FLAVIA NETO DE JESUS

**Mecanismos de vasorelaxamento envolvidos na resposta
vasomotora *in vitro* de anéis de artéria mesentérica provenientes
de ratos com periodontite induzida por ligadura.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Versão corrigida.

São Paulo
2019

RESUMO

de Jesus FN. Mecanismos de vasorelaxamento envolvidos na resposta vasomotora *in vitro* de anéis de artéria mesentérica provenientes de ratos com periodontite induzida por ligadura. [Tese (Doutorado em Farmacologia)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2019.

Uma das doenças mais prevalentes da cavidade oral é a doença periodontal. A periodontite é uma doença inflamatória e secundária à presença de bactérias. Os patógenos periodontais podem ser translocados através da corrente sanguínea e exibir efeitos periféricos. Estudo prévio do nosso laboratório mostra que o óxido nítrico (NO) é um dos principais reguladores de alguns dos efeitos da doença periodontal em órgãos remotos, como coração e rim, bem como disfunção endotelial e diminuição da contratilidade mediada por agonistas adrenérgicos na aorta. O objetivo do presente estudo foi investigar a resposta funcional da artéria mesentérica obtida de ratos com periodontite induzida por ligadura bilateral. Nós observamos que há presença de DNA bacteriano em amostras de gengivas e ligaduras quando comparado com o grupo controle, confirmando a natureza infecciosa do nosso modelo de periodontite induzida por ligadura. Foi observado também, que em segmentos de artéria mesentérica e no leito mesentérico houve diminuição das respostas vasorelaxantes ao nitroprussiato de sódio (SNP) e da resposta máxima relaxante ao estimulador da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), BAY 41-2272, quando comparados ao grupo sham. No entanto, não houve diferença entre os grupos em relação ao ativador da sGC, BAY 60-2770. Ainda, mesmo com o aumento na produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) em artéria mesentérica no grupo ligadura, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na resposta vasorelaxante secundária a hiperpolarização. Entretanto, no grupo ligadura as artérias mesentéricas incubadas com o inibidor das enzimas produtoras de H₂S, AOAA, foi observado aumento da resposta máxima relaxante ao SNP quando comparado às curvas sem o inibidor. Adicionalmente, foi observado aumento significativo da nitração de resíduos proteicos de tirosina, RNAm da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), atividade da enzima antioxidante catalase (CAT), com diminuição da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), RNAm da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e conteúdo de guanossina

3', 5'-monofosfato cíclico (cGMP) após estímulo com SNP na artéria mesentérica do grupo ligadura. A espectrometria de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) aplicada às artérias mesentéricas do grupo de ratos com periodontite evidenciou que o heme-Fe⁺² da enzima sGC está oxidado para heme-Fe⁺³. Com base nestes resultados, podemos concluir que durante a fase inicial da periodontite induzida por ligadura em ratos, alterações funcionais relacionadas à via NO-sGC-GMPc ocorrem na artéria mesentérica, o que pode ser secundário à diminuição da atividade da enzima sGC devido à oxidação do grupo heme-Fe⁺², o que pode ocorrer de forma secundária à produção excessiva de NO derivado de iNOS, ânion superóxido ou sua combinação. Além disso, a presença de periodontite em ratos contribui para a superprodução de H₂S, o que pode nos indicar a ocorrência de interação entre H₂S e NO.

Palavras chaves: Artéria mesentérica. Estresse oxidativo. Guanilato ciclase solúvel. Óxido nítrico. Periodontite. Sulfeto de Hidrogênio.

ABSTRACT

de Jesus FN. Mechanisms of vasorelaxation involved in the *in vitro* vasomotor response of mesenteric artery rings from rats with ligature -induced periodontitis. [thesis (Ph. D. thesis in Pharmacology)] - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2019.

One of the most prevalent diseases of the oral cavity is periodontal disease. Periodontitis is an inflammatory disease and secondary to the presence of bacteria. Periodontal pathogens can translocate into the bloodstream and exhibit peripheral effects. A previous study from our laboratory shows that nitric oxide (NO) is a key regulator of some of the effects of periodontal disease on remote organs such as heart and kidney, as well as endothelial dysfunction and decreased adrenergic-mediated contractility of the aorta. The objective of the present study was to investigate the functional response of the mesenteric artery obtained from rats with mild ligature-induced periodontitis. We observed the presence of bacterial DNA in gingival and ligature samples, when compared to the control group, confirming the infectious nature of our model of ligature-induced periodontitis. It was observed that both in the mesenteric artery segments and mesenteric bed the vasorelaxant responses to sodium nitroprusside (SNP) and the maximal relaxing response to the soluble guanylate cyclase stimulator (sGC), BAY 41-2272, were decreased when compared to the sham group. However, there were no differences between the groups in relation to the response to the sGC, BAY 60-2770. Furthermore, even with increased H₂S production by the mesenteric artery obtained from the ligature group, no significant differences were observed between the groups in the vasorelaxant response related to hyperpolarization pathway. However, mesenteric arteries from the ligature group incubated with the hydrogen sulfide (H₂S)-producing enzyme inhibitor, AOAA, showed increased maximal vasorelaxant response to SNP when compared to the curves in the absence of this inhibitor. In addition, it was observed significant increases of the nitration of protein tyrosine residues, inducible nitric oxide synthase (iNOS) RNA and activity of the antioxidant enzyme catalase (CAT), with reduced activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) enzyme mRNA, and cyclic 3', 5'- guanosine monophosphate (cGMP) content after stimulation with SNP in the mesenteric artery of the ligature group. Electronic paramagnetic resonance (EPR) spectrometry applied

to mesenteric arteries of rats with periodontitis group showed that heme-Fe⁺² of the sGC enzyme is oxidized to heme-Fe⁺³. Based on these results, we can conclude that during the initial phase of ligature-induced periodontitis in rats, functional changes related to the NO-sGC-cGMP pathway occur in the mesenteric artery, which may be secondary to decreased sGC enzyme activity due to oxidation of the heme-Fe⁺² group, which may occur secondary to the excessive production of iNOS-derived NO, superoxide anion or their combination. In addition, the presence of periodontitis in rats contributes to the overproduction of H₂S, which may indicate the occurrence of interaction between H₂S and NO.

Keywords: Mesenteric artery. Oxidative stress. Soluble guanylate cyclase. Nitric Oxide. Periodontitis. Hydrogen sulfide.

INTRODUÇÃO

A doença mais predominante na cavidade bucal é a doença periodontal. No Brasil, aproximadamente 82% dos indivíduos adultos (35 a 44 anos) apresentam alguma alteração na cavidade bucal, sendo que 19,4% possuem periodontite e 32,3% já não possuem dentes. Sendo assim, doenças periodontais são consideradas um grave problema de saúde pública e a busca de novos tratamentos devem ser colocados em questão (Bratthall et al., 2006; Petersen, Ogawa, 2012; Petersen, 2013; Papapanou et al., 2018; Soares et al., 2018).

O periodonto é um conjunto de tecidos que tem como função fixar e proteger os dentes. As 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 (Figura 1a). A manutenção da integridade periodontal resulta em um bom funcionamento da sua estrutura, o que é essencial para a homeostase do tecido, defesa contra microrganismos e seus produtos (Schroeder, Listgarten, 1997).

A doença periodontal é caracterizada por um processo inflamatório, porém de causa multifatorial, sendo influenciada por fatores genéticos, ambientais e comportamentais. De forma geral, a doença periodontal é dividida em duas categorias fundamentais: gengivite (inflamação gengival) e periodontite (inflamação dos tecidos de suporte dos dentes), com destruição dos tecidos de suporte dos dentes (Kwek et al., 1990).

