação deste método em nosso estudo e experimentos futuros, com doadores de $H_2S$ mais estáveis, deverão ser realizados para tentar compreender a via da hiperpolarização.

O GYY 4137 é um doador “lento” de $H_2S$ que tem como base a estrutura do componente de Lawesson, já com outros doadores de $H_2S$ há dificuldade de alcançar o efeito biológico, muitas vezes devido à liberação instantânea de $H_2S$. Está estabelecido na literatura o efeito de GYY 4137 em diversos modelos (*in vitro* e *in* vivo) no sistema cardiovascular (Li et al., 2008; Xu et al., 2014). Neste sentido, Li et al. (2008) demonstraram que em aorta de ratos ocorre relaxamento vascular e em

rim perfundido ocorre à vasodilatação em resposta ao GYY 4137, resultando em um relaxamento lento e continuo devido a baixas concentrações de $H_2S$, diferentemente demonstrado com o composto NaHS. Foi observado também que houve queda da pressão sanguínea com baixa toxicidade celular em ratos SHR tratados crônicamente com GYY 4137 (Li et al., 2008). Sugerimos que as drogas ($Na_2S$ e NaHS) utilizadas como doadores de $H_2S$ neste trabalho não são boas ferramentas para investigar as alterações nos canais $K_{ATP}$, devido a impossibilidade de conhecer exatamente a concentração de $S^{2-}/HS^{-}/H_2S$ em uma adição cumulativa na câmara do miógrafo. Neste caso, é importante fazer uso de compostos que efetuem liberação lenta.

# 6 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados da presente tese é possível concluir que a presença de ligadura, durante sete dias, em ratos contribuiu na diminuição da sensibilidade da artéria mesentérica ao relaxamento causado por NO exógeno, sugerindo que possam ocorrer alterações funcionais da musculatura lisa, relacionadas à via NO-sGC-GMPc. Adicionalmente, a presença de ligadura em ratos resulta em aumento significativo da transcrição do gene iNOS na artéria mesentérica.

Ainda, fatores contráteis derivados de COX-1 tem menor participação no vasorelaxamento dependente de endotélio na artéria mesentérica de ratos com ligadura em comparação ao grupo Sham. A presença de ligadura parece promover também a produção de mediadores da resposta vasorelaxante da ACh independentes de NOS e COX, e possivelmente relacionados a mecanismos de hiperpolarização, particularmente canais de $K^+$ dependentes de $Ca^{2+}$ ou ATP. Assim, estudos com doadores de $H_2S$, especialmente compostos de liberação lenta, deverão ser realizados a fim de responder estas questões que permanecem em aberto.

# REFERÊNCIAS*

Aimetti M, Romano F, Nessi F. Microbiologic analysis of periodontal pockets and carotid atheromatous plaques in advanced chronic periodontitis patients. J Periodontol. 2007; 78(9): 1718-23.

Albraith G, Agan HC, Teed SRB, Anders S, Aved JT. Cytokine production by oral and peripheral blood neutrophils in adult periodontits. J Periodontol 1997; 68: 832–838.

Amar S, Gokce N, Morgan S, Loukideli M, Van Dyke TE, Vita JA. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23(7): 1245-9.

Angulo J, Cuevas P, Moncada I, Martín-Morales A, Allona A, Fernández A, Gabancho S, Ney P, Sáenz de Tejada I. Rationale for the combination of PGE(1) and S-nitroso-glutathione to induce relaxation of human penile smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther. 2000; 295(2): 586-93.

Ansai T, Yamamoto E, Awano S, Yu W, Turner AJ, Takehara T. Effects of periodontopathic bacteria on the expression of endothelin-1 in gingival epithelial cells in adult periodontitis. Clin Sci. 2002; 103 Suppl 48: 327S-331S.

Appleman MM, Terasaki WL. Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Adv Cyclic Nucleotide Res. 1975; 5: 153-62.

Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. J Periodontol. 1996; 67(10 Suppl): 1123-37.

Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. J Periodontol. 2000; 71(6): 1009-14.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. Nature. 1994; 28;368(6474): 850-3.

Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. Anat Rec. 1996; 245(2): 267-92.

