



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia**

GRAZIELE CRISTINA FERREIRA

**Alterações induzidas pelo uso de clorexidina sobre
os efeitos vasculares e anti-hipertensivos da
atorvastatina em ratos hipertensos**

Ribeirão Preto - SP

2022

GRAZIELE CRISTINA FERREIRA

**Alterações induzidas pelo uso de clorexidina sobre
os efeitos vasculares e anti-hipertensivos da
atorvastatina em ratos hipertensos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos
Santos

Coorientador: Gustavo Henrique Oliveira de Paula

Ribeirão Preto - SP

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Grazielle Cristina

Alterações induzidas pelo uso de clorexidina sobre os efeitos vasculares e anti-hipertensivos da atorvastatina em ratos hipertensos. Grazielle Cristina Ferreira; Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos. Coorientador: Gustavo Henrique Oliveira de Paula Ribeirão Preto, 2022. 82f.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Atorvastatina. 2. Clorexidina
3. Estresse oxidativo 4. Hipertensão

Àqueles que são meu porto seguro,
minha base e meus maiores
incentivadores, meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar o dom da vida e por ser a luz a me guiar em todos os momentos.

Aos meus pais, Elias e Lúcia, que não mediram esforços para que eu tivesse uma boa formação e me ensinaram desde cedo que o estudo é primordial. Obrigada por todo amor incondicional e por serem os meus melhores ouvintes sempre. Também aos meus irmãos, Gabriela, Gabriel, Elisângela e Ivanildo por serem o meu lar, por me ajudarem a aprender a dividir e mais ainda a somar na vida das pessoas. Aos meus sobrinhos, Lucas, Miguel e Arthur por trazerem mais amor e vida ao meu dia a dia. À minha amada avó Olga, que mesmo depois de partir se faz tão presente em mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Eduardo Tanus dos Santos que deu todo o suporte para que este trabalho fosse realizado. Minha admiração e gratidão por todos esses anos me orientando são imensas.

Ao meu coorientador Gustavo por ser esse profissional admirável, cheio de talento e que sempre foi a minha referência no meio acadêmico. Obrigada também pela amizade, amor, carinho e cuidado comigo. Minha gratidão é eterna.

Aos amigos que o laboratório me deu, Rose, Renato, Jéssica, Carla e Indiara, por terem sido a luz e a cor durante minha pós graduação. Agradeço especialmente a Rose, que foi a minha principal colaboradora, me ajudou a desenvolver esse trabalho, e sempre esteve disposta a me auxiliar em todas as fases deste projeto e também na vida pessoal.

À Sandra por todo apoio técnico e psicológico dedicados a mim em todos esses anos. Agradeço também pela amizade, carinho e pela incrível risada que sempre deixou o ambiente mais leve. A parceria no laboratório e na vida continua.

Aos meus colaboradores diretos, por toda a ajuda, disponibilidade e competência em todas as fases deste trabalho. Agradeço a dedicação e paciência com todas as minhas exigências.

Aos amigos do laboratório, tanto os que ainda estão, quanto os que passaram. São 12 anos de casa, e posso dizer que cada um deixou sua marca nesta jornada que se encerra aqui. Obrigada pela ótima convivência e por tornarem o trabalho mais prazeroso.

Aos professores, funcionários e colegas de todo o departamento de Farmacologia, em especial ao Ramon e a Gislaine por serem tão atenciosos e prestativos.

À amizade, receptividade e suporte do Airton, Gustavo, Dani, Aline, Bárbara e todas as pessoas que conheci em NY. Agradeço por terem feito parte de uma das histórias mais bonitas que vivi.

Aos amigos de infância, da faculdade, de república, por serem a parte mais bonita da minha vida. Vocês estão nas minhas memórias mais lindas e também nas minhas difíceis. Todas as minhas conquistas foram e ainda serão comemoradas com vocês.

Ao meu amigo, noivo, marido, Braulio, pela parceria. Tenho muito orgulho de tudo que já conquistamos juntos e pela bela história que escolhemos escrever juntos.

Ao CNPq, Capes e FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

FERREIRA, G.C. **Alterações induzidas pelo uso de clorexidina sobre os efeitos vasculares e anti-hipertensivos da atorvastatina em ratos hipertensos**. 2022. N^o de folhas: 82f. Tese - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Introdução: A hipertensão arterial (HA) é uma doença multifatorial e está intimamente associada ao aumento do risco de doenças cardiovasculares. As estatinas são agentes hipolipemiantes que possuem efeitos pleiotrópicos importantes como a redução da pressão arterial, do estresse oxidativo e aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO). O NO possui papel importante na homeostase cardiovascular, regulando o tônus vascular, o fluxo sanguíneo regional e a pressão arterial. Atualmente sabemos que os metabólitos do NO (nitrito, nitrato e nitrosotiois) também possuem papéis fisiológicos e cardiovasculares relevantes e que a manutenção de suas concentrações se dá através do ciclo êntero-salivar. Uma das etapas cruciais deste ciclo é a conversão do nitrato a nitrito através de bactérias da cavidade oral. Levando em consideração que o uso de enxaguante bucal compromete essa etapa, a hipótese do nosso trabalho é que a clorexidina reverta os efeitos anti-hipertensivos e vasculares ocasionados pela atorvastatina em ratos hipertensos 2R1C. **Métodos:** Foram utilizados ratos Sham e hipertensos 2R1C tratados com Atorvastatina (50mg via oral) e/ou Clorexidina aplicada com o auxílio de um swab. O tratamento foi realizado por 4 semanas, sendo a pressão arterial aferida por pletismografia de cauda. Ao final do protocolo, foi medida a quantidade de bactérias da cavidade oral por unidades formadoras de colônia. Após isso, os animais foram eutanasiados para a realização da reatividade vascular e coleta de aorta (para a medida de nitrato, nitrito e estresse oxidativo pelos métodos da lucigenina e DHE), plasma (para a medida de nitrato, nitrito e RXNO e estresse oxidativo pelos métodos de TBARS e atividade da XOR) e fígado (para a medida de nitrato, nitrito e RXNO e estresse oxidativo pelo método de TBARS). **Resultados:** Como resultados, obtivemos uma diminuição da contagem de bactérias diante da utilização de Clorexidina. O tratamento com atorvastatina foi capaz de reduzir a pressão arterial de animais hipertensos 2R1C, além de melhorar o efeito máximo da resposta de relaxamento à acetilcolina, sendo ambos os efeitos revertidos pelo tratamento concomitante com enxaguante bucal. No que se refere aos metabólitos do NO, a atorvastatina foi capaz de aumentar as concentrações de nitrito no fígado e de nitrato na aorta, sendo a clorexidina capaz de abolir estes efeitos. O enxaguante bucal também reverteu os efeitos da atorvastatina no sentido de diminuir a produção de superóxido dependente da NADPH oxidase na aorta, além de ter aumentado a peroxidação lipídica no plasma de animais hipertensos. **Conclusão:** É possível sugerir que os efeitos anti-hipertensivos da atorvastatina se devam, pelo menos em parte, a sua capacidade de aumentar a disponibilidade de NO, já que todos os efeitos benéficos foram abolidos pela utilização concomitante com o enxaguante bucal clorexidina. Nesse sentido, a manutenção do

ciclo entero salivar do nitrato e sustentação da via nitrato-nitrito-NO são cruciais para que a atorvastatina exerça seus efeitos na hipertensão arterial.

Palavras-chave: Atorvastatina, Enxaguante bucal, hipertensão, ciclo enterosalivar do nitrato.

ABSTRACT

FERREIRA, G.C. **Changes induced by the use of chlorhexidine on the vascular and antihypertensive effects of atorvastatin in hypertensive rats. 2022.** Number of sheetsç 82f. Thesis - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Introduction: Hypertension is associated with high risk of cardiovascular diseases. Statins are lipid-lowering agents that have important pleiotropic effects such as blood pressure reduction, reducing oxidative stress and causing nitric oxide (NO) increasement. NO plays an important role in cardiovascular homeostasis, regulating vascular tone, blood flow and blood pressure. We currently know that NO metabolites (nitrite, nitrate and nitrosothiols) also have physiological and cardiovascular relevance and their concentrations are sustained through the entero-salivary cycle. A crucial step in this cycle is the conversion of nitrate to nitrite by oral bacteria and the use of mouthwash can block this step. Then, the hypothesis of our work is that chlorhexidine could block the antihypertensive and vascular effects caused by atorvastatin in 2K1C hypertensive rats. **Methods:** Sham and 2K1C hypertensive rats were treated with Atorvastatin (50mg orally) and/or chlorhexidine applied in the mouth using a swab. The animals were treated for 4 weeks, and blood pressure was measured by tail plethysmography. At the end of the protocol, the amount of oral bacteria were counted by colony forming units. Then, animals were euthanized for vascular reactivity experiments, and the tissues aorta, plasma and liver were collected (for nitrate, nitrite and oxidative stress measurement). **Results:** We observed a decrease in the amount of oral bacteria with the use of mouthwash. The treatment with Atorvastatin was able to decrease the blood pressure in 2K1C hypertensive rats and also caused an improvement in the maximum effect of the relaxation to acetylcholine, both effects were reversed by treatment with mouthwash. Atorvastatin was also able to increase the concentrations of nitrite in the liver and of nitrate in the aorta, and chlorhexidine was able to abolish these effects. Mouthwash also reversed the effects of atorvastatin in decreasing NADPH oxidase-dependent superoxide production in the aorta, in addition to increase lipid peroxidation in the plasma of hypertensive animals. **Conclusion:** It is possible to suggest that the antihypertensive effects of atorvastatin are due to its ability to increase the availability of NO, since all beneficial effects were abolished by concomitant use with chlorhexidine mouthwash. Then, the enterosalivary cycle of nitrate and the nitrate-nitrite-NO pathway are crucial for the antihypertensive effects of atorvastatin.

Keywords: Atorvastatin, Mouthwash, hypertension, enterosalivary cycle of nitrate

Lista de abreviaturas

- HAS-** hipertensão arterial sistêmica
- DCV-** doenças cardiovasculares
- PA-** pressão arterial
- NO-** óxido nítrico
- NOS-** óxido nítrico sintases
- eNOS-** sintase endotelial do óxido nítrico
- iNOS-** sintase induzida do óxido nítrico
- nNOS-** sintase neuronal do óxido nítrico
- NADPH-** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
- NRF 2-** fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
- FAD-** dinucleótido de flavina e adenina
- FMN-** monucleótido de flavina
- BH4-** tetraidrobiopterina
- CMLVs-** células musculares lisas vasculares
- CAT-** catalase
- GC-** Guanilil ciclase
- GTP-** guanosina trifosfato
- GMPc-** monofosfato de guanosina 3`5`cíclico
- GPX-** glutathione peroxidase
- PKG-** proteína quinase G
- K_{Ca}-** canais de potássio dependentes de cálcio
- SERCA-** SR Ca-ATPase
- SOD1-** superóxido dismutase-1
- IP3-** Inositol 1,4,5-trifosfato
- MLCP-** fosfatase da cadeia leve de miosina

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo

XOR- xantina oxidoreductase

ONOO⁻- peroxinitrito

ADMA- dimetilarginina assimétrica

NO₃⁻- nitrato

NO₂⁻- nitrito

ATP- adenosina-5'-trifosfato

HNO₂- ácido nitroso

N₂O₃- anidrido nitroso

CHX- clorexidina

HMG-CoA- 3-hidroxi-3-metil-glutarilcoenzima A

LDL-C- lipoproteína de baixa densidade

HDL- lipoproteína de alta densidade

AVC- acidente vascular cerebral

2R1C- 2 rins 1 clipe

MMP-2- metaloproteinase de matriz 2

TGF-β- fator de transformação do crescimento beta

TBA- ácido tiobarbitúrico

TRDX-1- tioredoxina-1

TRDX-2- tioredoxina-2

SDS- dodecil sulfato de sódio

MDA- malondialdeído

DHE- sonda dihidroetidina

Lista de Figuras

Figura 1. NOS nas formas acoplada e desacoplada..	22
Figura 2: Via clássica e via dependente de nitrato e nitrito para a produção de NO	25
Figura 3: Grupos experimentais do protocolo.....	37
Figura 4: Linha do tempo Protocolo Experimental.....	38
Figura 5: Contagem de bactérias por Unidades formadoras de Colônia (UFC) coletadas 2 horas após o tratamento com enxaguante bucal..	45
Figura 6: Pressão arterial sistólica dos animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal aferida pelo método de pletismografia de cauda.	46
Figura 7: Peso, em gramas, dos animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal.	47
Figura 8: Curvas da função vascular medida pelo relaxamento à Acetilcolina em aortas de animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal pré-contraídas com Felilefrina.	48
Figura 9: Potência e efeito máximo de relaxamento à Acetilcolina em ratos Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal	49
Figura 10: Medidas de metabólitos do NO no plasma de animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtidos pelo método de quimiluminescência através do ozônio.....	51
Figura 11: Medidas de metabólitos do NO na aorta de animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtidos pelo método de quimiluminescência através do ozônio.....	52
Figura 12: Medidas de metabólitos do NO no fígado de animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtidos pelo método de quimiluminescência através do ozônio.....	53
Figura 13: Estresse oxidativo no plasma de animais tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtido pelo método colorimétrico de detecção de produtos da peroxidação lipídica que são reativos ao ácido TBA e pela atividade da enzima XOR	55
Figura 14: Estresse oxidativo na aorta de animais tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtido pelo método de quimiluminescência da Lucigenina.	56

Figura 15: Estresse oxidativo na aorta de animais tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtido pela medida de superóxido através da fluorescência do DHE.....	57
Figura 16: Estresse oxidativo no fígado de animais tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtido pelo método colorimétrico de detecção de produtos da peroxidação lipídica que são reativos ao ácido TBA	58