A inflamação causada nesses tecidos de suporte e revestimento dos dentes se dá devido às bactérias, principalmente gram-negativas e anaeróbicas. Esses patógenos se instalam e aderem às superfícies dos dentes, formando uma película com células epiteliais descamadas, leucócitos polimorfonucleares, micoplasmas, leveduras e protozoários; conhecida como placa bacteriana, ou biofilme. A presença de um conjunto de bactérias, produtos bacterianos e/ou a resposta de defesa do hospedeiro leva à destruição tecidual, que pode resultar, futuramente, em perda de inserção dos dentes (Figura 1b; Page, Kornman, 1997; Ximénez-Fyvie et al., 2000; Lockhart et al., 2012).

Em consequência dessa complexidade, a periodontite destaca-se pela alta prevalência e por sua associação as doenças sistêmicas (Haffajee, Socransky, 1994; Haynes, Stanford, 2003; Bratthall et al., 2006; Petersen, Ogawa, 2012; Papapanou et

al., 2018). Socransky et al. (1998) observaram que a virulência dos patógenos do complexo vermelho, *Porphyromonas (P) gingivalis*, *Tannerella (T) forsythia*, *Treponema (T) denticola*, além de levar à destruição da estrutura periodontal, está relacionada as alterações sistêmicas (Socransky et al., 1998) como, por exemplo, no sistema cardiovascular (Desvarieux et al., 2005; Doğan et al., 2005).

Figura 1 – Ilustração da progressão do estado de saúde periodontal. Periodonto saudável (a) e doença periodontal (b). Fonte: Hajishengallis 2015 (modificado).

Na clínica, o diagnóstico da periodontite é realizado através da observação de sangramento gengival, presença de bolsas periodontais, perda de inserção do dente e avaliações radiográficas de perda óssea alveolar (Papapanou et al., 2018). Há um consenso de que o indivíduo com periodontite, mesmo revertendo o estado do periodonto doente para saudável, através de tratamento, sempre será um indivíduo com periodontite, diferente de pacientes com gengivite. Dessa forma, o paciente que é acometido pela periodontite deverá permanentemente cuidar da saúde bucal para que não ocorra reicidiva e, assim, não prejudicar a sua qualidade de vida (Chapple et al., 2018; Caton et al., 2018).

1.1 Inflamação dos tecidos periodontais.

A inflamação dos tecidos periodontais é uma importante ação de proteção do organismo contra os microrganismos. Porém, esse processo inflamatório pode resultar numa aparência inestética da dentição, na perda da função da mastigação e no edentulismo (Papapanou et al., 2018).

Durante a invasão pelo patógeno na periodontite, o sistema imunológico do hospedeiro tenta controlar tal processo invasivo, bem como suas toxinas, que são observadas, primeiramente, pela presença de vasodilatação na região e quimioatração, com consequente migração das células do sistema imunológico inato, tais como as células polimorfonucleares (neutrófilos), para o local da inflamação (Roberts et al., 1997; Tatakis, Kumar, 2005).

Essas células do sistema imunológico são responsáveis por induzir à liberação de mediadores inflamatórios como, por exemplo, o fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)- 1β , prostaglandina (PG)- E2, IL-8 por meio da ativação de receptores do tipo Toll 4 (do inglês, *toll like receptor*, TLR4) e CD14 (Roberts et al., 1997; Pålsson-McDermott, O'Neill, 2004). A intensa participação das citocinas na doença periodontal, principalmente IL-1, IL-6, IL-11, IL 17, TNF- α e as PGs, promovem a diferenciação de osteoclastos precursores em osteoclastos ativos, levando à reabsorção óssea, o que, a longo prazo, resulta na perda de inserção do dente (Albraith et al., 1997; Bezerra et al., 2000; Lima et al., 2000; Cochran, 2008; Holzhausen et al., 2005; Toker et al., 2009).

Em pacientes com periodontite, as bactérias mais encontradas e estudadas são *P. gingivalis*, *T. forsythia*, a espiroqueta *T. denticola* e *Actinobacillus (A) actinomycetemcomitans* (Mandell, Socransky, 1981; Moore, Moore, 1994; Dashper et al., 2014). A presença de patógenos capazes de invadir a estrutura e alterar função do epitélio juncional, responsável por manter a saúde periodontal e sendo esse um obstáculo eficiente contra bactérias e seus produtos, pode ser uma das explicações para a associação da periodontite com possíveis doenças em órgãos distantes (Nanci, Bosshardt, 2006; Dashper et al., 2014; Salminen, 2014).

Outro fator de extrema importância na doença periodontal é a produção do óxido nítrico (NO) sintetizado pelas isoformas óxido nítrico sintases (NOS). A isoforma considerada induzível, a iNOS, é uma resposta protetora do hospedeiro contra organismos invasores, atuando na eliminação do patógeno. O

lipopolissacarídeo (LPS), produto da parede celular da bactéria gram-negativa, interage com receptores específicos de macrófagos para gerar uma resposta inflamatória que resulta em produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . As citocinas e/ou LPS ativam a iNOS, levando ao aumento do ritmo de produção de NO. Esse excesso de NO pode produzir citotoxicidade e tem ação antimicrobiana, pois o NO reage com o radical ânion superóxido (O₂ $\bullet^-$), o que resulta na formação de peroxinitrito (ONOO $^-$), o qual pode se degradar a radical hidroxila (OH $\bullet$), sendo assim, eficiente na defesa contra invasão de patógenos (Nussler, Billiar, 1993; Marín, Rodríguez-Martínez, 1997).

Nesse contexto, Herrera e colaboradores (2011b) mostraram uma diminuição da perda óssea em animais com periodontite tratados com o inibidor não seletivo de NOS, o N(ω)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Ainda, na periodontite induzida pelo modelo de ligadura foi observado aumento do RNAm da iNOS, o que resultou no aumento excessivo de NO e peroxinitrito na mucosa gengival, produzindo resposta inflamatória e destruição óssea (Herrera et al., 2011b). Adicionalmente, o efeito foi revertido devido ao tratamento com mercaptoetilguanidina (MEG), o qual é inibidor seletivo de iNOS e neutralizou os efeitos do peroxinitrito. Tais resultados confirmam que o NO e o peroxinitrito atuam de forma significativa na doença periodontal (Lohinai et al., 1998).

1.2 Infecção local e alterações sistêmicas.

Em 1900, o médico britânico William Hunter divulgou a ideia sobre bacteremia bucal, investigando a importância de doenças bucais como causa de outras enfermidades, alterando a função de outros órgãos. Por muitos anos, o médico estudou sobre a presença de bactérias na cavidade bucal e observou que, mesmo em condições de diferentes bacteremia, com características particularmente virulentas, havia também um elemento importante, a resistência do indivíduo. Assim, diversos distúrbios foram relacionados com a bacteremia bucal como, por exemplo, doenças gástricas, meningites, endocardites ulcerativas, nefrites e osteomielite. Sabendo que era inevitável a infestação desses microrganismos na cavidade bucal, pois era um perfeito ambiente para seu desenvolvimento e propagação, foi especulada a possibilidade de evitar a sua aderência no dente. Desse modo, foram propostas medidas de prevenção e tratamento com aplicação direta e diária de ácido

carbólico no dente “doente” e/ou na gengiva inflamada e, caso a infecção local não melhorasse, o procedimento final seria a extração dos dentes (Hunter, 1900).

Muitos estudos demonstram a importância das infecções na doença periodontal como mecanismos de disseminação das mais diversas bactérias para corrente sanguínea, como é o caso *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. denticola*. Essas bacteremias são responsáveis por muitas infecções à distância, ocorrendo adoecimento de órgãos vitais (Haraszthy et al., 2000; Socransky, Haffajee, 2002; Fiehn et al., 2005; Nomura et al., 2006; Aimetti 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-1 β , IL-6, TNF- α e PGE2, faz com que o organismo encare tal condição como sendo uma forma de agressão, levando a um processo crônico e sistêmico. Consequentemente, essas alterações poderiam levar a diversas doenças sistêmicas, como a aterosclerose e a eventos tromboembólicos (Beck et al., 1996; Loos, 2005).