Branch-Mays GL, Dawson DR, Gunsolley JC, Reynolds MA, Ebersole JL, Novak KF,Mattison JA, Ingram DK, Novak MJ. The effects of a calorie-reduced diet on periodontal inflammation and disease in a non-human primate model. J Periodontol.2008; 79(7): 1184-91.

Brandwein HJ, Lewicki JA, Murad F. Reversible inactivation of guanylate cyclase by mixed disulfide formation. J Biol Chem. 1981; 256(6): 2958-62.

---

* De acordo com:

International Comittee of Medical Journal Editors. Uniform requiremente for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. [Cited 2012 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

Braughler JM. Soluble guanylate cyclase activation by nitric oxide and its reversal. Involvement of sulfhydryl group oxidation and reduction. Biochem Pharmacol. 1983; 32(5): 811-8.

Brito LC, DalBó S, Striechen TM, Farias JM, Olchanheski LR Jr, Mendes RT, Vellosa JC, Fávero GM, Sordi R, Assreuy J, Santos FA, Fernandes D. Experimental periodontitis promotes transient vascular inflammation and endothelial dysfunction. Arch Oral Biol. 2013; 58(9): 1187-98.

Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, FitzGerald GA. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. J Pharmacol Exp Ther. 1999; 289(2): 735-41.

Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. Br J Pharmacol. 1988; 95(4): 1165-74.

Clarkson JE, Ramsay CR, Averley P, Bonetti D, Boyers D, Campbell L, Chadwick GR, Duncan A, Elders A, Gouick J, Hall AF, Heasman L, Heasman PA, Hodge PJ, Jones C, Laird M, Lamont TJ, Lovelock LA, Madden I, McCombes W, McCracken GI, McDonald AM, McPherson G, Macpherson LE, Mitchell FE, Norrie JD, Pitts NB, van der Pol M, Ricketts DNj, Ross MK, Steele JG, Swan M, Tickle M, Watt PD, Worthington HV, Young L. IQuaD dental trial; improving the quality of dentistry: a multicentre randomised controlled trial comparing oral hygiene advice and periodontal instrumentation for the prevention and management of periodontal disease in dentate adults attending dental primary care. BMC Oral Health. 2013 ; 26; 13:58.

Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. J Periodontol. 2008; 79(8 Suppl): 1569-76.

Crawford, J.M.; Taubman, M.A.; SMITH, D.J.; The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontal microorganisms. J Periodont Res. 1978; 13: 316-325.

D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. J Dent Res. 2010; 89(11): 1241-6.

Dashper S, O'Brien-Simpson N, Liu SW, Paolini R, Mitchell H, Walsh K, D'Cruze T, Hoffmann B, Catmull D, Zhu Y, Reynolds E. Oxantel disrupts polymicrobial biofilm development of periodontal pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(1): 378-85.

De Leon ER, Stoy GF, Olson KR. Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. Anal Biochem. 2012 ; 421(1): 203-7.

Derbyshire ER, Marletta MA. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase. Annu Rev Biochem. 2012; 81: 533-59.

Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Sacco RL, Papapanou PN. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral

Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). Circulation. 2005; 111(5): 576-82.

Doğan B, Buduneli E, Emingil G, Atilla G, Akilli A, Antinheimo J, Lakio L, Asikainen S. Characteristics of periodontal microflora in acute myocardial infarction. J Periodontol. 2005; 76(5): 740-8.

Dowell FJ, Henrion D, Duriez M, Michel JB. Vascular reactivity in mesenteric resistance arteries following chronic nitric oxide synthase inhibition in Wistar rats. Br J Pharmacol. 1996; 117(2):341-6.

Duffy SJ, Tran BT, New G, Tudball RN, Esler MD, Harper RW, Meredith IT. Continuous release of vasodilator prostanoids contributes to regulation of resting forearm blood flow in humans. Am J Physiol. 1998; 274(4 Pt2): H1174-83.

Ekuni D, Tomofuji T, Endo Y, Kasuyama K, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Mizutani S, Kojima A, Morita M. Hydrogen-rich water prevents lipid deposition in the descending aorta in a rat periodontitis model. Arch Oral Biol. 2012; 57(12): 1615-22.

Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. Lancet. 2010; 375(9709): 132-40.

Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. Circulation. 1995 Aug 1;92(3):657-71.

Félétou M. The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators San Rafael (CA): Morgan Claypool Life Sciences; 2011.

Félétou M. The Endothelium: Part 2: EDHF-Mediated Responses “The Classical Pathway”. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences Publisher; 2011.

Fernhoff NB, Derbyshire ER, Underbakke ES, Marletta MA. Heme-assisted S-nitrosation desensitizes ferric soluble guanylate cyclase to nitric oxide. J Biol Chem. 2012; 287(51): 43053-62.

Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. J Periodontol. 2005; 76(5): 731-6.

Flemmig TF. Periodontitis. Ann Periodontol. 1999; 4(1): 32-8.

Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase.Circ Res. 2003; 93(2): 96-105.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J. 1989; 3(9): 2007-18.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980; 288(5789): 373-6.

George MJ, Shibata EF. Regulation of calcium-activated potassium channels by S-nitrosothiol compounds and cyclic guanosine monophosphate in rabbit coronary artery myocytes. J Investig Med. 1995; 43(5): 451-8.

Gillette WB, Van House RL. Ill effects of improper oral hygeine procedure. J Am Dent Assoc. 1980; 101(3): 476-80.

Giuca MR, Pasini M, Tecco S, Giuca G, Marzo G. Levels of salivary immunoglobulins and periodontal evaluation in smoking patients. BMC Immunol. 2014; 15(1): 5.

Graupera M, García-Pagán JC, Parés M, Abraldes JG, Roselló J, Bosch J, Rodés J. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. J Hepatol. 2003; 39(4): 515-21.

Grundy SM. Inflammation, hypertension, and the metabolic syndrome. JAMA. 2003; 290(22): 3000-2.

Haffajee AD, Socransky SS, Lindhe J, Kent RL, Okamoto H, Yoneyama T. Clinical risk indicators for periodontal attachment loss. J Clin Periodontol. 1991; 18(2): 117-25.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents destructive periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994; 5: 78-111.

Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. J Periodontol. 2000; 71(10): 1554-60.

Harris AL, Lemp BM, Bentley RG, Perrone MH, Hamel LT, Silver PJ. Phosphodiesterase isozyme inhibition and the potentiation by zaprinast of endothelium-derived relaxing factor and guanylate cyclase stimulating agents in vascular smooth muscle. J Pharmacol Exp Ther. 1989; 249(2): 394-400.

Haynes WG, Stanford C. Periodontal disease and atherosclerosis: from dental to arterial plaque. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003; 23(8): 1309-11.

Herrera BS, Martins-Porto R, Campi P, Holzhausen M, Teixeira SA, Mendes GD, Costa SK, Gyurko R, Van Dyke TE, Spolidório LC, Muscará MN. Local and cardiorenal effects of periodontitis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. Arch Oral Biol. 2011; 56(1): 41-7. (a).

Herrera BS, Martins-Porto R, Maia-Dantas A, Campi P, Spolidorio LC, Costa SK, Van Dyke TE, Gyurko R, Muscara MN. iNOS-derived nitric oxide stimulates osteoclast activity and alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. J Periodontol. 2011; 82(11): 1608-15. (b).

Higashi Y, Goto C, Hidaka T, Soga J, Nakamura S, Fujii Y, Hata T, Idei N, Fujimura N, Chayama K, Kihara Y, Taguchi A. Oral infection-inflammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. Atherosclerosis. 2009; 206(2): 604-10.

Holzhausen M, Spolidorio DM, Muscará MN, Hebling J, Spolidorio LC. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. J Periodontal Res. 2005; 40(3): 208-11.

Huang AH, Busse R, Bassenge E. Endothelium-dependent hyperpolarization of smooth muscle cells in rabbit femoral arteries is not mediated by EDRF (nitric oxide). Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1988; 338(4): 438-42.

Hunter W. Oral Sepsis as a Cause of Disease. Br Med J. 1900; 2(2065): 215-6.

Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. J Pharmacol Exp Ther. 1986; 237(3): 893-900.