Sumário

1. Introdução	17
1.1. Hipertensão: Definição e causas	17
1.2. Óxido nítrico: Descoberta, produção e papel na homeostase vascular	17
1.3. Disfunção endotelial na hipertensão	20
1.4. Via nitrato-nitrito-NO	22
1.5. Microbiota oral e formação de NO	25
1.6. Enxaguante bucal e formação de NO	26
1.7. Mecanismo de ação da atorvastatina	27
1.8. Efeitos pleiotrópicos da atorvastatina.....	29
2. Hipótese.....	32
3. Objetivos	34
3.1. Geral.....	34
3.2. Específicos.....	34
4. Metodologia.....	36
4.1. Animais	36
4.2. Abordagem experimental I- Avaliação dos efeitos cardiovasculares da administração oral de atorvastatina com ou sem utilização concomitante de enxaguante bucal	36
4.2.1. Avaliação da pressão arterial sistólica e peso corporal.....	37
4.2.2. Contagem bacteriana	38
4.2.3. Eutanásia e coleta de tecidos	38
4.2.4. Reatividade de aorta.....	38
4.3. Abordagem experimental II- Avaliação dos efeitos da administração oral de atorvastatina com ou sem utilização concomitante de enxaguante bucal nos metabólitos de NO e no estresse oxidativo.	40
4.3.1. Determinação das concentrações de nitrato no plasma, na aorta e no fígado	40
4.3.2. Determinação das concentrações de nitrito no plasma, na aorta e no fígado e de nitrosotiois no plasma e no fígado.....	40
4.3.3. Avaliação do TBARS no plasma e no fígado	41
4.3.4. Avaliação da atividade da Xantina oxidoreductase no plasma.....	41
4.3.5. Avaliação da quimioluminescência da Lucigenina na aorta	42
4.3.6. Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROS) <i>in situ</i> na aorta.	42
4.4. Análise estatística.....	42

5. Resultados	45
5.1. Abordagem Experimental I: Avaliação dos efeitos cardiovasculares da administração oral de atorvastatina com ou sem utilização concomitante de enxaguante bucal.....	45
5.2. Abordagem experimental II- Avaliação dos efeitos da administração oral de atorvastatina com ou sem utilização concomitante de enxaguante bucal nos metabólitos de NO e no estresse oxidativo.....	50
6. Discussão.....	60
7. Conclusão	70
8. Referências	72

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Hipertensão: Definição e causas

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) continua sendo o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), sendo que estas correspondem a 17 milhões de mortes por ano, quase um terço do total de mortes no mundo. (REAMY; WILLIAMS; KUCKEL, 2018). A hipertensão é definida como a elevação sustentada da pressão arterial em valores maiores ou iguais a 140 mmHg para a pressão sistólica e/ ou maiores ou iguais a 90 mmHg para a pressão diastólica e contribui direta ou indiretamente com 50% das mortes ocasionadas pelas DCVs (ATIK *et al.*, 2018; WHELTON *et al.*, 2018).

A HAS é considerada uma situação patológica multifatorial. Suas causas ainda não foram bem estabelecidas, porém acredita-se na influência de alguns fatores de risco, incluindo anormalidades lipídicas, tabagismo, sedentarismo, alta ingestão de sódio, entre outros (FUCHS; WHELTON, 2020). No que diz respeito ao tratamento da hipertensão, apesar de já existirem diversas classes de fármacos, aproximadamente 9-18% dos pacientes atendem aos critérios de diagnóstico de hipertensão resistente (DOROSZKO *et al.*, 2016). Nesse sentido, é preocupante que mesmo com o uso concomitante de mais de um medicamento, é comum que não seja atingido o controle da pressão arterial (PA) recomendado pelas diretrizes (AL GHORANI *et al.*, 2022).

1.2. Óxido nítrico: Descoberta, produção e papel na homeostase vascular

O óxido nítrico (NO) permaneceu muitos anos com seu papel fisiológico desconhecido, até finalmente ser reconhecido como uma molécula imprescindível em vários processos fisiológicos, rendendo um Prêmio Nobel da Fisiologia e

Medicina, em 1998, aos pesquisadores envolvidos em sua descoberta: Furchgott, Ignarro e Murad (FURCHGOTT, Robert F; ZAWADZKI, 1980; IGNARRO *et al.*, 1987). Atualmente, é sabido que o NO desempenha papel crucial em processos fisiológicos no coração e nos vasos sanguíneos, na neurotransmissão, entre outros (BONDONNO; CROFT; HODGSON, 2016).

Nos mamíferos, a via canônica ou clássica para a produção de óxido nítrico se dá nas células endoteliais, com a participação das enzimas dependentes do complexo cálcio-calmodulina, as óxido nítrico sintases (NOS) (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988). Já foram identificados 3 isoformas de NOS, a endotelial (eNOS), a induzida (iNOS) e a neuronal (nNOS), sendo a isoforma endotelial a que desempenha papel mais importante no sistema cardiovascular (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). A forma dimérica da enzima, constituída de dois monômeros idênticos, consiste na sua forma ativa, sendo estes monômeros associados a duas calmodulinas e divididos em dois domínios, o domínio redutase C-terminal e o domínio oxigenase N-terminal (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012).

Todas as isoformas de NOS utilizam a L-arginina como principal substrato e o oxigênio molecular e a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) como co-substratos. Além disso, também são utilizados os cofatores dinucleótido de flavina e adenina (FAD), monucleótido de flavina (FMN), tetraidrobiopterina (BH₄), heme e calmodulina. Em suma, a NOS catalisa a oxigenação dependente de NADPH e oxigênio da L-arginina, tendo como produtos o NO e a citrulina (IGNARRO, 1996).

A atividade da eNOS é regulada pela presença de cálcio na célula endotelial, que pode ter sua concentração aumentada pela ação de agonistas como a acetilcolina, a bradicinina e a histamina, além de estímulos físicos, como o estresse

de cisalhamento. É sabido que a geração de NO pelo endotélio vascular é essencial para a regulação da pressão e do fluxo sanguíneo (MONCADA, 1994; PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988). Por ser um gás, o NO formado nas células endoteliais, pode se difundir para as células musculares lisas vasculares (CMLVs), onde ativa a Guanilil ciclase (GC), possibilitando a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato de guanosina 3`5` cíclico (GMPC) (NESHER *et al.*, 2014)(TENOPOULOU; DOULIAS, 2020). O aumento da concentração intracelular deste segundo mensageiro é acompanhado de uma cascata de eventos de fosforilação, já que este se liga ao domínio regulatório da proteína quinase G (PKG), gerando uma alteração conformacional no sítio catalítico N-terminal desta proteína, levando à fosforilação de proteínas que atuam na homeostase do Ca^{2+} intracelular, como a Ca^{2+} -ATPase, o trocador Na^+/Ca^{2+} e os canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}), eventos que culminam na diminuição do Ca^{2+} intracelular e na vasodilatação (PARK; SANDNER; KRIEG, 2018).

Vários estudos demonstraram que existem vários efetores downstream da ligação cGMP-PKG no sistema cardiovascular. Dentre estes, foi proposto que a PKG fosforila a fosfolambam na serina 16, o que ativaria a SR Ca -ATPase (SERCA), aumentando a recaptação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, atenuando seus efeitos durante a sístole (FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010; PARK; SANDNER; KRIEG, 2018). Também é conhecido que a PKG pode fosforilar o substrato associado ao receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), inibindo este receptor e também a liberação de cálcio para o citoplasma (SELLAK *et al.*, 2013). A fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP) também pode ser alvo de fosforilação pela PKG, gerando diminuição na fosforilação da cadeia leve de miosina. É importante ressaltar que todos esses eventos culminam na diminuição

do Ca^{2+} intracelular e consequente vasodilatação (MÜNDEL *et al.*, 2003). Além de efeitos vasodilatadores, a via NO/GMPc tem outros efeitos benéficos, como a inibição da proliferação de CMLVs, redução da agregação plaquetária, apoptose e regulação gênica (LI *et al.*, 2003; MÜNDEL *et al.*, 2003).

1.3. Disfunção endotelial na hipertensão

O endotélio vascular forma o revestimento interno dos vasos sanguíneos e linfáticos e é essencial para o funcionamento normal do sistema vascular (GALLEY; WEBSTER, 2004). Desde sua descoberta, na década de 80, por Furchgott e Zawadzki, sua função tem sido amplamente estudada (FURCHGOTT, R F; ZAWADZKI, 1980). Atualmente, é sabido que este desempenha um importante papel na modulação do tônus vascular, já que é responsável pela liberação de diversos fatores relaxantes, tais como prostaglandinas, NO e fatores hiperpolarizantes (GODO; SHIMOKAWA, 2017). Em contrapartida, este também é responsável pela liberação de moléculas vasoconstritoras tais como endotelina e alguns prostanoides (VANHOUTTE *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo desempenha um importante papel na disfunção endotelial em situações patológicas como o diabetes, dislipidemia, hipertensão, entre outros (DHARMASHANKAR; WIDLANSKY, 2010; POTENZA *et al.*, 2009). O principal efector dos efeitos prejudiciais do estresse oxidativo é o ânion superóxido, que pode ser formado por diversas enzimas, tais como nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase, xantina oxidoreductase (XOR), além da eNOS desacoplada e de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (FÖRSTERMANN; SESSA, 2012; INCALZA *et al.*, 2018). A diminuição da biodisponibilidade de NO, resultado da diminuição da sua produção

e/ou aumento de sua degradação pelo ânion superóxido, marca o início da disfunção endotelial. Em suma, o NO reage com o ânion superóxido, produzindo peroxinitrito (ONOO^-), sendo que este promove nitração de proteínas, contribuindo para a disfunção e morte das células endoteliais (WOLIN *et al.*, 2010). Além disso, o ONOO^- também pode levar à oxidação do cofator BH_4 gerando uma mudança conformacional da forma dimérica para a forma monomérica (desacoplada) da eNOS, que ao invés de produzir NO, leva a produção de superóxido (LUNDBERG, J. O.N. *et al.*, 1994).

O aumento na produção de dimetilarginina assimétrica (ADMA) também é um fator que contribui para a disfunção endotelial observada em doenças como a hipertensão (LANDIM; CASELLA FILHO; CHAGAS, 2009). O ADMA é sintetizado quando os resíduos de arginina nas proteínas nucleares são metilados pela ação da proteína arginina metiltransferase, proteínas amplamente distribuídas no corpo humano (WADA; INOUE; HAGIWARA, 2002). Este possui uma estrutura análoga a L-arginina, sendo considerado o inibidor endógeno das 3 isoformas da NOS, já que este compete com a L-arginina pela enzima. Além disso, ele também pode levar ao desacoplamento da enzima e ao aumento na geração de superóxido (LIU *et al.*, 2018).

Outro fator que pode contribuir para a disfunção endotelial é a diminuição da biodisponibilidade da L-arginina, já que esta é o único substrato para a produção de NO (MOSS *et al.*, 2004). Apesar de, em situações normais, a concentração endógena de L-arginina intracelular já ser bem acima da necessária para a produção de NO (BODE-BOGER; SCALERA; IGNARRO, 2007), um estudo mostrou que o influxo de L-arginina para a célula endotelial está prejudicado em pacientes hipertensos (PERTICONE *et al.*, 2005), indicando que a suplementação

com L-arginina poderia ser uma alternativa terapêutica em doenças como a hipertensão arterial (BATISTA *et al.*, 2021).

Em suma, a disfunção endotelial se dá pelo desbalanço da produção de substâncias vasoativas, com um predomínio da produção de substâncias vasoconstritoras em detrimento da produção de substâncias vasodilatadoras, em especial o NO.

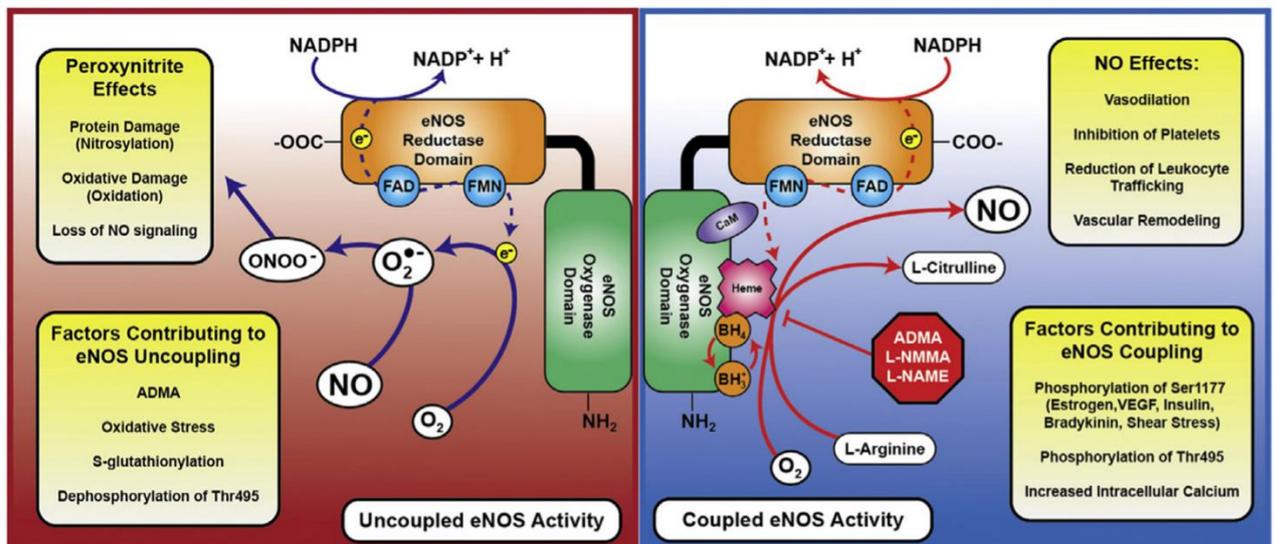


Figura 1. NOS nas formas acoplada e desacoplada. A forma desacoplada da NOS produz ânion superóxido, que ao reagir com NO, leva a formação do ONOO⁻, que exerce inúmeros efeitos deletérios no sistema cardiovascular. Por sua vez, a NOS acoplada produz NO a partir da L-arginina, que desempenha efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular como um todo. Fonte: (CYR *et al.*, 2020).