Outra forma da periodontite promover alterações em outros sistemas é através da produção excessiva de espécies reativas. Mesmo em sítios distantes, observou-se um aumento de componentes pró-oxidativos, revelando que a periodontite aumentaria espécies reativas do oxigênio (EROs) e, da mesma forma, diminuiria o potencial antioxidante biológico do plasma (D'Aiuto et al., 2010). Os componentes das EROs incluem um grande número de radicais do oxigênio, tais como o ânion superóxido e o radical hidroxila, como também derivados do oxigênio que não contém elétrons desemparelhados em seus orbitais, tais como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito. Entretanto, essas espécies reativas possuem graus diferentes de reatividade com outras moléculas que podem causar diversos danos biológicos. Dentre as espécies reativas, o radical hidroxila é considerado uma das mais reativas (Klebanoff, 1974; McCord, 1974; Beckman et al., 1990; Dukan et al., 1999).

Por outro lado, o organismo, com o intuito de neutralizar a toxicidade mediada pelos componentes pró-oxidativos, realiza um sistema de remoção de espécies reativas por antioxidantes, que se dividem como enzimáticos e não enzimáticos (Halliwell, Cross, 1994). Com relação aos antioxidantes enzimáticos, após a produção do radical O₂•⁻, as três enzimas antioxidantes da família superóxido dismutase (SOD 1 - 3) catalisarão a reação de dismutação, o que resulta na espécie

reativa H_2O_2 , que, em seguida, passará a ser reduzida à água (H_2O) pela ação das enzimas antioxidantes catalase ou glutathione peroxidase (GPx). O sistema glutathione atua como cofator da GPx, por intermédio da redução da glutathione oxidada (GSSG), que passa a ser glutathione reduzida (GSH), por ação da enzima intracelular glutathione redutase (GR). A geração de NADPH pela redução do NADP^+ , através da via pentose fosfato (glicose-6-fosfatase dehidrogenase, G6PD), é utilizada pela GR como um doador de elétrons (Halliwell, Cross, 1994; Kirkman et al., 1999; Sies, 1999).

1.3 Sistema cardiovascular.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 31% das mortes ocorrem devido às complicações cardiovasculares, sendo assim consideradas as principais causas de mortalidade no mundo (OMS, 2016; Benjamin et al., 2017). O desenvolvimento de doenças cardiovasculares ocorre devido a fatores genéticos, comportamentais e/ou com a pré-existência de outras doenças, como é o caso da obesidade, diabetes mellitus, periodontite, entre outras (Tsioufis et al., 2011; Tonetti, Van Dyke, 2013; Forbang et al., 2014; Neves, Couto, 2014; Martin-Cabezas et al., 2016).

Um dos componentes importantes do sistema cardiovascular são os vasos arteriais. As artérias têm como estrutura três camadas concêntricas, conhecidas como túnicas íntima, média e adventícia. Na camada mais interna dos vasos sanguíneos (túnica íntima), a que está em contato direto com o sangue, há uma membrana composta por uma única camada de células epiteliais denominada endotélio. Na túnica média, é observada a presença de células da musculatura lisa vascular, além de colágeno e componentes da matriz extracelular. Por sua vez, a adventícia, é um compartimento complexo e heterogêneo, pois possui diversos tipos celulares como fibroblastos, células progenitoras, células do sistema imunológico, vasos sanguíneos e linfáticos (Rhodin, 1980; Sartore et al., 2001; Stenmark et al., 2006; Laccini, Irigoyen, 2008; Triggle et al., 2012). Atualmente, foi descrito que junto a adventícia há presença de um tecido adiposo denominado tecido adiposo perivascular (do inglês, *perivascular adipose tissue*, PVAT), que influencia na atividade do vaso, porém ainda é alvo de vários estudos (Soltis e Cassis, 1991). Sendo assim, para manter a homeostase vascular, é importante compreender que

cada camada da estrutura vascular tem diferentes funções, de acordo com as características histológicas e bioquímicas (Figura 2; Laccini, Irigoyen, 2008; Stenmark et al., 2013).

Do ponto de vista fisiológico, o endotélio vascular é uma monocamada de células que recobre internamente os vasos, que desempenha uma importante função na resistência vascular (Triggle et al., 2012). 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. Dessa forma, um quadro de desequilíbrio dessas substâncias pode ser proveniente de uma disfunção endotelial, devido às alterações na funcionalidade do endotélio vascular, o que resulta na redução da vasodilatação. (Grundy, 2003; Triggle et al., 2012).

Figura 2 – Ilustração da estrutura do vaso arterial. Representação das três camadas concêntricas e diversos constituintes celulares. Fonte: Stenmark et al., 2013.

A participação do endotélio no controle de fluxo sanguíneo e na homeostase vascular está vinculada à ativação de substâncias vasoativas através de três fatores: fatores relaxantes derivados do endotélio (do inglês, *endothelium derived relaxing factors*, EDRF), fatores de contração derivados do endotélio (do inglês, *endothelium derived contracting factors*, EDCF; Furchgott Zawadzki, 1980; Ignarro et al., 1986; Lüscher, Vanhoutte, 1986; Furchgott, Vanhoutte, 1989) e o fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio (do inglês, *endothelium derived hyperpolarizing factors*, EDHF), embora o EDRF já incluía os EDHF (Chen et al., 1988; Huang et al., 1988).

Em 1980, iniciaram-se os estudos sobre o endotélio com Robert Furchgott e John Zawadzki. Os pesquisadores observaram, em um experimento clássico, que as aortas torácicas de coelhos tinham o vasorelaxamento dependente do endotélio, testes com acetilcolina (ACh), somente quando o endotélio estava íntegro. Essa teoria foi possível de ser postulada graças a lesão endotelial em que o pesquisador causava, involuntariamente, nas tiras de aortas. Nestes tecidos, o efeito da ACh era diferente de tudo o que se havia publicado antes de 1980 (Furchgott, Zawadzki, 1980). Anos mais tarde, identificaram o NO como a possível substância liberada pelo endotélio que promove a vasodilatação (Palmer et al., 1987).

Estudos mostram a importância do NO em diversos órgãos, além de ser considerado protetor do organismo contra doenças infecciosas, atua como um EDRF. O processo para a geração enzimática de NO depende de qual isoforma de NOS está sendo estimulada. Dessa forma, as isoformas constitutivas são a NOS I ou nNOS, que é a forma neuronal, e a NOS III ou eNOS, que, primariamente, foi descoberta no endotélio. Enquanto isso, a NOS II ou iNOS é a forma induzível, na qual a produção do NO ocorre quando há estímulo infeccioso, conforme relatado anteriormente (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1988; Leone et al., 1991; Nussler, Billiar, 1993; Marín, Rodríguez-Martínez, 1997).