Iwata T, Yamato M, Ishikawa I, Ando T, Okano T. Tissue engineering in periodontal tissue. Anat Rec (Hoboken). 2014; 297(1): 16-25.

Ji S, Choi Y. Innate immune response to oral bacteria and the immune evasive characteristics of periodontal pathogens. J Periodontal Implant Sci. 2013; 43(1): 3-11.

Kagota S, Tamashiro A, Yamaguchi Y, Sugiura R, Kuno T, Nakamura K, Kunitomo M. Downregulation of vascular soluble guanylate cyclase induced by high salt intake in spontaneously hypertensive rats. Br J Pharmacol. 2001; 134(4): 737-44.

Kanaparthy A, Kanaparthy R, Niranjan N. Evaluation of serum C-reactive protein levels in subjects with aggressive and chronic periodontitis and comparison with healthy controls. Dent Res J (Isfahan). 2012; 9(3): 261-5.

Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. FEBS Lett. 1994; 350(1): 9-12.

Kirkby NS, Lundberg MH, Harrington LS, Leadbeater PD, Milne GL, Potter CM, Al-Yamani M, Adeyemi O, Warner TD, Mitchell JA. Cyclooxygenase-1, not cyclooxygenase-2, is responsible for physiological production of prostacyclin in the cardiovascular system. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109(43): 17597-602.

Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. Cardiovasc Res. 1999; 43(3): 562-71.

Kraft PJ, Haynes-Johnson D, Bhattacharjee S, Lundeen SG, Qiu Y. Altered activities of cyclic nucleotide phosphodiesterases and soluble guanylyl cyclase in cultured RFL-6 cells. Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(10): 2086-95.

Kwek HS, Wilson M, Newman HN. Mycoplasma in relation to gingivitis and periodontitis. J Clin Periodontol. 1990; 17(2): 119-22.

Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. J Biol Chem. 1991; 266(35): 23790-5.

Liang CF, Liu JT, Wang Y, Xu A, Vanhoutte PM. Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013; 33(4): 777-84.

Li L, Messas E, Batista EL Jr, Levine RA, Amar S. Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. Circulation. 2002 Feb 19;105(7):861-7. Erratum in: Circulation 2002; 105(13): 1617.

Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, Zhao Y, Baskar R, Tan CH, Moore PK. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. Circulation. 2008; 117(18): 2351-60.

Lima V, Bezerra MM, de Menezes Alencar VB, Vidal FD, da Rocha FA, de Castro Brito GA, de Albuquerque Ribeiro R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. Eur J Oral Sci. 2000; 108(2): 123-9.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4): 402-8.

Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, Taubert KA, Newburger JW, Gornik HL, Gewitz MH, Wilson WR, Smith SC Jr, Baddour LM; American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Peripheral Vascular Disease, and Council on Clinical Cardiology. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2012; 125(20): 2520-44.

Loesche WJ. Association of the oral flora with important medical diseases.Curr Opin Periodontol. 1997; 4: 21-8.

Lohinai Z, Benedek P, Fehér E, Györfi A, Rosivall L, Fazekas A, Salzman AL, Szabó C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. Br J Pharmacol. 1998; 123(3): 353-60. Erratum in: Br J Pharmacol 1998; 123(8): 741.

Loos BG. Systemic markers of inflammation in periodontitis. J Periodontol. 2005; 76(11 Suppl): 2106-15.

Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. J Periodontol. 2000; 71(10): 1528-34.

Lu Z, Xu X, Hu X, Lee S, Traverse JH, Zhu G, Fassett J, Tao Y, Zhang P, dos Remedios C, Pritzker M, Hall JL, Garry DJ, Chen Y. Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. Circulation. 2010; 121(13): 1474-83.

Lugnier C, Schoeffter P, Le Bec A, Strouthou E, Stoclet JC. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. Biochem Pharmacol. 1986; 35(10): 1743-51.

Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. Hypertension. 1986; 8(4): 344-8.

Mandell RL, Socransky SS. A selective medium for Actinobacillus actinomycetemcomitans and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. J Periodontol. 1981; 52(10): 593-8.

Marín J, Rodríguez-Martínez MA. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. Pharmacol Ther. 1997; 75(2): 111-34.

McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jan 5;96(1):272-7. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(10): 5890.