1.4. Via nitrato-nitrito-NO

Por muito tempo, acreditou-se que os produtos do metabolismo do NO, os ânions nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) (LAUER *et al.*, 2001), não tinham quaisquer funções endógenas. Estes também já foram relacionados com a produção de moléculas com efeitos nocivos, como as N-nitrosaminas e a metahemoglobina (FEELISCH *et al.*, 2002). No entanto, na última década, estudos tem demonstrado que a via nitrato-nitrito-NO pode ser uma via complementar àquela dependente das

NOS, sendo capaz de gerar NO e outros óxidos de nitrogênio bioativos com importante papel fisiológico (LUNDBERG, Jon O.; WEITZBERG; GLADWIN, 2008).

Nesta via alternativa para a produção de NO, o nitrato é conhecidamente o produto final e mais estável da oxidação do NO. Da mesma forma, o NO_3^- é o precursor do NO in vivo. As maiores fontes de nitrato são oriundas da dieta, mais especificamente de vegetais verdes, como alface, espinafre, rúcula e também a beterraba (KAPIL *et al.*, 2013a; LUNDBERG, Jon O.; WEITZBERG; GLADWIN, 2008). Nesse ciclo, os vegetais oriundos da dieta contem nitrato que é deglutido e absorvido no intestino. Cerca de 25% do nitrato é transportado pela sialina, um transportador de nitrato/ H^+ , para as glândulas salivares e secretado na cavidade oral (QIN *et al.*, 2012), sendo que a saliva tem uma concentração de 10-20 vezes maior de nitrato que o plasma (FAASSEN *et al.*, 2010). Parte da microbiota presente na cavidade oral é capaz de reduzir nitrato a nitrito, enquanto usa o nitrogênio para a produção de adenosina-5'-trifosfato (ATP). Uma vez no estômago, favorecido pelo pH ácido ($\text{pH} \leq 3$), o nitrito é protonado a ácido nitroso (HNO_2) que se decompõe a $\bullet\text{NO}$ e outros óxidos de nitrogênio bioativos (BENJAMIN *et al.*, 1994; LUNDBERG, Jon O; CARLSTRÖM; WEITZBERG, 2018; MARON; TANG; LOSCALZO, 2013). O $\bullet\text{NO}$ formado no ambiente ácido do estômago também pode ser absorvido no intestino e atuar fisiologicamente, além de poder ser oxidado a nitrito e a nitrato por ação da oxi-hemoglobina, reiniciando o ciclo (LUNDBERG, Jon O. *et al.*, 2004).

Além do HNO_2 e do NO, ao chegar no estômago, o nitrito também pode formar espécies como o anidrido nitroso (N_2O_3), conhecidamente uma fonte de S-nitrosotiois como a S-nitrosoglutathiona, gerando nitrosilação proteica, uma alteração pós traducional que consiste na incorporação do NO a um grupo tiol livre

de uma cisteína, que tem como produto o S-nitrosilado e nitrito (BRONIOWSKA; HOGG, 2012; WINK *et al.*, 1994).

Diversos estudos já demonstraram efeitos benéficos do nitrato e do nitrito em doenças cardiovasculares, especialmente na hipertensão arterial, tanto em modelos animais quanto em humanos (GHOSH *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2015). Nesse sentido, a formação de S-nitrosotiois é crucial para o efeito anti-hipertensivo exercido pelo nitrito, já que o aumento do pH gástrico com a utilização de omeprazol e consequente diminuição da formação de nitrosotiois no estômago, reverteu os efeitos benéficos do nitrito na pressão arterial (PINHEIRO *et al.*, 2012). Portanto, pelo menos parte dos efeitos do nitrito na hipertensão poderiam estar relacionados à formação de nitrosotiois e consequente nitrosilação de proteínas envolvidas no controle da pressão arterial como da cisteína 289 do receptor tipo 1 da angiotensina II, reduzindo sua afinidade de ligação à angiotensina II e da NADPH oxidase, reduzindo a atividade da enzima e inibindo a produção de superóxido, um dos efetores da disfunção endotelial observada na hipertensão arterial (LECLERC *et al.*, 2006; SELEMIDIS *et al.*, 2007).

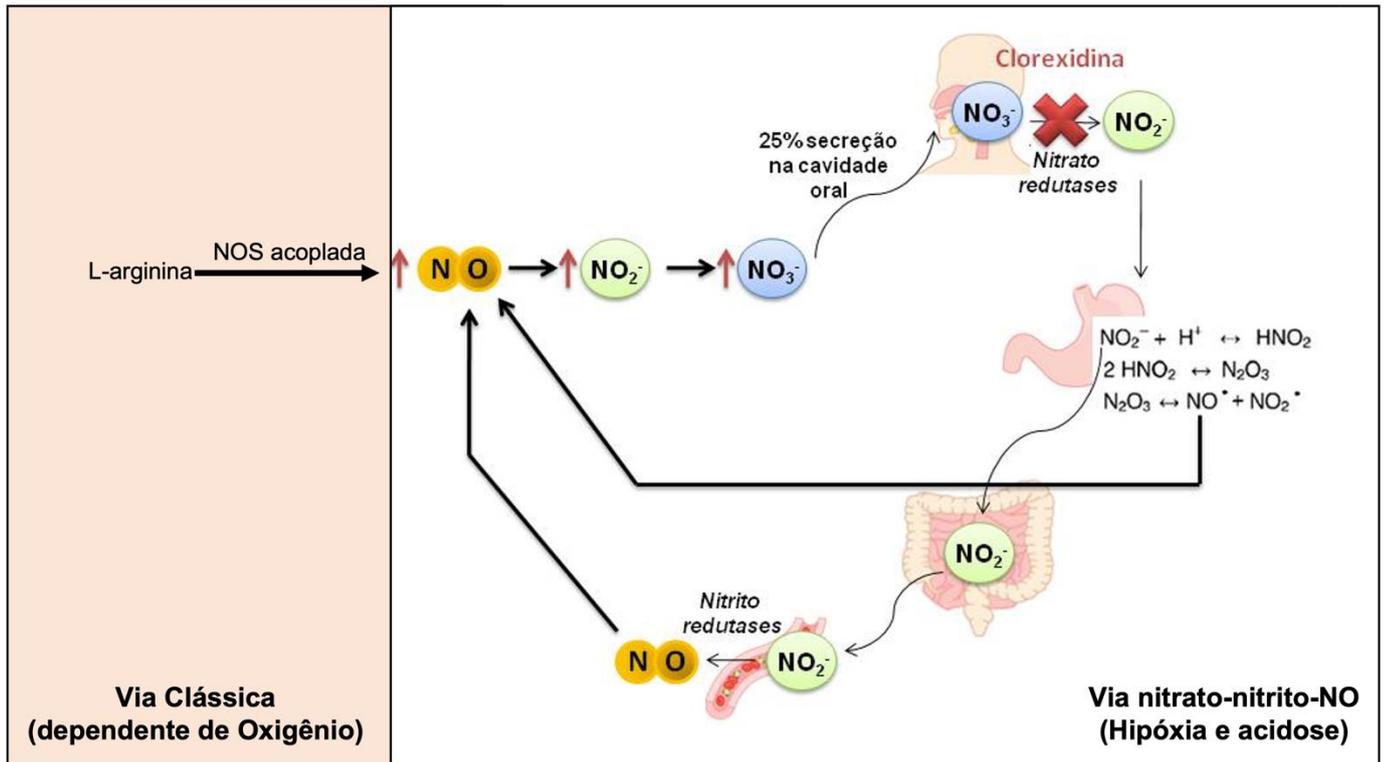


Figura 2: Via clássica e via dependente de nitrato e nitrito para a produção de NO. Na via clássica, o NO é produzido a partir do substrato L-arginina com a participação de cofatores. Na via nitrato-nitrito-NO, este é oxidado a nitrito e a nitrato, que é novamente reduzido a nitrito por ação das bactérias orais. Este nitrito produz NO e espécies relacionadas no estômago e pode ser absorvido no intestino, onde pode ser reduzido a NO por ação das oxihemoglobinas, reiniciando o ciclo.

1.5. Microbiota oral e formação de NO

Como mencionado anteriormente, o nitrato oriundo da dieta é parcialmente convertido a nitrito por ação das bactérias orais. Após ser absorvido e chegar a corrente sanguínea, este é gradativamente oxidado a nitrato, sendo este secretado na cavidade oral, formando o chamado “ciclo enterosalivar do nitrato-nitrito-NO” (GOH *et al.*, 2022; SATO-SUZUKI *et al.*, 2020). Existem mais de 700 espécies de bactérias que residem na cavidade oral humana, sendo algumas destas bactérias anaeróbicas facultativas com capacidade nitrato redutase localizadas na parte posterior da língua (HEZEL; WEITZBERG, 2015; KOCH *et al.*, 2017). Estas utilizam o nitrato e o nitrito como acceptor final de elétrons para a produção de ATP durante

sua respiração e, ao mesmo tempo, auxiliam o hospedeiro em uma etapa crucial na conversão de nitrato a NO.

Estudos realizados em ratos e humanos demonstraram que bactérias com a maior capacidade nitrato redutase da cavidade oral são as espécies *Firmicutes* (*Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Veillonella*) e *Actinobacteria* (*Actinomyces*) (JJ *et al.*, 2005; KOCH *et al.*, 2017). Estudos demonstraram que a suplementação com nitrato em humanos jovens (18-22 anos) e idosos (70-79 anos), e com nitrito de sódio em ratos Wistar foi capaz de alterar a composição da microbiota oral de ambas as espécies, no sentido de aumentar a quantidade de bactérias com capacidade nitrato redutase, como as do gênero *Neisseria* e *Rothia* (HYDE *et al.*, 2014; VANHATALO *et al.*, 2018).

É importante ressaltar que a presença ou ausência de bactérias com capacidade nitrato redutase na cavidade oral reflete a biodisponibilidade de nitrito e NO nos seres humanos e, portanto, poderia ser uma forma de previsão de risco de doença cardiovascular. Isso se reafirma através de um estudo com doadores saudáveis que demonstrou que nem todos apresentavam bactérias redutoras de nitrato em sua cavidade oral, podendo estes indivíduos, portanto, não disporem de um ciclo enterosalivar nitrato-nitrito-NO plenamente funcional e suficiente para a manutenção da saúde cardiovascular (BRYAN; TRIBBLE; ANGELOV, 2017).

1.6. Enxaguante bucal e formação de NO

Como descrito acima, a microbiota oral é crucial para a manutenção e para a restauração da homeostase do NO em situações patológicas que gerem a diminuição de sua biodisponibilidade, já que esta é responsável por gerar o nitrito que será convertido a NO e nitrosotiois no ambiente ácido do estômago. Neste

sentido, uma diminuição e/ou alteração dessa microbiota através do uso de enxaguante bucal, por exemplo, poderia gerar a ruptura do ciclo enterosalivar do nitrato-nitrito-NO (KAPIL *et al.*, 2013b). A clorexidina (CHX) é um dos enxaguantes bucais mais potentes, sendo eficaz na redução tanto de bactérias aeróbicas quanto de anaeróbicas facultativas (HAERIAN-ARDAKANI *et al.*, 2015). Esta leva à morte celular bacteriana através do extravasamento de componentes intracelulares (SAFFARI *et al.*, 2015).

Diversos estudos em modelos animais e em humanos já demonstram os efeitos benéficos da suplementação com nitrato, incluindo a redução da pressão arterial, proteção contra o dano na isquemia e reperfusão, restauração da homeostase do NO, entre outros. Alguns desses benefícios, foram completamente revertidos com a diminuição da microbiota oral perante a utilização de enxaguante bucal (PETERSSON *et al.*, 2009; PINHEIRO; FERREIRA; *et al.*, 2016a; WEBB *et al.*, 2004). Já foi demonstrado que, 90 minutos após a ingestão de nitrato em humanos, a utilização de CHX diminui a liberação de NO em quase 50% (ZETTERQUIST *et al.*, 1999). Noutro estudo, com voluntários saudáveis e sem quaisquer modificações na dieta, um período de 7 dias de tratamento com enxaguante bucal reduziu os níveis de nitrito oral e plasmático nesses indivíduos, além de ter causado um aumento sustentado na pressão sistólica e diastólica (KAPIL *et al.*, 2013b).

1.7. Mecanismo de ação da atorvastatina

A hiperlipidemia é reconhecida como um importante fator de risco para o desenvolvimento de doença arterial coronariana e progressão de lesões ateroscleróticas. Alterações na dieta juntamente com medicamentos hipolipemiantes são essenciais para prevenir a progressão da placa aterosclerótica

e diminuir o risco de eventos coronarianos agudos (FARNIER; DAVIGNON, 1998; MILLER; WRIGHT; BROWNE, 2015). As estatinas são as drogas mais comumente utilizadas no tratamento de hiperlipidemias com o intuito de diminuir os níveis de lipoproteínas plasmáticas ricas em colesterol e reduzir o risco de doença coronária.

Isolada, em 1976, como um produto do metabolismo de culturas de *Penicillium citrinium*, a Mevastatina ou Compactina foi a primeira estatina a ser descoberta. Mais tarde, foi isolada de culturas de *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* a Lovastatina, que possuía uma estrutura semelhante à Mevastatina, porém maior potência (LIAO; LAUFS, 2005). A introdução de derivados sintéticos da classe das estatinas ocorreu em 1996 com Atorvastatina, sendo que em 2002, ela foi a droga mais vendida no mundo (KOGAWA; PIRES; SALGADO, 2019).

O mecanismo de ação clássico dessas drogas consiste na inibição de um dos primeiros passos da biossíntese do colesterol, a conversão do substrato 3-hidroxi-3-metil-glutarilcoenzima A (HMG-CoA) em ácido mevalônico. Essas drogas são capazes de mimetizar este substrato natural, inibindo a enzima 3-hidroxi-3-metil-glutarilcoenzima A redutase (HMG-CoA redutase) (NING *et al.*, 2021). A inibição dessa enzima pela atorvastatina também reduz o nível de colesterol total nos hepatócitos, além de reduzir os níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e triglicerídeos e aumentar os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) em pacientes com hipercolesterolemia ou dislipidemia (CURRAN, 2010).