O gás NO é um radical livre, com uma meia vida de menos de 1 segundo. Durante essa meia vida, o NO pode doar ou receber elétrons, participando de sinalizações intra- e extracelular de diversos processos fisiológicos, por exemplo, na angiogênese, agregação plaquetária, inflamação, neurotransmissão e, principalmente, na regulação da função cardiovascular (Ignarro et al., 1987; Chiesa et al., 2018)

A síntese de NO derivado do endotélio ocorre após a ligação da ACh aos receptores muscarínicos M3 acoplados à proteína G_q, o que resultará na formação

dos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). Esse último é capaz de ativar receptores de IP3 na membrana do retículo endoplasmático, estimulando a liberação de cálcio (Ca^{2+}) ao citosol, o qual estimula a atividade da eNOS (Vanhoutte et al., 1989; Pollock et al., 1991). Em geral, as NOS utilizam o aminoácido L-arginina e oxigênio molecular para a síntese do NO, gerando L-citrulina como subproduto (Palmer et al., 1988; Leone et al., 1991). Dentre outras ações, o NO irá ativar a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), um heterodímero presente na musculatura lisa vascular e que possui em sua estrutura duas subunidades: a α e a β , bem como um grupo heme adicional. A enzima, quando ativada pelo NO, após a ligação desse ao ferro II (Fe^{2+}) do grupo heme localizado na subunidade β_1 , passa a ter a função de catalisar a formação do segundo mensageiro monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Portanto, com aumento dos níveis de GMPc, ocorrem a ativação e o aumento da atividade da proteína quinase (PKG)- dependente de GMPc e, conseqüentemente, a fosforilação da fosfoproteína estimulada por vasodilatador (do inglês, *vasodilator stimulated phosphoprotein*, VASP). Essa cascata de transdução tem como resultado a diminuição da concentração de Ca^{2+} intracelular devido à diminuição do influxo de Ca^{2+} , a captação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, ou aumento da extrusão de Ca^{2+} através da membrana celular. Assim, não ocorrendo a formação do complexo Ca^{2+} -CAM (calmodulina), sendo insuficiente para a ativação da cadeia leve de miosina fosforilada. Dessa forma, a baixa atividade da ATPase torna a contração inibida, causando o relaxamento vascular (Wood, Ignarro, 1987; Vanhoutte et al., 1989; Derbyshire, Marletta, 2012; Sutherland, Walsh, 2012).

A importância da via NO-sGC-GMPc na vasodilatação e regulação da pressão sanguínea está bem evidenciada (Waldman et al., 1986; Mülsch et al., 1988; Kagota et al., 2001; Perkins et al., 2007; Sips, Buys, 2013; Thoonen et al., 2013). Estudos mostram que a atividade da sGC pode ser regulada por diversos fatores, dentre eles as moléculas oxidantes (Zhao et al., 2000; Chester et al., 2011; Zhou et al., 2016). Já é conhecido que as espécies reativas, por exemplo, o radical livre $\text{O}_2^{\bullet-}$, podem agir diretamente na diminuição da biodisponibilidade do NO devido à formação de peroxinitrito e, assim, prejudicar a produção de GMPc e os efeitos vasodilatadores (Lohinai et al., 1998; Kojda, Harrison, 1999; Guzik et al., 2002; Herrera et al., 2011a). Além disso, um ambiente em que ocorra aumento de espécies reativas faz com que a enzima sGC tenha menor afinidade ao NO devido à oxidação

direta com o grupo heme-ferro no estado ferroso (Fe^{+2}) da enzima sGC, que passa a ser ferro no estado férrico (Fe^{+3}), o que leva à inativação da sGC (Brandwein et al., 1981; Braugher, 1983; Schrammel et al., 1996; Zhao et al., 2000; Stasch et al., 2006; Fernhoff et al., 2012).

Outra maneira de a enzima sGC se tornar insensível ao NO é por meio dos resíduos de cisteína que estão relacionados à perda da atividade da enzima sGC, através da oxidação de tióis nas regiões Cys-78 e Cys-122 na subunidade $\beta 1$ da enzima sGC. Consequentemente, não há a ativação completa da sGC ao NO, devido à alteração conformacional da enzima (Hess et al., 2005; Sayed et al., 2007; Fernhoff et al., 2009; Maron et al., 2009; Fernhoff et al., 2012).

Embora os efeitos da via NO-sGC-GMPc sejam importantes para que ocorra o relaxamento vascular, a artéria mesentérica possui outros mecanismos que atuam no vasorelaxamento. De fato, estudo realizado por Dowell et al. (1996) mostrou 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).

Diante dessas considerações, a via da cicloxigenase (COX), em especial a prostaciclina (PGI_2), mediador lipídico sintetizado pela enzima COX a partir do ácido araquidônico, possui atividade antitrombótica e atua como um EDRF (Bunting et al., 1976; Dusting et al., 1977). Duas isoformas de COX têm sido caracterizadas (COX-1 e COX-2), as quais estão divididas de acordo com suas funções e localizações. Estudo realizado por Muscará et al. (2000) mostrou que os inibidores de COX-2 podem acarretar em disfunções vascular e renal. Em ratos normotensos e hipertensos tratados com celecoxibe, inibidor seletivo da enzima COX-2, por três semanas, foi observado aumento da pressão arterial, da aderência leucocitária no endotélio e da agregação plaquetária. Ainda, os metabólitos da prostaciclina, que revelaram estar aumentados em ratos hipertensos, foram diminuídos após o tratamento com celecoxibe, demonstrando o importante papel da prostaciclina na homeostase vascular, apesar de que esse inibidor pode ser eficiente como anti-inflamatório (Muscará et al., 2000).

Um dos primeiros relatos sobre a PGI_2 e sua importância fisiológica foi descrito pelo ganhador do prêmio Nobel de Medicina John Vane e seus

colaboradores (1971 e 1976), os quais verificaram o relaxamento em tiras de aorta de coelho, mas não em tiras de estômago de rato, devido à incubação dessas tiras a um composto que era conhecido como substância contraída de aorta de coelho (do inglês, *rabbit-aorta contraction substance*, RCS) ou prostaglandina X (PGX), hoje denominada como PGI_2 . Adicionalmente, as preparações tiveram os efeitos inibidos com a adição de indometacina (INDO) ou meclofenamato (ou ácido mefenâmico), conhecidos como inibidores não seletivos da COX. Esse clássico trabalho demonstrou que a PGI_2 , além de ser uma substância instável, é proveniente da mesma síntese que produz as prostaglandinas (Gryglewski, Vane, 1971; Bunting et al., 1976; Moncada et al., 1976).

A biossíntese de PGI_2 ocorre através da ação da enzima fosfolipase A2 (PLA_2) que catalisa a hidrólise de um ácido graxo, o ácido araquidônico, que é liberado da membrana celular. No citoplasma, o ácido araquidônico sofre a ação da enzima COX, formando um intermediário endoperóxido, denominado PGH_2 , que é instável e leva à formação de prostaglandinas, PGI_2 e tromboxano (TXA_2) (Dusting et al., 1977; Vane, Botting, 1987; Smith, 1992). No tecido vascular, as células endoteliais liberam a PGI_2 para agir no seu receptor IP (receptor acoplado a proteína G), localizadas na região do músculo liso vascular, no qual passa a ativar a adenilil ciclase (AC) e a formação do segundo mensageiro adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Portanto, o aumento dos níveis de AMPc desencadeará uma cascata de sinalização intracelular, o que compreende a inibição da via clássica de agregação plaquetária e a efetivação do relaxamento do músculo liso vascular (Moncada et al., 1976; Narumiya et al., 1999).

Outro importante fator que contribui para o relaxamento vascular é o EDHF. Essa molécula ainda tem origem desconhecida, porém sabe-se que não se trata nem de NO, nem de PGI_2 , apesar de que essas substâncias também possam hiperpolarizar a musculatura lisa vascular (Siegel et al., 1989; Tare et al., 1990). O seu mecanismo está relacionado à ativação de canais de potássio (K^+), ocorrendo um relaxamento da musculatura lisa vascular dependente do endotélio (Chen et al., 1988; Huang et al., 1988; Féletou 2011a e 2011b). Há diferentes tipos de canais de K^+ , como os dependentes de Ca^{2+} , que abrangem em pequena, intermediária ou alta condutância (BK_{Ca} , IK_{Ca} , SK_{Ca} , respectivamente), os canais de K^+ retificadores (K_{IR}), os canais de K^+ sensíveis à voltagem (K_{V}) e canais de K^+ sensíveis à ATP (K_{ATP} ;

Jackson, 2000; Vanhoutte, 2004; Chen et al., 1988; Huang et al., 1988; Félétou 2011a e 2011b).