McKee AP, Van Riper DA, Davison CA, Singer HA. Gender-dependent modulation of alpha 1-adrenergic responses in rat mesenteric arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 284(5): H1737-43.

Mendes RT, Sordi R, Olchanheski LR Jr, Machado WM, Stanczyk CP, Assreuy J, Santos FA, Fernandes D. Periodontitis increases vascular cyclooxygenase-2: potential effect on vascular tone. J Periodontal Res. 2014; 49(1): 85-92.

Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994; 5: 66-77.

Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Circ Res. 1977; 41(1):19-26.

Muscará MN, Vergnolle N, Lovren F, Triggle CR, Elliott SN, Asfaha S, Wallace JL. Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. Br J Pharmacol. 2000; 129(7): 1423-30.

Nagy P, Pálinkás Z, Nagy A, Budai B, Tóth I, Vasas A. Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. Biochim Biophys Acta. 2014; 1840(2): 876-91.

Nassar CA, Nassar PO, Nassar PM, Spolidorio LC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents bone resorption. Braz Oral Res. 2005; 19(1): 36-40.

Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, Taniguchi K, Takeda M, Yoshioka H, Amano A, Ooshima T. Isolation and characterization of Streptococcus mutans in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. J Med Microbiol. 2006; 55(Pt 8): 1135-40.

Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. J Leukoc Biol. 1993; 54(2): 171-8.

Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. J Periodontol. 1993; 64(5 Suppl): 432-44.

Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000. 1997; 14:9-11.

Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature. 1988; 333(6174): 664-6.

Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. Immunology. 2004; 113(2): 153-62.

Paraskevas S, Huizinga JD, Loos BG. A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. J Clin Periodontol. 2008; 35(4): 277-90.

Parrillo JE. Pathogenetic mechanisms of septic shock. N Engl J Med. 1993; 328(20): 1471-7.

Pereira RB, Vasquez EC, Stefanon I, Meyrelles SS. Oral P. gingivalis infection alters the vascular reactivity in healthy and spontaneously atherosclerotic mice. Lipids Health Dis. 2011; 10: 80.

Persson GR, Persson RE. Cardiovascular disease and periodontitis: an update on the associations and risk. J Clin Periodontol. 2008; 35(8 Suppl): 362-79.

Petersen J, Glaßl EM, Nasseri P, Crismani A, Luger AK, Schoenherr E, Bertl K, Glodny B. The association of chronic apical periodontitis and endodontic therapy with atherosclerosis. Clin Oral Investig. 2013.

Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991; 88(23): 10480-4.

Pollreisz A, Hudson BI, Chang JS, Qu W, Cheng B, Papapanou PN, Schmidt AM, Lalla E. Receptor for advanced glycation endproducts mediates pro-atherogenic responses to periodontal infection in vascular endothelial cells. Atherosclerosis. 2010; 212(2): 451-6.

Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenney EB. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. J Periodontol. 2007; 78(4): 677-82.

Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. PLoS One. 2012; 7(11): e50593.

Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011; 31(5): 986-1000.

Roberts FA, McCaffery KA, Michalek SM. Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. J Dent Res. 1997; 76(12): 1833-9.

Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. J Periodontal Res. 1966; 1(3): 193-204.

Salminen A, Gursoy UK, Paju S, Hyvärinen K, Mäntylä P, Buhlin K, Könönen E, Nieminen MS, Sorsa T, Sinisalo J, Pussinen PJ. Salivary biomarkers of bacterial burden, inflammatory response, and tissue destruction in periodontitis. J Clin Periodontol. 2014.

Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. Mol Pharmacol. 1996; 50(1): 1-5.

Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontol 2000. 1997; 13: 91-120.

Sips PY, Buys ES. Genetic modification of hypertension by sGCα1. Trends Cardiovasc Med. 2013; 23(8): 312-8.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol. 1998; 25(2): 134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28: 12-55.

Staudte H, Kranz S, Völpel A, Schütze J, Sigusch BW. Comparison of nutrient intake between patients with periodontitis and healthy subjects. Quintessence Int. 2012; 43(10): 907-16.

Stone JR, Marletta MA. Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. Biochemistry. 1996; 35(4): 1093-9.