Em relação aos aspectos farmacocinéticos, a faixa de dosagem clínica da atorvastatina é de 10 a 80 mg/dia, sendo administrada na forma ácida. O ácido da atorvastatina é altamente solúvel e permeável, e a droga é completamente absorvida após administração oral. O volume de distribuição da atorvastatina é de

381L e a ligação às proteínas plasmáticas excede 98%. É metabolizado no intestino e no fígado por oxidação, lactonização e glucuronidação, e os metabólitos são eliminados por secreção biliar e secreção direta do sangue para o intestino (LENNERNÄS, 2003).

1.8. Efeitos pleiotrópicos da atorvastatina

No passado, a redução da síntese de colesterol através da inibição da HMG-CoA redutase foi considerado o principal mecanismo das estatinas. Porém, com o passar do tempo, efeitos benéficos adicionais da atorvastatina em várias doenças cardiovasculares foram descobertos. Já foi demonstrado, por exemplo, efeitos positivos desta droga em um modelo de insuficiência cardíaca induzida por isoproterenol em camundongos, onde a mesma atenuou a lesão da função cardíaca e as alterações patológicas, como o remodelamento cardíaco, nesses animais (NING *et al.*, 2021). A atorvastatina também está associada a uma melhor sobrevida e melhor resultado funcional quando administrada durante a fase aguda do acidente vascular cerebral (AVC) (AZNAOURIDIS *et al.*, 2019).

Também já foi observada uma melhora na disfunção endotelial por diminuição do estresse oxidativo e aumento da biodisponibilidade de NO perante a utilização de atorvastatina (ENDRES; LAUFS, 2004). No que diz respeito a hipertensão, um estudo realizado em modelo 2 rins 1 clipe (2R1C) mostrou que a atorvastatina possui efeitos anti-hipertensivos, de melhora na função vascular, efeitos antioxidantes, anti-remodelamento e, ainda, é capaz de aumentar as concentrações de nitrito na aorta e no plasma desses animais (GUIMARÃES *et al.*, 2013). Adicionalmente, na hipertensão 2R1C, a atorvastatina é capaz de diminuir a atividade da Metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2), do Fator de transformação do

crescimento beta (TGF- β), além da deposição de colágeno, atenuando o remodelamento vascular (GUIMARÃES *et al.*, 2015). Em humanos, um estudo demonstrou que o tratamento com atorvastatina está associado a uma diminuição na pressão na artéria carótida em pacientes com hipertensão (CURRAN, 2010).

Diversos estudos sugerem a utilização da atorvastatina juntamente com um anti-hipertensivo (usualmente a amlodipina) como uma forma de ter efeitos adicionais no tratamento da hipertensão e dislipidemia e prevenção de doenças cardiovasculares associadas (DELGADO-MONTERO; ZAMORANO, 2012; MCKEAGE; SIDDIQUI, 2008). Nesse sentido, a atorvastatina se mostra como uma alternativa terapêutica capaz não só de ocasionar melhoras na pressão arterial, mas também de atenuar os efeitos secundários a esse aumento, como o remodelamento vascular. Portanto, é de extrema relevância, entender por quais mecanismos essa droga produz tais efeitos na hipertensão arterial.

HIPÓTESE

2. Hipótese

Com base no exposto acima, formulamos a hipótese de que os efeitos anti-hipertensivos e vasculares da atorvastatina sejam mediados, ao menos em parte, por sua capacidade de aumentar a biodisponibilidade de NO e conseqüentemente de seus metabólitos, favorecendo o ciclo êntero-salivar do nitrato-nitrito-NO. Sendo assim, o uso de enxaguante bucal poderia atenuar os efeitos benéficos da atorvastatina na hipertensão por prejudicar a conversão de nitrato a nitrito na cavidade oral.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1. Geral

-Determinar a influência do enxaguante bucal (clorexidina 0.12%) sobre os efeitos benéficos da atorvastatina na hipertensão, bem como investigar possíveis mecanismos envolvidos nestes efeitos.

3.2. Específicos

1. Determinar se o uso de clorexidina atenua os efeitos anti-hipertensivos da atorvastatina em ratos hipertensos 2R1C.
2. Determinar se o uso de clorexidina atenua a melhora de reatividade vascular aórtica dependente de endotélio associados ao tratamento de ratos hipertensos com atorvastatina.
3. Determinar se o uso de clorexidina afeta as concentrações plasmáticas, vasculares e no fígado de nitritos, nitratos e nitrosotiois, associados ao tratamento de ratos hipertensos com atorvastatina.
4. Determinar se o uso de clorexidina afeta a produção de espécies reativas de oxigênio bem como marcadores de estresse oxidativo no plasma, na aorta e no fígado em ratos hipertensos tratados com atorvastatina.

METODOLOGIA

4. Metodologia

4.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (180 a 200 gramas), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA:081/2018). Os animais foram mantidos em salas com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada (22-25°C) e livre acesso a ração e água.

4.2. Abordagem experimental I- Avaliação dos efeitos cardiovasculares da administração oral de atorvastatina com ou sem utilização concomitante de enxaguante bucal

Neste protocolo, avaliamos a participação das bactérias orais nos efeitos anti-hipertensivos e vasculares da atorvastatina, visto que estas são fundamentais para a conversão de nitrato a nitrito. Para isso, ratos foram submetidos à cirurgia 2 rins 1 clipe (2R1C), que consiste na estenose da artéria renal por meio de um clipe de prata com abertura de 0,2 mm que foi realizada conforme descrito anteriormente (DE LA RIVA *et al.*, 2000). Ratos alocados no grupo SHAM foram submetidos à cirurgia sem a inserção do clipe. Como anestésico foram utilizados ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) via intraperitoneal. Após a cirurgia o animal recebeu para analgesia pós-operatória (Fluxina meglumina 2,5 mg/kg s.c.) (MONTENEGRO *et al.*, 2011). Após duas semanas de indução de hipertensão, os animais que não atingiram 160 mmHg de pressão sistólica foram excluídos do estudo. Os animais hipertensos (2R1C) e não hipertensos (SHAM) foram tratados conforme os seguintes grupos: Veículo (etanol 2%); Atorvastatina (50 mg/kg) (GUIMARÃES *et al.*, 2013), Veículo + Enxaguante bucal (Periogard®, clorexidina 0.12%) (PINHEIRO; FERREIRA; *et al.*, 2016a), Atorvastatina + Enxaguante bucal. O enxaguante bucal foi aplicado na mucosa oral com o auxílio de um swab (PINHEIRO; FERREIRA; *et al.*, 2016b). Todos os grupos estão representados na

figura 4. Os tratamentos foram realizados durante quatro semanas (início na segunda semana após indução da hipertensão até o fim da sexta semana). Os grupos foram designados nas figuras como SV (Sham+Veículo), SE (Sham+Enxaguante), SA (Sham+Atorvastatina), SEA (Sham+Enxaguante+Atorvastatina), além de HV (Hipertenso+Veículo), HE (Hipertenso+Enxaguante), HA (Hipertenso+Atorvastatina) e HEA (Hipertenso+Enxaguante+Atorvastatina).

2R1C+Veículo	SHAM + Veículo
2R1C + Atorvastatina	SHAM + Atorvastatina
2R1C + Enxaguante	SHAM + Enxaguante
2R1C + Enxaguante + Atorvastatina	SHAM + Enxaguante + Atorvastatina

Figura 3: Grupos experimentais do protocolo.

4.2.1. Avaliação da pressão arterial sistólica e peso corporal

A pressão arterial sistólica foi verificada pelo método de pletismografia de cauda. Para isso, um manguito acoplado a um transdutor de pressão foi colocado em torno da cauda dos animais acordados, previamente aquecidos (37°C). As variações de pressão foram capturadas por um programa específico de aquisição de dados: PowerLab 4/S analog-to-digital converter (AD Instruments Ltd., Csdtle Hill, Australia) e os resultados representados por uma média de cinco medidas consecutivas para cada animal. A pressão arterial e o peso corporal foram avaliados semanalmente, durante todo o estudo (Figura 4).

4.2.2. Contagem bacteriana

A fim de avaliar se o uso de enxaguante bucal gerou uma diminuição na quantidade de bactérias orais, ao final da sexta semana, foi coletado um swab oral, duas horas após o tratamento com enxaguante bucal. As bactérias do swab foram cultivadas em uma placa contendo o meio sólido ágar nutriente e encubadas por 18 horas em estufa a 37°C. Posteriormente, foi estimado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) (BATISTA *et al.*, 2021).



Figura 4: Linha do tempo Protocolo Experimental.

4.2.3. Eutanásia e coleta de tecidos

Ao final do protocolo, os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina e eutanasiados. As amostras de sangue arterial foram coletadas em tubos contendo heparina e imediatamente centrifugadas a 1000xg por 4 minutos. A aorta do animal foi extirpada e lavada com PBS pH 7,4. O sangue e as aortas que não foram utilizadas para a reatividade foram aliquotados e guardados a -70°C para os demais ensaios.

4.2.4. Reatividade de aorta

Teste da integridade do endotélio

A artéria aorta foi coletada delicadamente, e lavada com solução de Krebs (NaCl 130 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 14,9 mM, glicose 5,5 mM, e CaCl₂ 1,6 mM), pH 7,4, seccionada em anel e conectada a um transdutor de deslocamento de força isométrica (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) e mantida em câmara de banho para órgãos isolados contendo solução de Krebs borbulhado com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). Após isso, os anéis foram mantidos sob tensão de 1,5 g por 1 hora para estabilização. Posteriormente, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (100 nM) e relaxados com acetilcolina 1 µM para a avaliação da integridade do endotélio (PINHEIRO; OLIVEIRA-PAULA; *et al.*, 2016).

Curva de Relaxamento

Após os procedimentos iniciais descritos acima, foi feita uma lavagem com solução de Krebs e, após, estabilizados, os anéis foram mais uma vez pré-contraídos com fenilefrina 100 nM e após a estabilização da pré-contracção, foi iniciada a curva de relaxamento para a acetilcolina, que consiste na adição de concentrações crescentes (100 nM a 10 mM) desta à preparação (BATISTA *et al.*, 2021).

4.3. Abordagem experimental II- Avaliação dos efeitos da administração oral de atorvastatina com ou sem utilização concomitante de enxaguante bucal nos metabólitos de NO e no estresse oxidativo.

4.3.1. Determinação das concentrações de nitrato no plasma, na aorta e no fígado

No que diz respeito ao plasma, este foi coletado e aliquoteado juntamente com uma solução de NEM (10mM) e DTPA (2mM). Os tecidos (aorta e fígado) foram macerados em solução de PBS para posterior análise do nitrato pelo método de Quimiluminescência através do ozônio no aparelho Sievers Modelo 280 NO analyzer, Boulder, CO. Foram injetados 15 µl de plasma, suspensão de aorta ou fígado macerados no aparelho contendo vanádio (III) em ácido clorídrico a 90°C, que reduz nitratos a NO gasoso. O óxido nítrico formado foi então carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de óxido nítrico. Os dados foram analisados no programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) (MONTENEGRO *et al.*, 2011).

4.3.2. Determinação das concentrações de nitrito no plasma, na aorta e no fígado e de nitrosotiois no plasma e no fígado.

Para análise das concentrações plasmáticas e teciduais de nitrito e nitrosotiois (RXNO) foram feitos procedimentos iniciais iguais aos descritos acima, porém foram injetados no aparelho 100 µl de plasma ou 250 µl de suspensão de aorta ou fígado macerada em PBS e, nesse caso, o aparelho continha uma solução de iodo acidificada, capaz de reduzir nitrito a NO. O óxido nítrico formado então foi carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de óxido nítrico (Sievers Modelo 280 NO analyzer, Boulder, CO). Os dados obtidos foram analisados pelo programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA). Para a quantificação de espécies nitrosiladas (RXNO) no plasma e no fígado, foi adicionada à amostra sulfanilamida

ácida (5% em ácido fosfórico) na proporção de 10% do volume da amostra. Após 5 minutos de reação 500 µl de amostra foram injetados no analisador (MONTENEGRO *et al.*, 2011).

4.3.3. Avaliação do TBARS no plasma e no fígado

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram obtidas conforme descrito anteriormente (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Tal método baseia-se no fato de que alguns dos produtos da peroxidação lipídica são reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Em suma, amostras de plasma e macerados de fígado foram incubados com tampão ácido acético (pH 3,5), dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e TBA (0,6%) a 95 C durante uma hora. Após isso, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm. Adicionando-se TBA ao plasma foi possível detectar a presença do malondialdeído (MDA) utilizando o sobrenadante para a leitura espectrofotométrica a 532 nM. É importante ressaltar que foi feita uma curva padrão com concentrações conhecidas de MDA.

4.3.4. Avaliação da atividade da Xantina oxidoreductase no plasma

A atividade da xantina oxidoreductase no plasma foi medida utilizando um kit (kit de ensaio da Xantina Oxidoreductase Amplex Red; A22182, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), como descrito previamente. A XOR catalisa a oxidação da hipoxantina ou xantina a ácido úrico e ânion superóxido, que é degradado a peróxido de hidrogênio, sendo que este reage com Amplex Red produzindo um produto de oxidação (resofurina) que emite uma fluorescência vermelha. Esta fluorescência foi medida utilizando um leitor de microplaca (Biotek Synerg H1; Promega Corp, Winooski, VT; excitação a 530 nm e detecção a 590nm). Foi utilizada uma curva

padrão para o cálculo da atividade da XOR. Todos os valores foram normalizados pela quantidade de proteína (NOGUEIRA *et al.*, 2021).