Nesse sentido, o sulfeto de hidrogênio (H_2S) é uma importante molécula que atua na inflamação, no estresse oxidativo, na regulação do sistema nervoso, na patogênese da doença periodontal e no sistema cardiovascular, ativando canais K_{ATP} (Persson et al., 1990; Zhao et al., 2001; Vacek et al., 2010; Wang et al., 2015; Shefa et al., 2018). Por décadas, o H_2S ficou conhecido como um gás tóxico com o odor de ovo podre (Smith, Gosselin, 1979, Khan et al., 1990; Dorman et al., 2002). Porém, a interpretação de que a molécula somente tinha efeitos negativos para o organismo humano mudou, quando foi descoberta a síntese endógena do H_2S nos mamíferos, abrindo, desse modo, um novo campo de estudo para compreensão de seus efeitos fisiológicos (Stipanuk, Beck, 1982; Griffith, 1987).

Portanto, o H_2S pode contribuir para efeitos fisiológicos contraditórios por conta da sua concentração no organismo humano. Por exemplo, o efeito dual do H_2S é observado quando em baixas concentrações a molécula pode ter atividade citoprotetora e antioxidante, porém quando as concentrações atingem patamares elevados pode resultar em atividade citotóxica e estimular o estresse oxidativo (Wong et al., 2006; Hadadha et al., 2015). De fato, esse papel do H_2S foi evidenciado em um estudo realizado por Hadadha e colaboradores (2015), baseado no modelo animal de isquemia cerebral em que foi administrado, intraperitonealmente (ip), diversas doses do inibidor das enzimas produtoras de H_2S , o ácido aminooxiacético (AOAA). Nas menores doses, 0,025, 0,05 e 1 mmol/kg, o inibidor promoveu efeito protetor contra a isquemia cerebral com diminuição da área de infarto, mas, na dose máxima, 5 mmol/kg, houve um aumento da lesão neuronal. Esses dados mostram que o H_2S tem um efeito dual que é dependente de dose e, assim, podendo ter um efeito fisiológico benéfico ou maléfico para a lesão isquêmica cerebral (Hadadha et al., 2015).

Há diversas vias para que ocorra a síntese de H_2S em mamíferos. As principais vias estudadas estão relacionadas com reações enzimáticas, todavia há síntese de H_2S em reações não enzimáticas. Com relação às reações enzimáticas, três enzimas são importantes para a produção do H_2S : cistationina- γ -liase (CSE), cistationina- β -sintase (CBS) e 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST). Ainda, essas reações fazem uso de uma variedade de substratos tíois como, por exemplo, L-cisteína e homocisteína, e algumas reações são dependentes do co-fator 5'-

fosfato de piridoxal (vitamina B₆, Figura 3; Stipanuk, Beck, 1982; Zhao et al., 2001; Wang 2002; Fiorucci et al., 2006; Chiku et al., 2009; Shibuya et al., 2009a; Shibuya et al., 2009b; Kimura et al., 2012; Rose et al., 2017).

Figura 3 – Reações enzimáticas da síntese de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Cistationina-γ-liase (CSE), cistationina-β-sintase (CBS), 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (3-MST), amônia (NH₃), S-alcenilmercaptocisteína (CysSR), cisteína aminotransferase (CAT).

Em relação à reação não enzimática de síntese de H₂S, os substratos utilizados nessas reações também possuem grupo tiol. Estudos mostram que esse tipo de reação é realizado em diversos tecidos, principalmente durante a hipóxia no catabolismo mitocondrial, sendo um rápido mecanismo para aumento de produção de H₂S (Figura 4; Searcy, Lee, 1998; Whitfield et al., 2008; Waypa et al., 2009; Olson et al., 2013).

Figura 4 – Reação não enzimática da síntese de sulfeto de hidrogênio (H₂S). Glutathione (GSH) e glutathione dissulfeto (GSSG).

Diante dessas reações, é oportuno frisar que cada tecido requer mais de uma enzima do que outra. A distribuição das enzimas é o ponto-chave para se conhecer melhor sobre a produção de H_2S e, assim, modular os efeitos biológicos. Por exemplo, a enzima CBS é considerada como principal fonte de H_2S no estômago, íleo e colon (Martin et al., 2010), enquanto que a principal enzima que atua significativamente nas artérias é a CSE (Hosoki et al., 1997; Zhao et al., 2001; Yang et al., 2008).

Estudo realizado por Yang e colaboradores (2008) observou que camundongos *knockout* para CSE apresentam diminuição de 80% dos níveis de H_2S em aorta e coração. Ainda o estudo observou diminuição do vasorelaxamento dependente de endotélio em artéria mesentérica de resistência dos animais *knockout* quando comparados aos camundongos normais. Além disso, a expressão proteica da enzima eNOS não foi alterada nos animais *knockout*. Esses resultados mostram que o H_2S é um importante modulador da pressão arterial por produzir alterações importantes nos vasos desses camundongos (Yang et al., 2008).

Embora a participação de cada via dos EDRF seja importante no relaxamento vascular, convém observar que a interação entre as vias pode resultar em alterações dos efeitos vasculares. Whiteman e colaboradores (2006) observaram que, em cultura de células de linhagem murina derivada de macrófagos (RAW264.7), o tratamento com nitroprussiato de sódio (SNP) produziu aumento de GMPc, mas não quando hidrossulfeto de sódio (NaHS), doador de H_2S , foi adicionado concomitantemente. Entretanto, a adição de cobre (Cu^{2+}) reverteu essa inibição pela formação de CuS e a consequente liberação do NO. Conclui-se que o nitrosotiol formado por reação entre o H_2S e o NO tem características diferentes de outros nitrosotíóis de baixo peso molecular (George, Shibata, 1995; Angulo et al., 2000; Whiteman et al., 2006), em vista de que esses compostos efetivamente estimulam a sGC via liberação de NO, resultando em aumento de GMPc. Essas observações sugerem que o nitrosotiol resultante da reação entre o NO e o H_2S 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 (Whiteman et al., 2006).

Em contraste, Bucci e colaboradores (2012) observaram que em tecidos de aorta e artéria mesentérica de camundongos CSE $^{-/-}$ houve diminuição dos níveis de GMPc, quando comparados com artérias provenientes de camundongos *wild-type* (WT), indicando que o H_2S pode regular os níveis de GMPc. Adicionalmente, foi

verificada a resposta vasorelaxante ao doador de H₂S (NaHS), na qual foi observada maior sensibilidade ao vasorelaxamento e diminuição da resposta máxima das artérias aortas quando incubadas com o inibidor da fosfodiesterase (PDE)-V (sildenafil), em comparação às artérias incubadas com veículo. Esses dados sugerem que o H₂S, além de promover o relaxamento vascular através da ativação dos canais de K_{ATP}, também pode relaxar o tecido vascular através da inibição da PDE-V, modulando, dessa forma, os níveis de GMPc (Bucci et al., 2012).

1.4 Periodontite e a sua relação com o sistema cardiovascular.

Nas últimas duas décadas, diversos estudos correlacionam a periodontite e o desenvolvimento de doenças relacionadas ao sistema cardiovascular, tais como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, isquemia, doença vascular periférica, endocardite, hipertensão arterial, entre outras (Haraszthy et al., 2000; Li et al., 2002; Fiehn et al., 2005; Nomura et al., 2006; Aimetti et al., 2007; Pollreisz et al., 2010; Tsioufis et al., 2011, Ekuni et al., 2012; Petersen et al., 2013, Tonetti, Van Dyke, 2013; Martin-Cabezas et al., 2016).

Sabe-se que a constante liberação de citocinas pró-inflamatórias do hospedeiro contra microrganismos, tais como TNF- α , IL-1, IL-6; diminuiria a expressão de eNOS e consequentemente a produção de NO (Beck et al., 1996; Zhang et al., 1997). Em consequência disso, está bem estabelecido que a inflamação crônica pode causar disfunção endotelial através da redução da biodisponibilidade do NO ou de seus efeitos celulares em pacientes com periodontite. De fato, pacientes submetidos ao tratamento periodontal restabeleceria a função vasomotora (Higashi et al., 2009).

