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

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.

1 INTRODUÇÃO

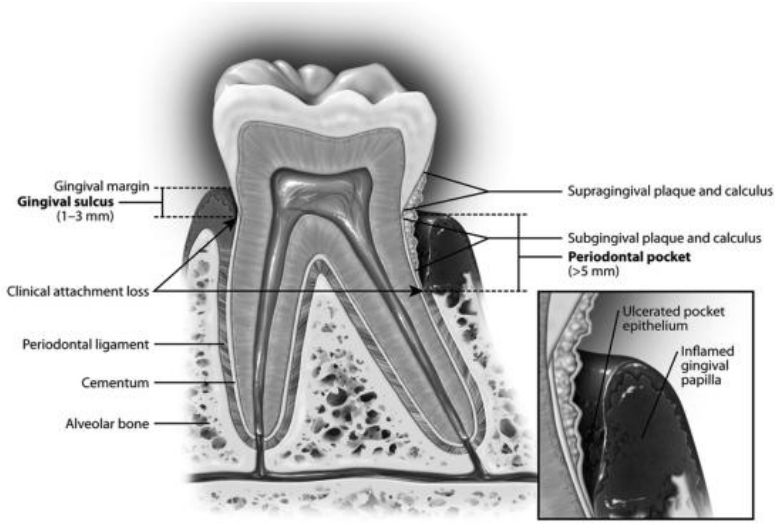
1.1 Periodonto e doença periodontal.

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.

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.

---

* 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

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

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.