4.3.5. Avaliação da quimioluminescência da Lucigenina na aorta

Para determinar a produção de superóxido dependente da enzima NAD(P)H oxidase, utilizamos a técnica de luminescência com a sonda lucigenina. Em resumo, anéis de aorta foram transferidos para frascos de luminescência contendo 1 ml de tampão HANKS, pH 7.2, contendo 5 $\mu\text{mol/l}$ de lucigenina. Após a avaliação dos valores da linha de base, 300 $\mu\text{mol/l}$ de NADPH foram adicionados e as contagens de luminescência foram medidas continuamente por 15 min em luminômetro (Berthold 9505) A 37 °C. Os resultados foram normalizados pelo peso seco dos anéis de aorta (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

4.3.6. Determinação de espécies reativas de oxigênio (EROS) *in situ* na aorta.

Como medida de estresse oxidativo, as concentrações vasculares de EROs foram analisadas, *in situ*, utilizando a sonda dihidroetidina (DHE). Esta sonda reage com espécies reativas de oxigênio resultando na formação de hidroxietídeo e de etídio, produtos que emitem fluorescência vermelha quando intercalados ao DNA. Para isto, as aortas foram cortadas em criostato (5 μm de espessura) e encubadas com DHE (10 $\mu\text{mol/L}$) durante 30 minutos e examinadas por microscopia de fluorescência (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, England) em 400x, usando $\lambda = 525 \text{ nm}$ de excitação e $\lambda = 605 \text{ nm}$ de emissão, que não é específica para detectar apenas superóxido. A intensidade de fluorescência foi quantificada utilizando o programa ImageJ (GUIMARÃES *et al.*, 2013).

4.4. Análise estatística

Os resultados foram analisados com ANOVA (análise de variância) de duas vias e pós teste Tukey, sendo apresentados como média \pm erro padrão da média. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas com valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Abordagem Experimental I: Avaliação dos efeitos cardiovasculares da administração oral de atorvastatina com ou sem utilização concomitante de enxaguante bucal.

Inicialmente, avaliamos se a utilização do enxaguante bucal clorexidina seria capaz de diminuir a contagem total de bactérias por UFC. De fato, todos os grupos, sejam eles Sham ou Hipertensos, tratados com clorexidina, apresentaram um menor número de unidades formadoras de colônia duas horas após o tratamento com enxaguante ($F_{(3,20)}=7,905$; $p=0,0011$) (Figura 5).

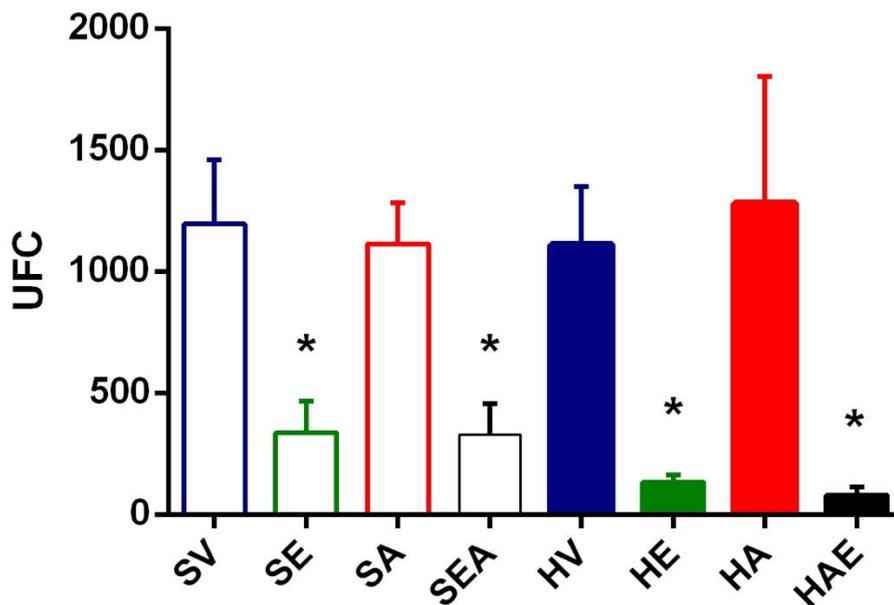


Figura 5: Contagem de bactérias por Unidades formadoras de Colônia (UFC) coletadas 2 horas após o tratamento com enxaguante bucal. Dados mostrados como média \pm SEM. (n=4 a 9 por grupo) * $p<0,05$ em relação ao grupo Sham+Veículo, obtidos pelo teste de anova de duas vias seguida pelo pós teste Tukey, sendo os dois fatores tratamento e doença.

No que diz respeito à pressão arterial sistólica, foi possível observar que o modelo de hipertensão utilizado foi eficaz de aumentar os níveis pressóricos desde a primeira semana do protocolo (Sham+Veículo=124mmHg \pm 1,633; Hipertenso+Veículo=170 mmHg \pm 8,970; $p<0,05$). O tratamento com atorvastatina

(50mg/kg), via oral, diminuiu a pressão sistólica até a última semana de tratamento (semana 6) (Hipertenso+Veículo=204±10, 441; Hipertenso+Atorvastatina=167±14,208; $p<0,05$) em cerca de 20%. O tratamento com enxaguante bucal reverteu o efeito anti-hipertensivo da Atorvastatina em todas as semanas de tratamento (Hipertenso+Atorvastatina=167±14,208; Hipertenso+Enx+Atorva=188±10,650; $p<0,05$ na última semana de tratamento) ($F_{(7,355)} = 111; p<0,0001$). O tratamento apenas com Clorexidina não alterou os níveis pressóricos em ratos Sham ou Hipertensos. A Atorvastatina também não foi capaz de exercer efeitos na pressão sistólica de ratos normotensos (Sham) (Figura 6). A doença e o tratamento não foram capazes de exercer quaisquer alterações em relação ao peso desses animais (Figura 7).

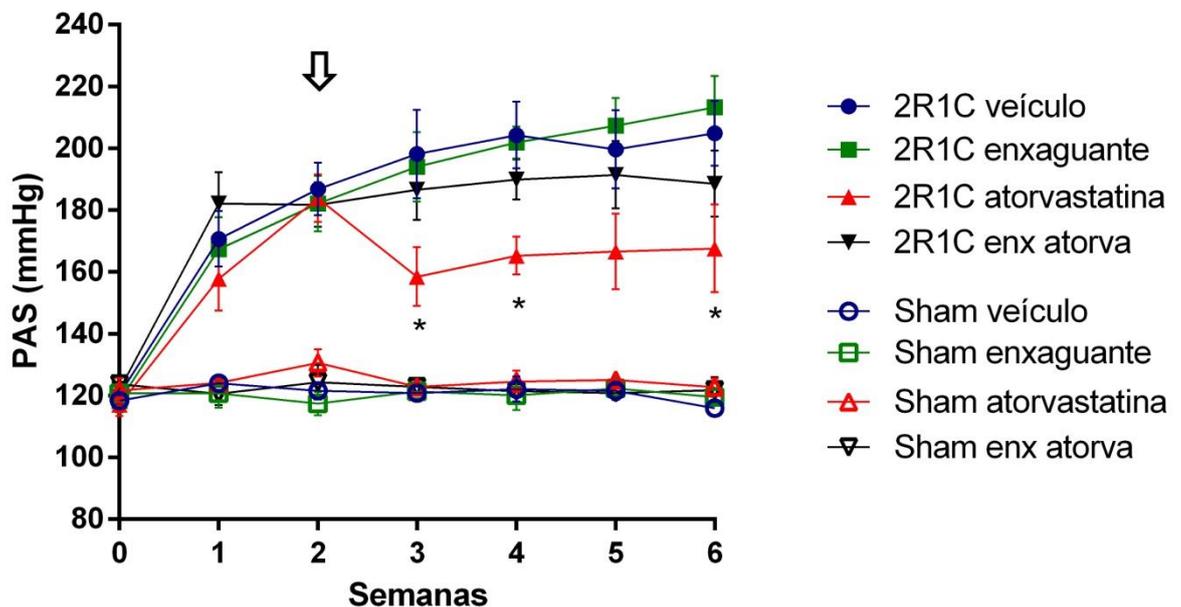


Figura 6: Pressão arterial sistólica dos animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal aferida pelo método de pletismografia de cauda. $p<0,05$ em relação ao grupo Hipertenso+Veículo obtidos pelo teste de anova de duas vias seguida pelo pós teste Tukey, sendo os dois fatores tratamento e doença. Dados mostrados como média \pm SEM. (n=6 a 9 por grupo).

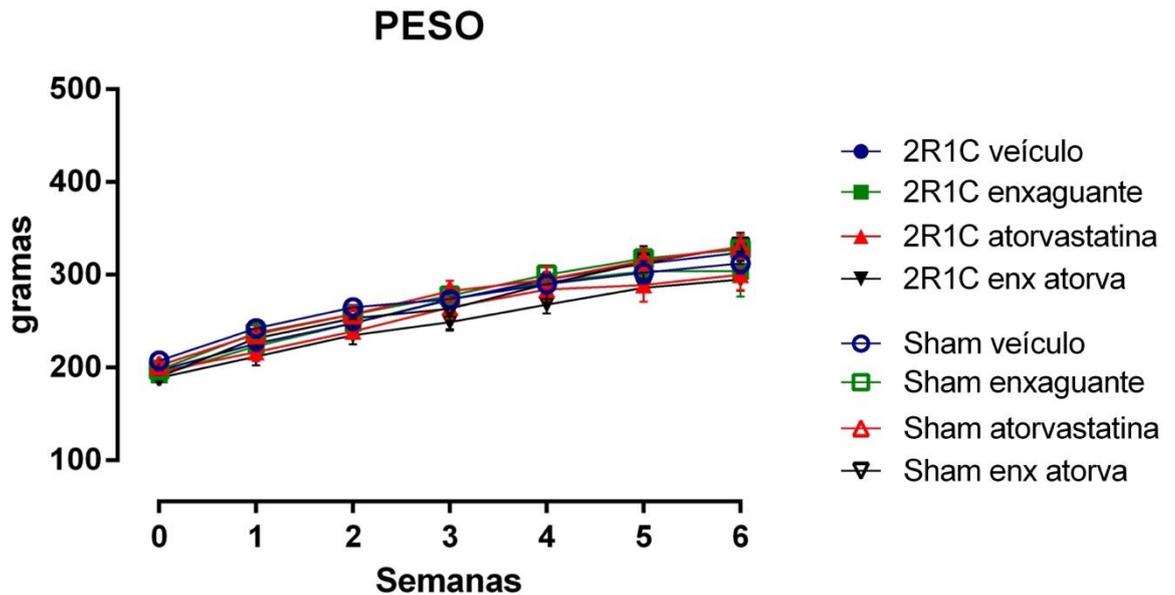


Figura 7: Peso, em gramas, dos animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Dados mostrados como média \pm SEM. (n=6 a 9 por grupo).

Em relação à função vascular, medida pela realização de uma curva de relaxamento à Acetilcolina, o modelo de hipertensão utilizado causou prejuízos nessa resposta, descolando a curva para a direita (Figura 8), afetando tanto a potência (pD2) (Sham+Veículo pD2=7,452 \pm 0,1169; Hipertenso+Veículo pD2=6,709 \pm 0,096; $p<0,05$) quanto o efeito máximo (Emax) (Sham+Veículo Emax=92,280 \pm 3,523; Hipertenso+Veículo Emax=71,52 \pm 3,045; $p<0,05$). A Atorvastatina restaurou a função vascular dos animais hipertensos, especialmente no efeito máximo (Hipertenso+Veículo Emax=71,52 \pm 3,045; Hipertenso+Atorvastatina Emax= 87,39 \pm 2,842; $p<0,05$) de relaxamento à acetilcolina. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação a potência diante do tratamento com Atorvastatina em ratos hipertensos. O uso do enxaguante bucal clorexidina reverteu os efeitos benéficos no efeito máximo

ocasionados pela Atorvastatina (Hipertenso+Atorvastatina $E_{max}= 87,39\pm 2,842$; Hipertenso+Enx+Atorva $E_{max}= 70,38\pm 5,075$; $p<0,05$). (Figura 9.A e 9.B).

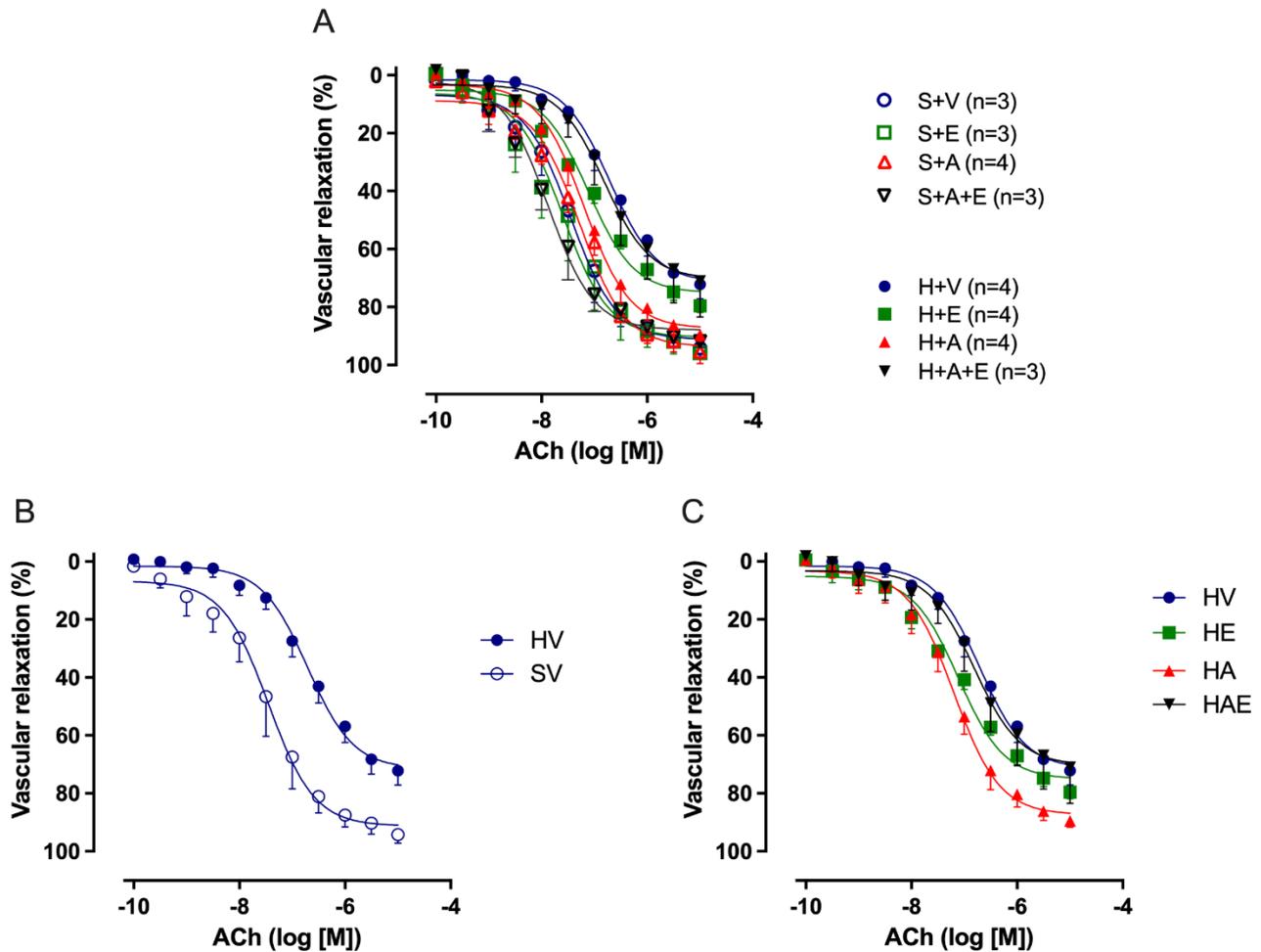


Figura 8: Curvas da função vascular medida pelo relaxamento à Acetilcolina em aortas de animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal pré-contraídas com Felilefrina. **A)** Relaxamento à Acetilcolina em todos os grupos de tratamento. **B)** Relaxamento à Acetilcolina em ratos Sham e Hipertensos tratados apenas com veículo. **C)** Relaxamento à Acetilcolina em animais Hipertensos tratados com Atorvastatina (ou veículo) e/ ou enxaguante bucal. Dados mostrados como média \pm SEM. (n=3 a 4 por grupo)