Considerando a importância dos efeitos da doença periodontal em órgãos distantes, em particular os que compõe o sistema cardiovascular, estudos evidenciam que animais com periodontite desenvolvem disfunção vascular em artérias mesentérica de resistência 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 *P. gingivalis*, durante três meses, sem que tenham sido observadas

alterações vasculares significativas na resposta vasodilatadora à ACh (dependente de endotélio) ou ao doador de NO, SNP (Pereira et al., 2011).

E ainda, estudo realizado por Brito e colaboradores (2012) utilizando ratos com 14 dias de ligadura demonstrou que a diminuição no relaxamento vascular dependente do endotélio em aorta estava associada com inflamação sistêmica, devido ao aumento de LDL-colesterol, IL-6 e proteína C reativa (CRP) quando comparado ao grupo controle. Adicionalmente, foi observado que ratos com 28 dias de ligadura além da diminuição no relaxamento vascular dependente do endotélio, houve aumento de EROs ($O_2^{\bullet-}$), no caso em artérias mesentéricas de resistência. Esses resultados apontam para a ocorrência de disfunção endotelial em ratos com 14 e 28 dias de ligadura, tanto em aorta como artéria mesentérica, respectivamente. Esses resultados sugerem que há uma possível correlação entre a presença da doença periodontal e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Brito et al., 2013).

Mendes e colaboradores (2014) demonstraram que ratos com 21 dias de ligadura tiveram aumento da expressão de COX-2 em artérias mesentéricas de resistência e diminuição no conteúdo de NO em amostras de sangue, quando comparados com ratos controle. O tratamento com etoricoxibe, inibidor de COX-2, aumentou a pressão arterial dos ratos, sugerindo uma importante correlação em que a diminuição do NO pode ter estimulado o aumento da expressão de COX-2, mantendo, consequentemente, a vasodilatação. Assim, possíveis mecanismos compensatórios estão ativos com o objetivo de preservar a funcionalidade do vaso neste modelo de doença periodontal inflamatório (Duffy et al., 1998; Mendes et al., 2014).

Trabalhos prévios do nosso grupo demonstraram que a presença de periodontite em ratos, após sete dias de ligadura do primeiro molar inferior, resulta na diminuição das respostas máximas, contrátil e relaxante, de anéis de aorta à norepinefrina (NE) e ACh *in vitro*, quando comparados aos ratos controle. Ainda, foi observado que houve diminuição da enzima eNOS e o aumento da enzima iNOS e COX-2 em aorta quando comparado aos tecidos dos animais controle (Campi et al., 2015).

Recentemente, outros resultados obtidos por nosso grupo demonstraram que ratos com periodontite, induzida por ligadura bilateral dos primeiros molares inferiores, podem contribuir para o desenvolvimento de alterações funcionais da

vasomotricidade em artéria mesentérica de resistência. Visto que foi observada diminuição significativa da resposta vasorelaxante ao sildenafil, inibidor da enzima PDE-V, *in vitro*, em anéis de artéria mesentérica, quando comparada às respostas dos vasos provenientes dos animais controle (sham), 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 à ativação da via NO-sGC-GMPc. Assim, tais dados sustentam a hipótese de que a presença de ligadura induz alterações na resposta da musculatura lisa dessas artérias frente ao relaxamento promovido pelo NO endógeno (Figura 5, dados não publicados). Adicionalmente, foi observado em amostras de artérias mesentéricas que a quantificação de RNAm para a enzima iNOS mostrou aumento da transcrição desse gene, ao passo que na enzima eNOS observou-se diminuição significativa da transcrição desse gene no grupo ligadura em relação ao grupo sham, o qual pode estar relacionado com aumento da produção de NO no grupo ligadura. Consequentemente, a ligadura pode estar desencadeando efeitos da inflamação na artéria mesentérica. (Figura 5, dados não publicados). Isso nos evidencia que, mesmo com diferenças mecânicas, ratos com ligadura possuem disfunções funcionais importantes entre ambos os leitos vasculares, aorta e artéria mesentérica, sendo uma delas caracterizada como disfunção endotelial.

Figura 5 - Curva de relaxamento *in vitro* de segmentos de artérias mesentéricas isoladas de ratos sham e ligadura. Curvas de concentração-resposta ao sildenafil (n= 9 - 7 ratos/ grupo, respectivamente, painel A). Expressão de RNAm das isoformas eNOS (n= 5 ratos/ grupo, painel B) e iNOS (n= 7 - 6 ratos/ grupo, respectivamente, painel C). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. **P<0,05 e ***P<0,001 vs. sham, de acordo com o teste t de Student para dados não-pareados.

CONCLUSÕES

Durante a fase inicial da periodontite bilateral induzida por ligadura em ratos, durante sete dias, mudanças funcionais relacionadas à via NO-sGC-GMPc ocorrem na artéria mesentérica, o que pode ser secundário à diminuição da atividade da enzima sGC devido à oxidação do grupo heme-Fe⁺², o que pode ocorrer de forma secundária à produção excessiva de NO derivado de iNOS, ânion superóxido ou sua combinação. Além disso, a presença de periodontite em ratos contribui para a superprodução de H₂S, o que pode nos indicar a ocorrência de interação entre H₂S e NO.

Apesar de não termos base científica para extrapolar diretamente esses achados para a periodontite humana, este estudo certamente traz informações úteis ao periodontista clínico, enfatizando a importância da manutenção da saúde periodontal, principalmente, quando se lida com pacientes com riscos cardiovasculares.

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 periodontitis. *J Periodontol* 1997; 68: 832–838.
- 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.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307(5717):1915-20.
- Bartesaghi S, Herrera D, Martinez DM, Petruk A, Demicheli V, Trujillo M, Martí MA, Estrín DA, Radi R. Tyrosine oxidation and nitration in transmembrane peptides is connected to lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. 2017;622:9-25.
- Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*. 1996; 67(10): 1123-37.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1620-4.
- Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2017;135(10):e146-e603. Review. Erratum in: *Circulation*. 2017;135(10):e646. *Circulation*. 2017;136(10):e196.
- 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;368(6474): 850-3.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [Cited 2016 May 30]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bose R, Sutherland GR, Pinsky C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. *Neurochem Res.* 1989;14(3):217-20.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

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

Bratthall D, Petersen PE, Stjernswärd JR, Brown LJ. Oral and Craniofacial Diseases and Disorders. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. 2nd edition. Washington (DC): World Bank; 2006.

Braugher 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, Velloso 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.

Brun A, Rangé H, Prouvost B, Meilhac O, Mazighi M, Amarenco P, Lesèche G, Bouchard P, Michel JB. Intraplaque hemorrhage, a potential consequence of periodontal bacteria gathering in human carotid atherothrombosis. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 2016; 53(1): e11

Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Zaid A, Giannogonas P, Cantalupo A, Dhayade S, Karalis KP, Wang R, Feil R, Cirino G. cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PLoS One.* 2012; 7(12): e53319.

Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins.* 1976;12(6):897-913.

Campi P, Herrera BS, de Jesus FN, Napolitano M, Teixeira SA, Maia-Dantas A, Spolidorio LC, Akamine EH, Mayer MP, de Carvalho MH, Costa SK, Muscara MN. Endothelial dysfunction in rats with ligature -induced periodontitis: Participation of nitric oxide and cyclooxygenase-2-derived products. *Arch Oral Biol.* 2016; 63:66-74.

Carballal S, Cuevasanta E, Yadav PK, Gherasim C, Ballou DP, Alvarez B, Banerjee R. Kinetics of Nitrite Reduction and Peroxynitrite Formation by Ferrous Heme in Human Cystathionine β -Synthase. *J Biol Chem.* 2016; 291(15):8004-13.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 1985; 113: 484-90.