Sutherland C, Walsh MP. Myosin regulatory light chain diphosphorylation slows relaxation of arterial smooth muscle. J Biol Chem. 2012; 287(29): 24064-76.

Szerafin T, Erdei N, Fülöp T, Pasztor ET, Edes I, Koller A, Bagi Z. Increased cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin-mediated dilation in coronary arterioles of patients with diabetes mellitus. Circ Res. 2006; 99(5): e12-7.

Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. Dent Clin North Am. 2005; 49(3): 491-516

Thoonen R, Sips PY, Bloch KD, Buys ES. Pathophysiology of hypertension in the absence of nitric oxide/cyclic GMP signaling. Curr Hypertens Rep. 2013; 15(1): 47-58.

Thornton-Evans G, Eke P, Wei L, Palmer A, Moeti R, Hutchins S, Borrell LN;Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Periodontitis among adults aged ≥30 years - United States, 2009-2010. MMWR Surveill Summ. 2013; 62 Suppl 3: 129-35.

Toker H, Ozdemir H, Eren K, Ozer H, Sahin G. N-acetylcysteine, a thiol antioxidant, decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. J Periodontol 2009; 80: 672–678.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. Ann Periodontol. 1999; 4(1): 39-53.

Triggle CR, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. Can J Physiol Pharmacol. 2012; 90(6): 713-38.

Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture. Hypertension. 1989; 13(6 Pt 2): 658-67.

Virdis A, Colucci R, Fornai M, Blandizzi C, Duranti E, Pinto S, Bernardini N, Segnani C, Antonioli L, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. J Pharmacol Exp Ther. 2005; 312(3): 945-53.

Virdis A, Colucci R, Fornai M, Duranti E, Giannarelli C, Bernardini N, Segnani C, Ippolito C, Antonioli L, Blandizzi C, Taddei S, Salvetti A, Del Tacca M. Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin II-infused mice. Hypertension. 2007; 49(3): 679-86.

Virdis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Duranti E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Del Tacca M. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. Hypertension. 2009; 53(6): 1008-16.

Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, Bhatia M, Moore PK. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. Biochem Biophys Res Commun. 2006 28; 343(1): 303-10.

Wood KS, Ignarro LJ. Hepatic cyclic GMP formation is regulated by similar factors that modulate activation of purified hepatic soluble guanylate cyclase. J Biol Chem. 1987; 262(11): 5020-7.

Xavier FE, Aras-López R, Arroyo-Villa I, Campo LD, Salaices M, Rossoni LV, Ferrer M, Balfagón G. Aldosterone induces endothelial dysfunction in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats by increasing thromboxane A2 and prostacyclin. Br J Pharmacol. 2008; 154(6): 1225-35.

Xavier FE, Blanco-Rivero J, Avendaño MS, Sastre E, Yela R, Velázquez K, Salaíces M, Balfagón G. Aldosterone alters the participation of endothelial factors in noradrenaline vasoconstriction differently in resistance arteries from normotensive and hypertensive rats. Eur J Pharmacol. 2011; 654(3): 280-8.

Xavier FE, Blanco-Rivero J, Sastre E, Badimón L, Balfagón G. Simultaneous inhibition of TXA(2) and PGI(2) synthesis increases NO release in mesenteric resistance arteries from cirrhotic rats. Clin Sci (Lond). 2010; 119(7): 283-92.

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. J Clin Periodontol. 2000; 27(9): 648-57.

Xu S, Liu Z, Liu P. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. Int J Cardiol. 2014. pii:S0167-5273(14)00277-0.

Yamamoto E, Awano S, Koseki T, Ansai T, Takehara T. Expression of endothelin-1 in gingival epithelial cells. J Periodontal Res. 2003; 38(4): 417-21.

Zhao Y, Brandish PE, Di Valentin M, Schelvis JP, Babcock GT, Marletta MA. Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. Biochemistry. 2000; 39(35): 10848-54. Erratum in: Biochemistry. 2012; 51(47): 9593. DiValentin, M [corrected to Di Valentin, M].

Zhang J, Patel JM, Li YD, Block ER. Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1997; 96(1): 71-87.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. EMBO J. 2001; 20(21): 6008-16.