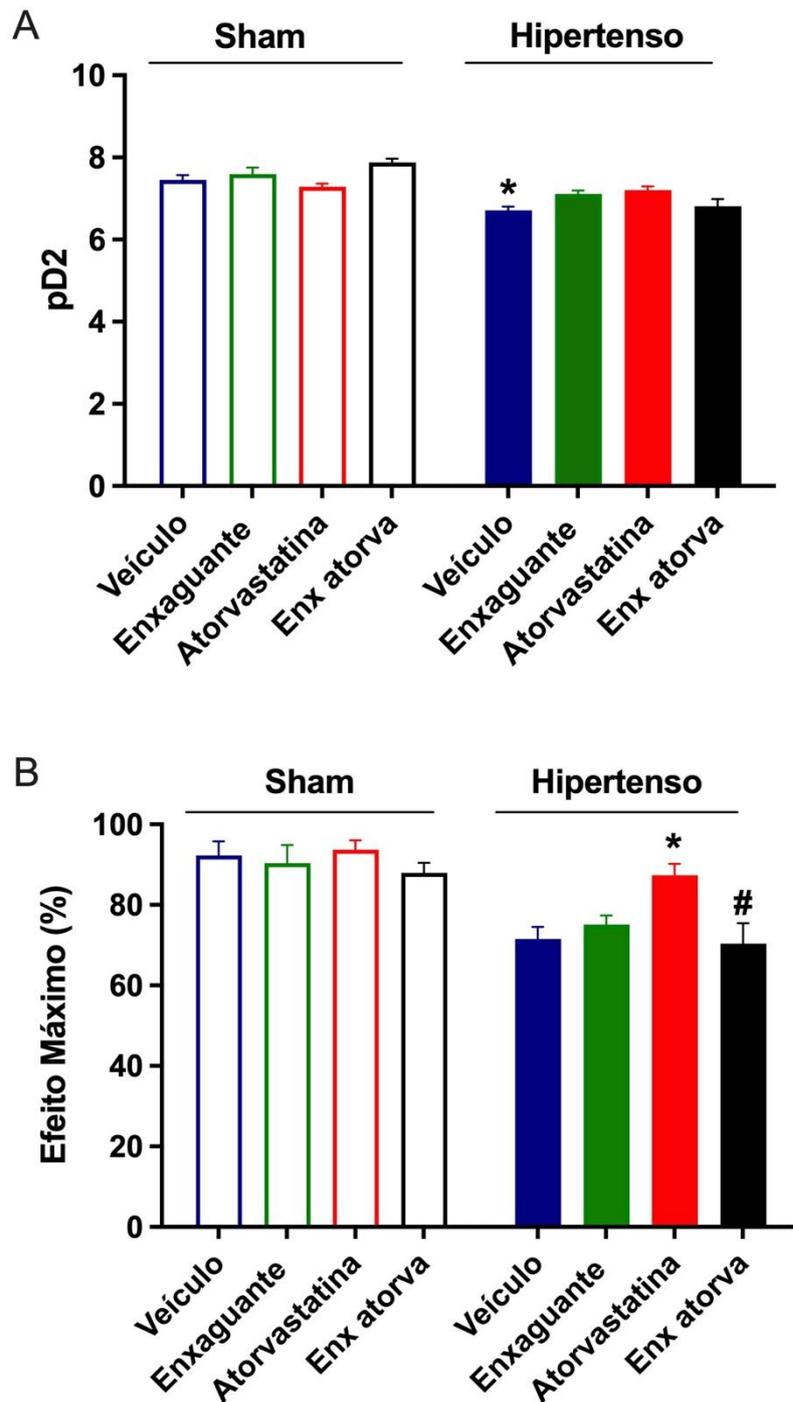


Figura 9: Potência e efeito máximo de relaxamento à Acetilcolina em ratos Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal. A) Potência (pD₂) de relaxamento à Acetilcolina em animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal. B) Efeito máximo de relaxamento à Acetilcolina em animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal. *p<0,05 em relação ao grupo Hipertenso+Veículo. #p<0,05 em relação ao grupo Hipertenso+Atorvastatina, obtidos pelo teste de anova de duas vias seguida pelo pós teste Tukey, sendo os dois fatores tratamento e doença. Dados mostrados como média ± SEM. (n=3 a 4 por grupo).

5.2. Abordagem experimental II- Avaliação dos efeitos da administração oral de atorvastatina com ou sem utilização concomitante de enxaguante bucal nos metabólitos de NO e no estresse oxidativo.

Em seguida, avaliamos a capacidade da Atorvastatina de aumentar a biodisponibilidade de NO e seus metabólitos na hipertensão arterial. Em relação ao plasma, não foram encontradas diferenças estatísticas nas medidas de nitrito, nitrato ou nitrosotiois (Figura 10). Na aorta, o tratamento com Atorvastatina foi capaz de aumentar a concentração de nitrato (Hipertenso+Veículo 144,9 pmol/mg \pm 34,77; Hipertenso+Atorvastatina 254,4 pmol/mg \pm 49,91; $p<0,05$) e o tratamento concomitante com enxaguante bucal reverteu esse efeito (Hipertenso+Atorvastatina 254,4 \pm 49 pmol/mg,91; Hipertenso+Enx+Atorva 112,6 pmol/mg \pm 19,88 $p<0,05$) ($F_{3,53}=2,449$; $p=0,0737$) nos animais hipertensos (Figura 11). Não foram encontradas diferenças estatísticas no que diz respeito ao nitrito na aorta (Figura 11.A). No fígado, a Atorvastatina aumentou a concentração de nitrito (Hipertenso+Veículo 1,397 pmol/mg \pm 0,2743; Hipertenso+Atorvastatina 3,074 pmol/mg \pm 0,7995; $p<0,05$) e a clorexidina reverteu este aumento (Hipertenso+Atorvastatina 3,074 pmol/mg \pm 0,7995; Hipertenso+Enx+ Atorva 1,510 pmol/mg \pm 0,228; $p<0,05$) ($F_{(3,44)}=3,071$; $p=0,0375$) (Figura 12.A). O nitrato e o RXNO no fígado não foram alterados pelo tratamento com atorvastatina ou enxaguante bucal (Figura 13 A e B).

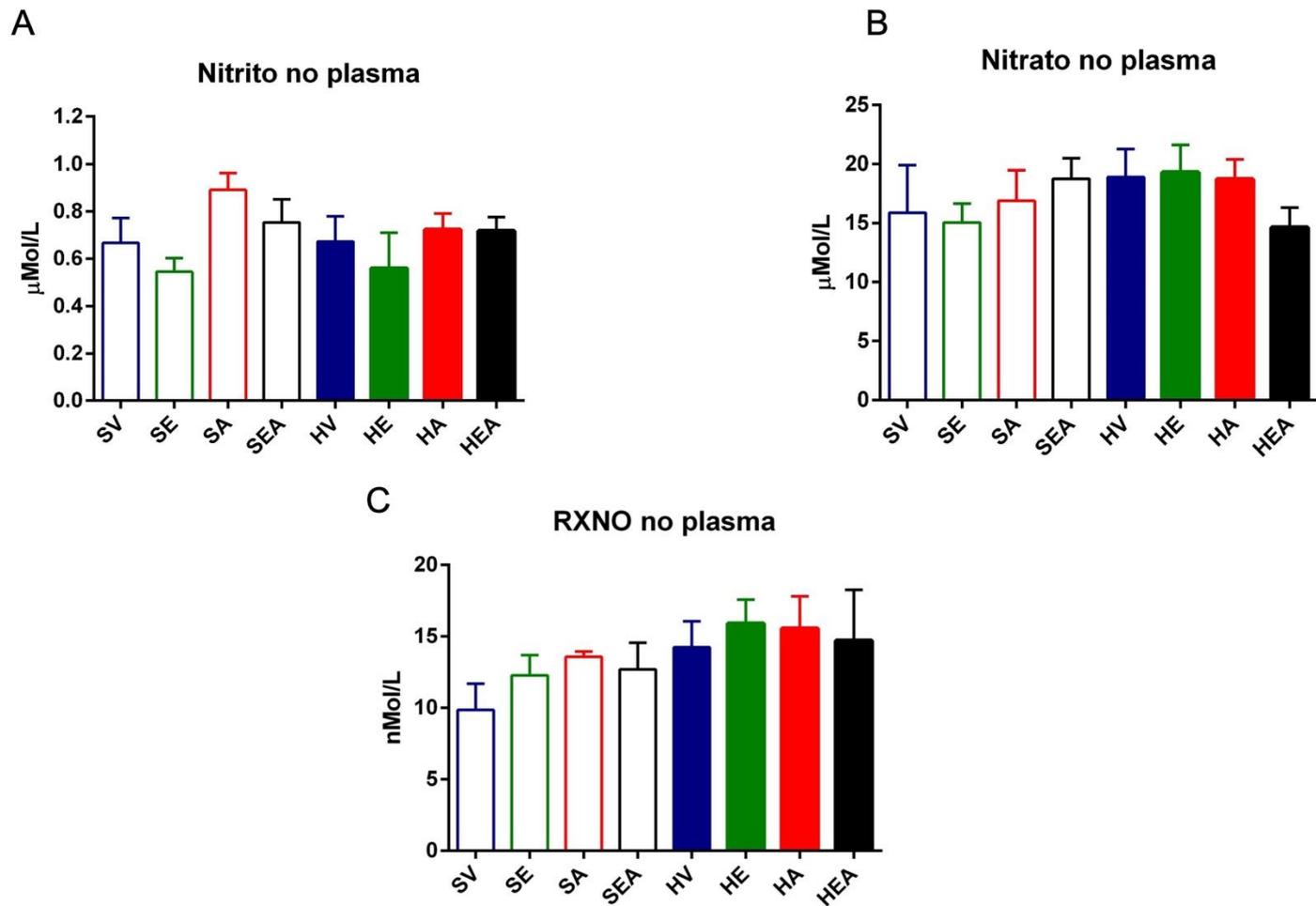


Figura 10: Medidas de metabólitos do NO no plasma de animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtidos pelo método de quimiluminescência através do ozônio. A) Nitrito no plasma de animais de todos os grupos de tratamento. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. B) Nitrato no plasma de animais de todos os grupos de tratamento. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. C) RXNO no plasma de animais de todos os grupos de tratamento. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Dados mostrados como média \pm SEM (4 a 9 por grupo).

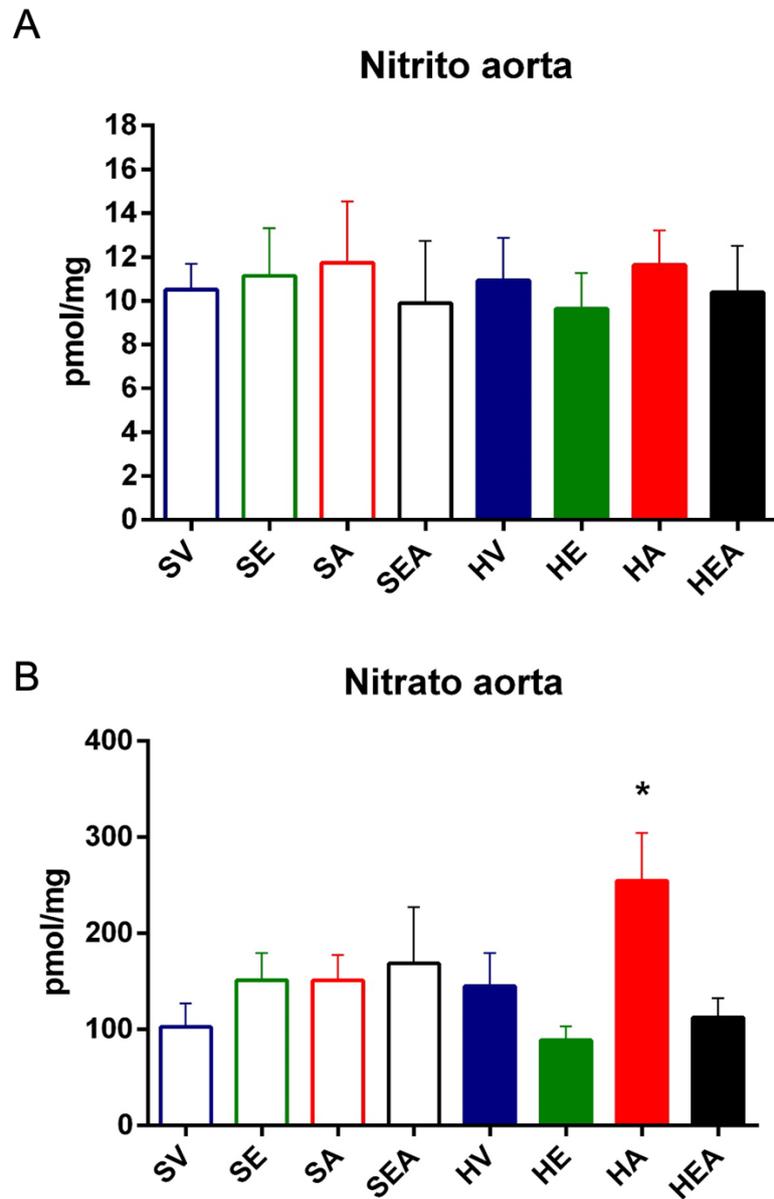


Figura 11: Medidas de metabólitos do NO na aorta de animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtidos pelo método de quimiluminescência através do ozônio. A) Nitrito na aorta de animais de todos os grupos de tratamento. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. B) Nitrato na aorta de animais de todos os grupos de tratamento. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Hipertenso+Veículo, obtidos pelo teste de anova de duas vias seguida pelo pós teste Tukey, sendo os dois fatores tratamento e doença. Dados mostrados como média \pm SEM (6 a 10 por grupo).