Caton G J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, S Kornman K, L Mealey B, Papapanou PN, Sanz M, S Tonetti M. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018; 89 (1): S1-S8. doi: 10.1002/JPER.18-0157.

Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, Geisinger ML, Genco RJ, Glogauer M, Goldstein M, Griffin TJ, Holmstrup P, Johnson GK, Kapila Y, Lang NP, Meyle J, Murakami S, Plemons J, Romito GA, Shapira L, Tatakis DN, Teughels W, Trombelli L, Walter C, Wimmer G, Xenoudi P, Yoshie H. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89 (1): S74-S84. doi: 10.1002/JPER.17-0719.

Cheeseman KH, Beavis A, Esterbauer H. Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. *Biochem. J.* 1988; 252: 649-653.

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.

Chester M, Seedorf G, Tourneux P, Gien J, Tseng N, Grover T, Wright J, Stasch JP, Abman SH. Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, augments cGMP after oxidative stress and causes pulmonary vasodilation in neonatal pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011;301(5):L755-64.

Chiesa JJ, Baidanoff FM, Golombek DA. Don't just say no: Differential pathways and pharmacological responses to diverse nitric oxide donors. *Biochem Pharmacol.* 2018; 156:1-9. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.002.

Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, Banerjee R. H₂S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem.* 2009;284(17):11601-12.

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

Cokkinis AJ. Observations on the Mesenteric Circulation. *J Anat.* 1930;64(2):200-5.

Conti M, Morand PC, Levillain P, Lemonnier A. Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clin Chem.* 1991;37(7):1273-5.

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.

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.

Dorman DC, Moulin FJ, McManus BE, Mahle KC, James RA, Struve MF. Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicol Sci.* 2002; 65(1):18-25.

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.

Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med.* 1993;15(4):353-63.

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(2): H1174-83.

Dukan S, Belkin S, Touati D. Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. *Arch Biochem Biophys.* 1999;367(2):311-6.

Dusting GJ, Moncada S, Vane JR. Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins.* 1977;13(1):3-15.

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.

Evgenov OV, Pacher P, Schmidt PM, Haskó G, Schmidt HH, Stasch JP. NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: Discovery and therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(9): 755-68.

Fan H, Gulley M. *Methods in Molecular Medicine. Molecular Pathology Protocols.* Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2001. Vol. 49.

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(a).

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

Fernhoff NB, Derbyshire ER, Marletta MA. A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(51):21602-7. doi: 10.1073/pnas.0911083106.

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.

Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology.* 2006;131(1):259-71.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984;105:114-21.

Forbang NI, McDermott MM, Liao Y, Ix JH, Allison MA, Liu K, Tian L, Evans N, Criqui MH. Associations of diabetes mellitus and other cardiovascular disease risk factors with decline in the ankle-brachial index. *Vasc Med.* 2014;19(6):465-72. doi: 10.1177/1358863X14554033.

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

Fritz BG, Hu X, Brailey JL, Berry RE, Walker FA, Montfort WR. Oxidation and loss of heme in soluble guanylyl cyclase from *Manduca sexta*. *Biochemistry.* 2011;50(26):5813-5.

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.

Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006;312(5778):1355-9.

Griffith OW. Mammalian sulfur amino acid metabolism: an overview. *Methods Enzymol.* 1987;143:366-76.

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

Gryglewski R, Vane JR. Rabbit-aorta contracting substance (RCS) may be a prostaglandin precursor. *Br J Pharmacol.* 1971;43(2):420P-421P.

Gupta S, Sodhi S, Mahajan V. Correlation of antioxidants with lipid peroxidation and lipid profile in patients suffering from coronary artery disease. *Expert Opin Ther Target.* 2009; 13: 889-894.

Gur S, Kadowitz PJ, Hellstrom WJ. Exploring the potential of NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase for the medical treatment of erectile dysfunction. *Curr Pharm Des.* 2010;16(14):1619-33.

Gupta S, Sodhi S, Mahajan V. Correlation of antioxidants with lipid peroxidation and lipid profile in patients suffering from coronary artery disease. *Expert Opin Ther Targets.* 2009 ;13(8):889-94.

Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899:136-47

Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;105(14):1656-62.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-9.

Hadadha M, Vakili A, Bandegi AR. Effect of the Inhibition of Hydrogen Sulfide Synthesis on Ischemic Injury and Oxidative Stress Biomarkers in a Transient Model of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2015;24(12):2676-84. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.07.020.

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

Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994;102 (10):5-12.

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

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

Henry Y, Banerjee R. Electron paramagnetic studies of nitric oxide haemoglobin derivatives: isolated subunits and nitric oxide hybrids. *J Mol Biol.* 1973;73(4):469-82.

Henry, YA, Ducastel B, Guissani, A (1997) Enzymatic targets of nitric oxide as detected by EPR spectroscopy within mammal cells. In *Nitric oxide Research from Chemistry to Biology: EPR Spectroscopy of Nitrosylated Compounds*, edited by Yan A. Henry, Annie Guissani and Béatrice Ducastel. R. G. Landes Company, pp. 205-233.

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).

Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(2):150-66.

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.

Hine C, Harputlugil E, Zhang Y, Ruckenstein C, Lee BC, Brace L, Longchamp A, Treviño-Villarreal JH, Mejia P, Ozaki CK, Wang R, Gladyshev VN, Madeo F, Mair WB, Mitchell JR. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell.* 2015 Jan 15;160(1-2):132-44.

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.

Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;237(3):527-31.

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, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9265-9.

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.

Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension.* 2000; 35(1Pt2): 173-8. 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.

Khan AA, Schuler MM, Prior MG, Yong S, Coppock RW, Florence LZ, Lillie LE. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990;103(3):482-90.

Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem.* 1999; 274(20):13908-14.

Kimura H. Metabolic turnover of hydrogen sulfide. *Front Physiol.* 2012;3:101.

Klebanoff SJ. Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *J Biol Chem.* 1974;249(12):3724-8.

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.

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

Laccini, S.; Irigoyen, M.c. Estrutura e função do sistema cardiovascular. In: Aires, M. M. *Fisiologia*. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 2008, p. 377 – 384

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.

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.

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;105(7):861-7. Erratum in: *Circulation* 2002; 105(13): 1617.

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.

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): 2106-15.

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.

Maron BA, Zhang YY, Handy DE, Beuve A, Tang SS, Loscalzo J, Leopold JA. Aldosterone increases oxidant stress to impair guanylyl cyclase activity by cysteinyl thiol oxidation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2009;284(12):7665-72. doi: 10.1074/jbc.M809460200.

Martin-Cabezas R, Seelam N, Petit C, Agossa K, Gaertner S, Tenenbaum H, Davideau JL, Huck O. Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Am Heart J*. 2016;180:98-112. doi:10.1016/j.ahj.2016.07.018.

Martin GR, McKnight GW, Dickey MS, Coffin CS, Ferraz JG, Wallace JL. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Dig Liver Dis*. 2010;42(2):103-9. doi: 10.1016/j.dld.2009.05.016.

McCord JM. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*. 1974;185(4150):529-31.

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 Periodontol Res*. 2014; 49(1): 85-92.

Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 1976;263(5579):663-5.

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

Mülsch A, Busse R, Bassenge E. Desensitization of guanylate cyclase in nitrate tolerance does not impair endothelium-dependent responses. *Eur J Pharmacol*. 1988;158(3):191-8.

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.

Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 2006;40:11-28.

Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. 1999;79(4):1193-226.

Nemec A, Verstraete FJ, Jerin A, Šentjurs M, Kass PH, Petelin M, Pavlica Z. Periodontal disease, periodontal treatment and systemic nitric oxide in dogs. *ResVet Sci*. 2013;94(3):542-4.