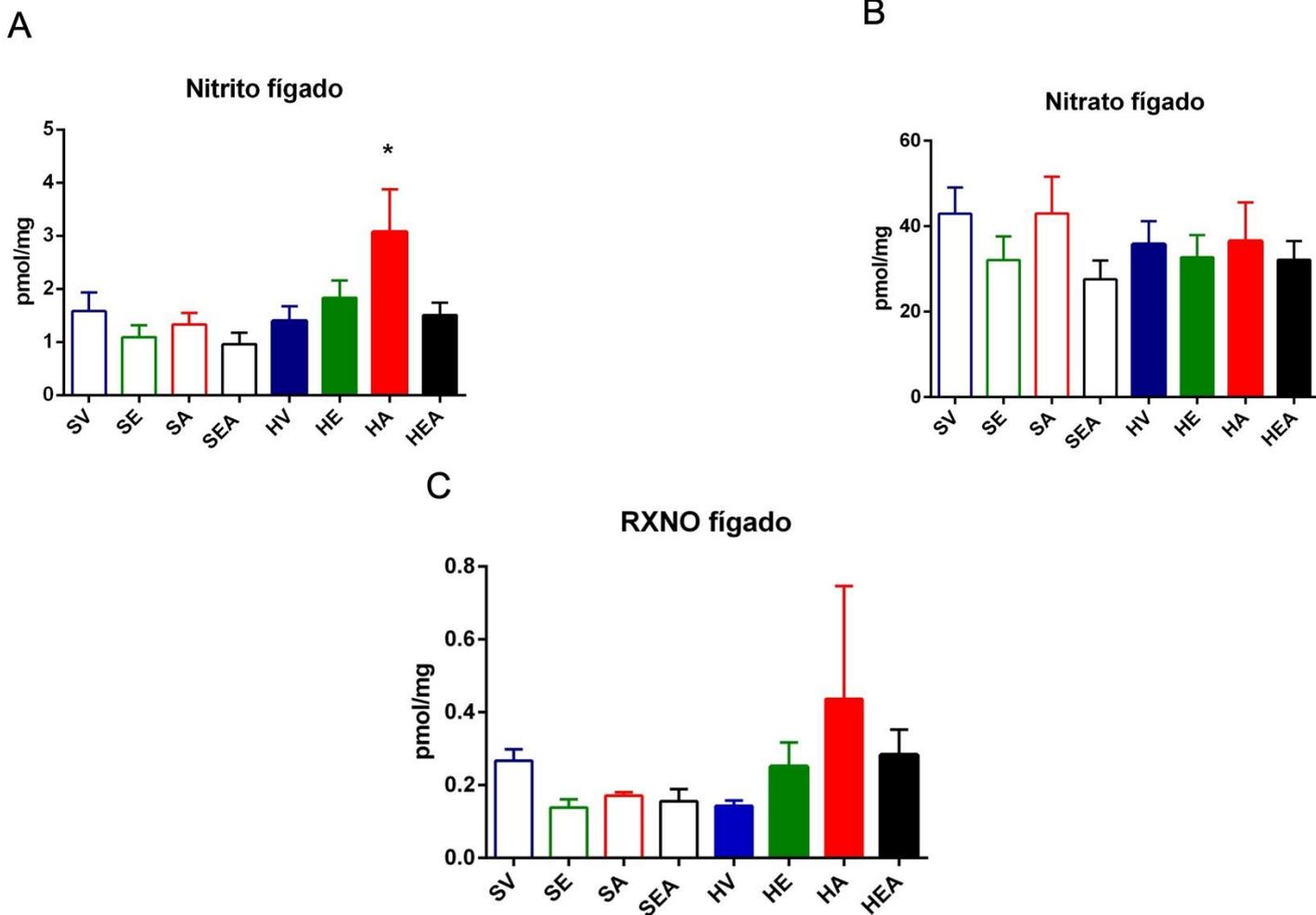


Figura 12: Medidas de metabólitos do NO no fígado de animais Sham e Hipertensos tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtidos pelo método de quimiluminescência através do ozônio. A) Nitrito no fígado de animais de todos os grupos de tratamento. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Hipertenso+Veículo, obtidos pelo teste de anova de duas vias seguida pelo pós teste Tukey, sendo os dois fatores tratamento e doença. **B)** Nitrato no fígado de animais de todos os grupos de tratamento. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. **C)** RXNO no fígado de animais de todos os grupos de tratamento. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Dados mostrados como média \pm SEM ($n=5$ a 9 por grupo).

Em relação ao estresse oxidativo no plasma, nos grupos hipertensos em que o enxaguante foi utilizado, houve um aumento significativo na peroxidação lipídica (Hipertenso+Veículo $0,7369\mu\text{M} \pm 0,1075$; Hipertenso+Enxaguante $1,699\mu\text{M} \pm 0,4432$; Hipertenso+Enx+Atorva $1,069\mu\text{M}$; $p < 0,05$) ($F_{(3,49)}=5,350$; $p=0,029$) (Figura 13.A). A hipertensão e os tratamentos utilizados não alteraram a atividade

da XOR no plasma (Figura 13.B). A produção de superóxido dependente de NADPH oxidase aumentou na hipertensão arterial pelo modelo 2R1C (Sham+Veículo 97,21RLU/mg \pm 11,15; Hipertenso+Veículo 319,4 RLU/mg \pm 24,28; $p<0,05$) e o tratamento com atorvastatina diminuiu esta produção (Hipertenso+Veículo 319,4 RLU/mg \pm 24,28; Hipertenso+Atorvastatina 230,3 RLU/mg \pm 22,12; $p<0,05$). O tratamento com clorexidina, por sua vez, reverteu o efeito da atorvastatina (Hipertenso+Atorvastatina 230,3 RLU/mg \pm 22,12; Hipertenso+Enx+Atorva 329,2 RLU/mg \pm 43,29; $p<0,05$) ($F_{(3,44)}=2,678$; $p=0,0586$) (Figura 14.A). Para este ensaio, foi realizado um experimento controle com os antioxidantes DPI e Tiron, sendo a produção de superóxido diminuída com ambas as drogas nos animais Hipertensos (2R1C 337 RLU/mg \pm ,18,770; 2R1C+DPI 94,33 RLU/mg \pm 17,41; 2R1C+Tiron 108,5 RLU/mg \pm 24,40; $p<0,05$) ($F_{(5,13)}=12,96$; $p=0,0001$). validando o ensaio (Figura 14.B). No que se refere à produção de superóxido, *in situ* na aorta, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 15). A peroxidação lipídica no fígado não foi alterada pela hipertensão ou pelos tratamentos realizados (Figura 16).

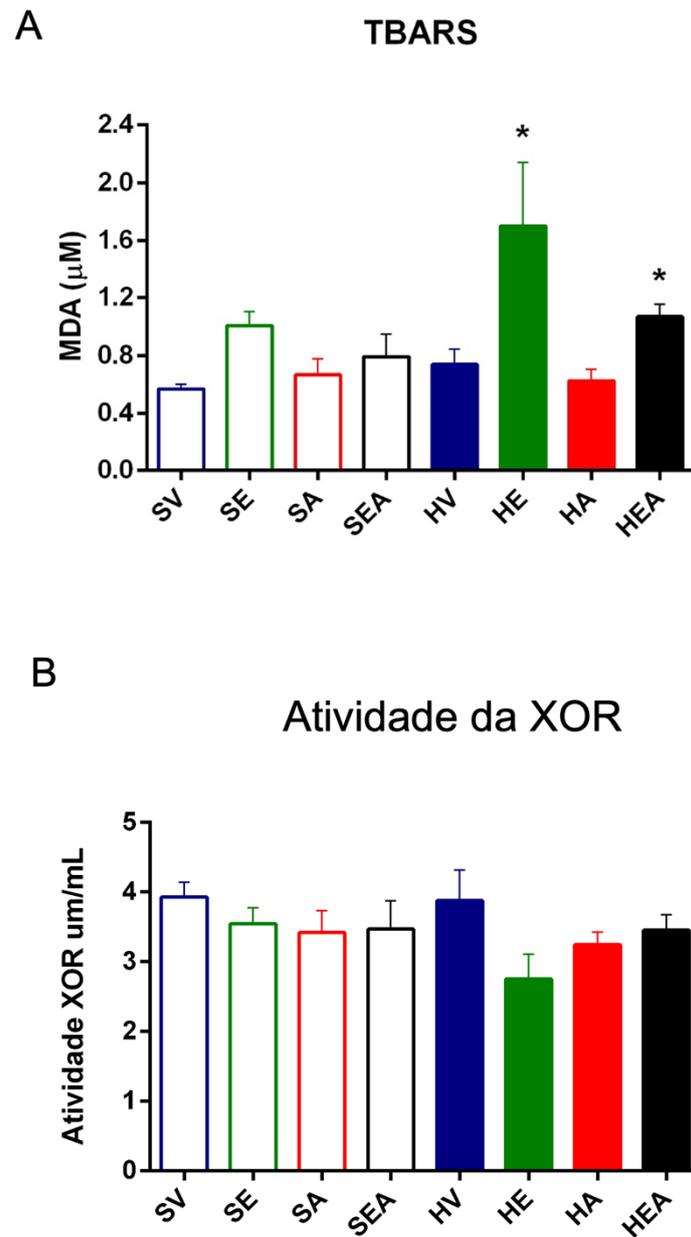


Figura 13. Estresse oxidativo no plasma de animais tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtido pelo método colorimétrico de detecção de produtos da peroxidação lipídica que são reativos ao ácido TBA e pela atividade da enzima XOR. A) Concentração de MDA no plasma de animais de todos os grupos de tratamento * $p < 0,05$ em relação ao grupo Hipertenso+Veículo. B) Atividade da XOR no plasma de animais de todos os grupos de tratamento. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Dados mostrados como média \pm SEM (n=5 a 10 por grupo).

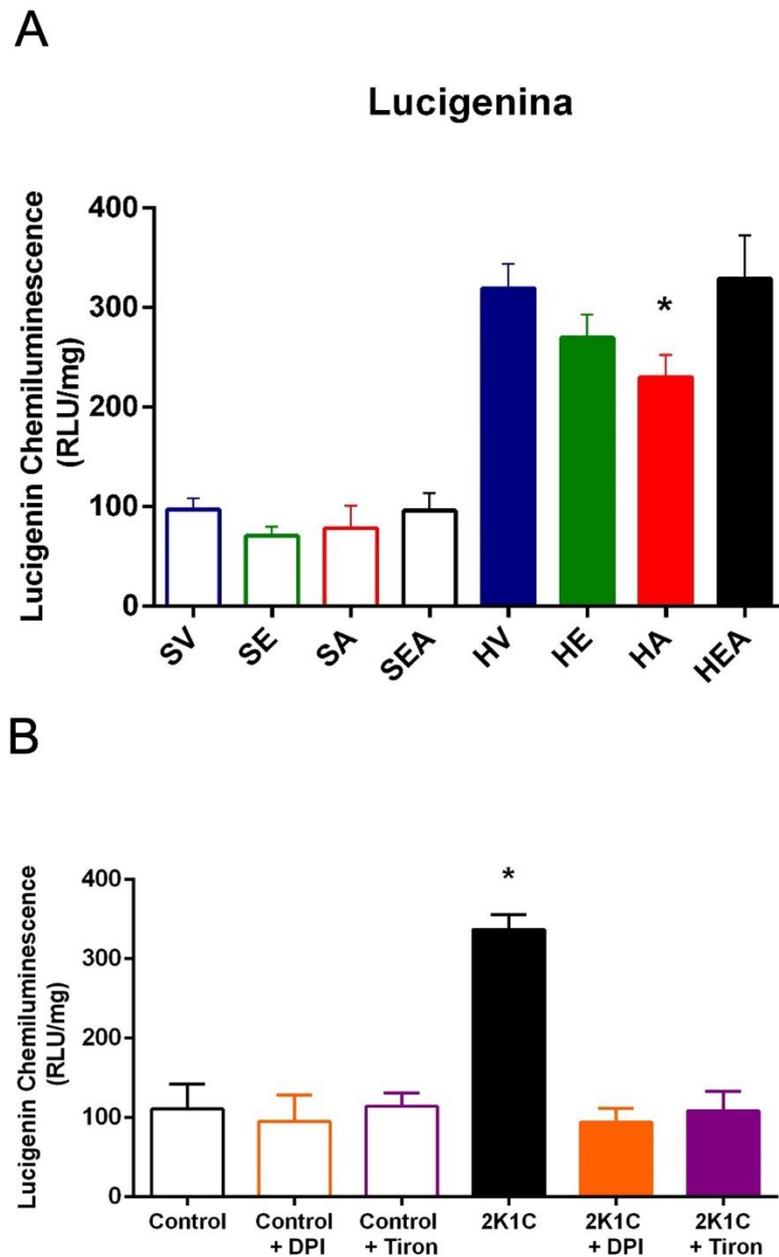


Figura 14: Estresse oxidativo na aorta de animais tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtido pelo método de quimiluminescência da Lucigenina. A) Quimiluminescência da lucigenina na aorta de animais de todos os grupos de tratamento. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Hipertenso+Veículo obtidos pelo teste de anova de duas vias seguida pelo pós teste Tukey, sendo os dois fatores tratamento e doença. Dados mostrados como média \pm SEM (n=4 a 8 por grupo). **B)** Experimento controle em animais Sham e Hipertensos, utilizando DPI e Tiron como inibidores de estresse oxidativo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. Dados mostrados como média \pm SEM (n=3 a 4 por grupo).