Neves AL, Couto L. Cardiovascular risk in overweight/obese and lean hypertensive patients. *Rev Port Cardiol*. 2014;33(4):223-8. doi: 10.1016/j.repc.2013.10.016.

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(8): 1135-40.

Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 2004;59(1):117-25.

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

Olson KR, Deleon ER, Gao Y, Hurley K, Sadauskas V, Batz C, Stoy GF. Thiosulfate: a readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305(6):R592-603. doi: 10.1152/ajpregu.00421.2012.

Organização Mundial da Saúde (OMS). Administração da OMS. Disponível em: <[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 16. Out.2018.

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.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kebschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S173-S182. doi: 10.1002/JPER.17-0721.

Paster, B. J., S. K. Boches, J. L. Galvin, R. E. Ericson, C. N. Lau, V. A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F. E. Dewhirst. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol*. 183:3770–3783.

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.

Perkins WJ, Taniguchi M, Warner DO, Chini EN, Jones KA. Reduction in soluble guanylyl cyclase-specific activity following prolonged treatment of porcine pulmonary artery with nitric oxide. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(1):L84-95.

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

Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 1990;5(4):195-201.

Petersen J, Glaß EM, Nasser 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*. 2014;18(7):1813-23. doi:10.1007/s00784-013-1156-3.

Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*. 2012;60(1):15-39. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x.

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.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991;288(2):481-7.

Rangé H, Labreuche J, Louedec L, Rondeau P, Planesse C, Sebbag U, Bourdon E, Michel JB, Bouchard P, Meilhac O. Periodontal bacteria in human carotid atherothrombosis as a potential trigger for neutrophil activation. *Atherosclerosis*. 2014; 236(2): 448-55.

Rhodin, J A G. Architecture of the vessel wall. In: Berne, RM et al. *Handbook of physiology: The cardiovascular system. Vascular smooth muscle*. Bethesda, Md.: Am. Physiological Society, 1980. Sect. 2, v. 2, chapt. 1, p.01-31.

Ribeiro JM, Hazzard JM, Nussenzveig RH, Champagne DE, Walker FA. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science*. 1993; 260(5107):539-41.

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

Rose P, Moore PK, Zhu YZ. H(2)S biosynthesis and catabolism: new insights from molecular studies. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(8):1391-1412.

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.

Sayed N, Baskaran P, Ma X, van den Akker F, Beuve A. Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(30):12312-7.

Salinovich O, Montelaro RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1986;156(2):341-7.

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 May;41(5):442-50. doi: 10.1111/jcpe.12234.

Sartore S, Chiavegato A, Faggin E, Franch R, Puato M, Ausoni S, Pauletto P. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res*. 2001;89(12):1111-21.

Schmidt HH, Schmidt PM, Stasch JP. NO- and haem-independent soluble guanylate cyclase activators. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(191):309-39. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_14.

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. Searcy DG, Lee SH. Sulfur reduction by human erythrocytes. *J Exp Zool*. 1998;282(3):310-22.

Shefa U, Kim MS, Jeong NY, Jung J. Antioxidant and Cell-Signaling Functions of Hydrogen Sulfide in the Central Nervous System. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1873962. doi: 10.1155/2018/1873962.

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem.* 2009b;146(5):623-6.

Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal.* 2009a;11(4):703-14.

Siegel G, Schnalke F, Stock G, Grote J. Prostacyclin, endothelium-derived relaxing factor and vasodilatation. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 1989;19:267-70.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(9-10):916-21.

Sips PY, Buys ES. Genetic modification of hypertension by sGC α 1. *Trends Cardiovasc Med.* 2013; 23(8): 312-8.

Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol.* 1992;263(2-2):F181-91.

Smith RP, Gosselin RE. Hydrogen sulfide poisoning. *J Occup Med.* 1979;21(2):93-7.

Soares FF, Freire MCM, Reis SCGB. The 2010 Brazilian Oral Health Survey (SBBrasil 2010 Project): what do the coordinators propose for future surveys? *Interface (Botucatu).* 2018; 22(64):981-9.

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.

Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens A.* 1991;13(2):277-96.

Spickett CM. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis. *Redox Biol.* 2013;1:145-52. doi: 10.1016/j.redox.2013.01.007.

Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H S AK, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Müller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Müller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest.* 2006;116(9):2552-61.

Stasch JP, Hobbs AJ. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(191):277-308.

Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, Nedvetskaya TY, H S AK, Meurer S, Deile M, Taye A, Knorr A, Lapp H, Müller H, Turgay Y, Rothkegel C, Tersteegen A, Kemp-Harper B, Müller-Esterl W, Schmidt HH. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest.* 2006;116(9):2552-61.

Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. 2006. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology* 21:134–45.

Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, Riddle SR, Frid MG. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:23-47. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183802.

Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J*. 1982;206(2):267-77.

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.

Tare M, Parkington HC, Coleman HA, Neild TO, Dusting GJ. Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium. *Nature*. 1990;346(6279):69-71.

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.

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, Van Dyke TE; working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*. 2013;84(4):S24-9. doi: 10.1902/jop.2013.1340019.

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.

Tsioufis C, Kasiakogias A, Thomopoulos C, et al. Periodontitis and blood pressure: the concept of dental hypertension. *Atherosclerosis* 2011;219:1-9.

Ukeda H, Hasegawa Y, Ishi T, Sawamura M. Inactivation of Cu, Zn-superoxide dismutase by intermediates of Maillard reaction and glycolytic pathway and some sugars. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997; 61(12):2039-42.

Vacek TP, Gillespie W, Tyagi N, Vacek JC, Tyagi SC. Hydrogen sulfide protects against vascular remodeling from endothelial damage. *Amino Acids*. 2010;39(5):1161-9. doi: 10.1007/s00726-010-0550-2.

Vane J, Botting R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB J*. 1987;1(2):89-96.

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

Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. *Pharmacol Res*. 2004; 49(6): 503-8.

Waypa GB, Marks JD, Guzy R, Mungai PT, Schriewer J, Dokic D, Schumacker PT. Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 2010;106(3):526-35. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.206334.

Waldman SA, Rapoport RM, Ginsburg R, Murad F. Desensitization to nitroglycerin in vascular smooth muscle from rat and human. *Biochem Pharmacol*. 1986 ;35(20):3525-31.

Wang G, Li W, Chen Q, Jiang Y, Lu X, Zhao X. Hydrogen sulfide accelerates wound healing in diabetic rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(5):5097-104.

Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J*. 2002;16(13):1792-8.

Warner TD. Simultaneous perfusion of rat isolated superior mesenteric arterial and venous beds: comparison of their vasoconstrictor and vasodilator responses to agonists. *Br J Pharmacol*. 1990; 99(2): 427-33.

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.

Whitfield NL, Kreimier EL, Verdial FC, Skovgaard N, Olson KR. Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;294(6):R1930-7. doi: 10.1152/ajpregu.00025.2008.

Wong P, Qu K, Chimon GH, et al. High plasma cyst(e)ine level may indicate poor clinical outcome in patients with acute stroke: possible involvement of hydrogen sulfide. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:109-115.

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.

Wu GD, Lewis JD. Analysis of the human gut microbiome and association with disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(7):774-7. doi: 10.1016/j.cgh.2013.03.038.

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.

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008;322(5901):587-90.

Yetik-Anacak G, Dikmen A, Coletta C, Mitidieri E, Dereli M, Donnarumma E, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Sorrentino R. Hydrogen sulfide compensates nitric oxide deficiency in murine corpus cavernosum. *Pharmacol Res*. 2016; 113(PtA):38-43.

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 H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001;20(21):6008-16.

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 Nov 27;51(47):9593.

Zhou Z, Martin E, Sharina I, Esposito I, Szabo C, Bucci M, Cirino G, Papapetropoulos A. Regulation of soluble guanylyl cyclase redox state by hydrogen sulfide. *Pharmacol Res*. 2016;111:556-562.