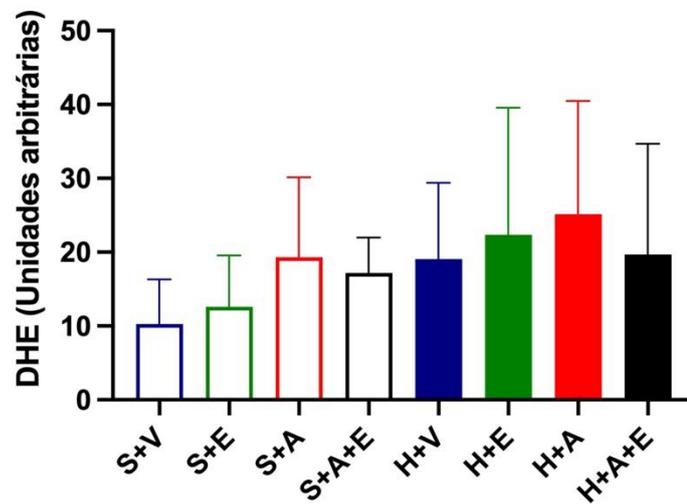
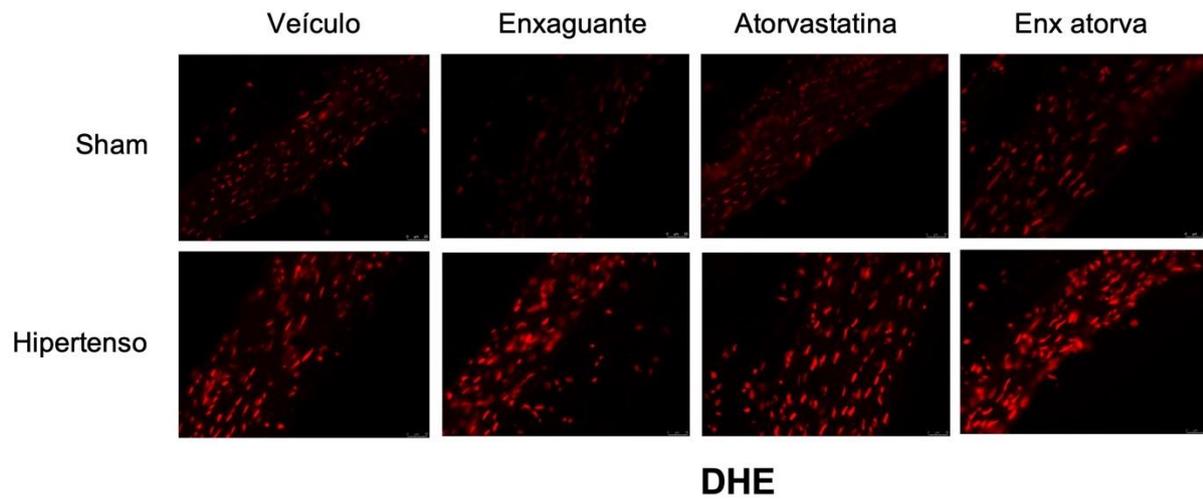


Figura 15: Estresse oxidativo na aorta de animais tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtido pela medida de superóxido através da fluorescência do DHE. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Dados mostrados como média \pm SEM (n=4 a 6 por grupo).

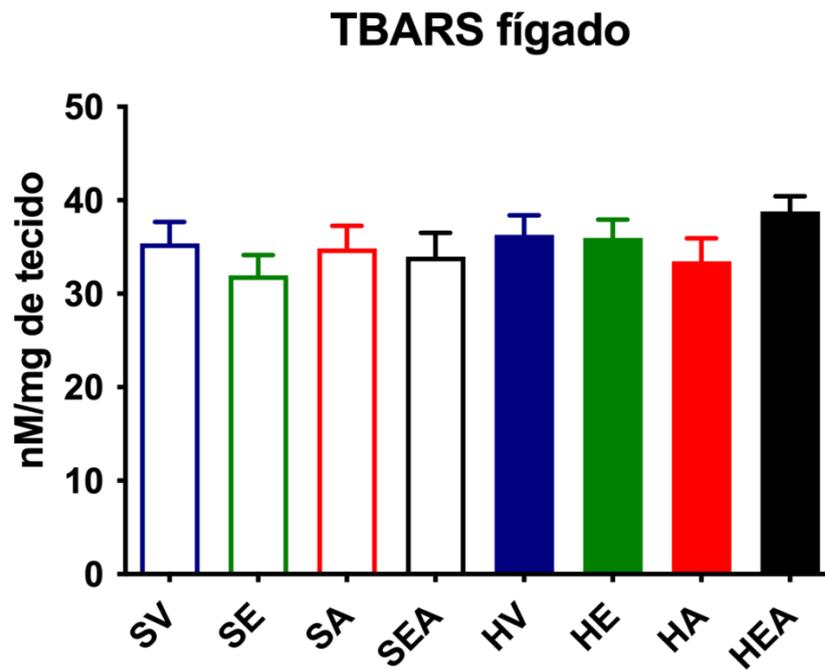


Figura 16: Estresse oxidativo no fígado de animais tratados com Atorvastatina e/ou enxaguante bucal obtido pelo método colorimétrico de detecção de produtos da peroxidação lipídica que são reativos ao ácido TBA. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Dados mostrados como média \pm SEM (n=6 a 10 por grupo).

DISCUSSÃO

6. Discussão

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar que o ciclo êntero salivar do nitrato é importante para os efeitos anti-hipertensivos, de melhora na função vascular, de aumento nos metabólitos do NO, além de efeitos antioxidantes exercidos pela atorvastatina. Desta forma, se torna claro que pelo menos parte dos efeitos benéficos desta droga na hipertensão arterial se devem à sua capacidade de aumentar a disponibilidade de óxido nítrico, favorecendo a via nitrato-nitrito-NO.

Já foram identificados efeitos benéficos da Atorvastatina em diversas situações patológicas, como aterosclerose, hipertensão, diabetes, infarto e até mesmo câncer e sepse (GHASEMI *et al.*, 2019; KRYSIAK *et al.*, 2010; PROFUMO *et al.*, 2014; SAREN; YI; GONG, 2018). Além dos seus efeitos clássicos de diminuição dos níveis de colesterol, as estatinas têm um importante efeito na redução do estresse oxidativo, na inflamação vascular, além de diminuição do remodelamento vascular e cardíaco observado nessas doenças (MOSE *et al.*, 2013). É conhecido que elas atuam no aumento da expressão de fatores de crescimento, ativando vias como a da PI3K/Akt, aumentando a produção de NO por uma regulação positiva na expressão da eNOS, além de atuar na diminuição do superóxido em células endoteliais (ZHANG *et al.*, 2016).

Considerando os efeitos benéficos da atorvastatina em fatores que fazem parte do estabelecimento e progressão da hipertensão arterial e o fato de uma parcela considerável de pacientes ainda ser refratário ao tratamento com os anti-hipertensivos disponíveis, são de extrema importância estudos que corroborem a ideia de que a atorvastatina exerce efeitos anti-hipertensivos e

que busquem explicar por quais mecanismos isso acontece. Em nosso trabalho, o tratamento com atorvastatina na dose de 50 mg/kg diminuiu a pressão arterial sistólica de ratos hipertensos 2R1C, melhorando também a função vascular dependente do endotélio desses animais, aumentando o efeito máximo de relaxamento à Acetilcolina. De maneira semelhante, outros estudos mostram efeitos benéficos da atorvastatina na hipertensão. Quando utilizada em dose única, esta teve efeitos benéficos na resistência vascular periférica, melhorando a resposta à substâncias vasodilatadoras em indivíduos hipertensos do sexo masculino (SALUVEER *et al.*, 2013). Em outro estudo, um tratamento de 26 semanas foi capaz de diminuir a velocidade da onda de pulso (VOP), melhorando a rigidez da aorta e diminuindo a pressão arterial em pacientes hipertensos (KANAKI *et al.*, 2013). Um estudo recente, que tratou indivíduos com hipertensão e dislipidemia em um esquema de dose fixa de associação entre amlodipina e atorvastatina, mostrou uma diminuição na ocorrência de acidentes vasculares, como infarto e miocárdio e AVC (LIN *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, o enxaguante bucal gerou uma diminuição de mais de 90% na contagem de bactérias da cavidade oral por unidades formadoras de colônia em todos os grupos em que o enxaguante bucal foi utilizado. A Clorexidina é um enxaguante bucal amplamente utilizado desde a década de 70 e é, conhecidamente, capaz de diminuir a atividade nitrato redutase da cavidade oral em até 80% por reduzir drasticamente a diversidade da microbiota desta região (BESCOS *et al.*, 2020). Apesar de a atividade nitrato redutase oral não ter sido medida, o fato de o enxaguante bucal, aplicado diariamente nos animais, ter revertido os efeitos anti-hipertensivos e de melhora

na função vascular da atorvastatina, nos sugere que nosso tratamento foi eficaz em interromper o ciclo êntero salivar do nitrato.

A ruptura do ciclo êntero salivar do nitrato pela utilização de enxaguante bucal gera uma redução na conversão de nitrato a nitrito na cavidade oral, o que pode resultar em alterações no acúmulo tecidual desses metabólitos, que pode ser prejudicial especialmente em indivíduos que possuem situações patológicas onde a homeostasia deste ciclo está alterada, como é o caso da hipertensão arterial. A diminuição da formação de nitrito a partir do nitrato dificulta a conversão destes em moléculas bioativas como o NO e os nitrosotiois, visto que o nitrato é uma molécula maior e mais estável do que o nitrito. Portanto, este poderia ser um fator agravante da disfunção endotelial e diminuição da biodisponibilidade de NO observadas na hipertensão.

Em indivíduos saudáveis e hipertensos, foi observado um aumento na pressão arterial com a utilização de clorexidina, sugerindo que a microbiota oral pode ter um importante papel na saúde cardiovascular (BONDONNO *et al.*, 2015; KAPIL *et al.*, 2013a). Também já foi observado uma reversão dos efeitos do nitrito, mas não do nitrato, com a utilização do enxaguante bucal em ratos hipertensos 2R1C. Tal efeito foi atribuído à diminuição da atividade nitrato redutase da cavidade oral e conseqüente redução da formação de nitrosotiois no estômago, espécies envolvidas na redução da pressão arterial ocasionada pelo nitrito de sódio (PINHEIRO; FERREIRA; *et al.*, 2016b). Em suma, esses achados, juntamente com os nossos, nos permitem sugerir que a utilização de enxaguante bucal poderia ser prejudicial a saúde cardiovascular, especialmente em indivíduos hipertensos.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatísticas no que diz respeito às concentrações plasmáticas dos metabólitos de NO nos tecidos (aorta e fígado) foram observados aumentos no nitrato e no nitrito, respectivamente, após o tratamento com atorvastatina. De fato, em um estudo do nosso laboratório, o tratamento com esta droga já tinha se mostrado eficaz em aumentar as concentrações dos metabólitos do NO (nitrito) na aorta e também no plasma (GUIMARÃES *et al.*, 2013). Também já foi observado, na hipercolesterolemia, que a atorvastatina é capaz de inibir a calcificação e aumentar a produção de óxido nítrico sintase na válvula aórtica (RAJAMANNAN *et al.*, 2005). É importante ressaltar que, como o nitrito pode ser oxidado a nitrato, as concentrações deste podem refletir a absorção e o metabolismo do nitrito por diferentes tecidos, indicando que a atorvastatina também pode ter sido capaz de alterar os acúmulos de nitrito mesmo que estas alterações não tenham sido detectadas em nosso trabalho.

Nagasaki e colaboradores demonstram que o tratamento com atorvastatina por duas semanas em indivíduos com uma mutação na região promotora do gene da eNOS relacionada com uma diminuição na transcrição gênica, resultou em aumento nos níveis plasmáticos de nitrito no sangue total e uma diminuição do estresse oxidativo, sendo que não foram observados quaisquer desses efeitos em indivíduos que não possuíam a mutação. Ainda, os autores observaram uma correlação inversa entre os níveis de nitrito no sangue total e marcadores de estresse oxidativo (DEZFULIAN; RAAT; GLADWIN, 2006).

Interessantemente, um estudo realizado em ratos com hipercolesterolemia demonstrou um aumento na expressão da eNOS diante do

tratamento dos animais com atorvastatina (YINJUAN *et al.*, 2019). Estes resultados nos sugerem que, de fato, o tratamento com atorvastatina pode ser benéfico em situações em que há uma redução na produção de NO, já que esta pode restaurar sua biodisponibilidade, seja por aumentar a expressão da eNOS ou por reduzir o estresse oxidativo, ajudando a explicar nossos achados.

O uso concomitante de enxaguante bucal foi capaz de reverter os aumentos na concentração de nitrato na aorta e de nitrito no fígado causados pelo tratamento com atorvastatina nos animais hipertensos. Os níveis plasmáticos e teciduais de nitrato e nitrito podem refletir a atividade da eNOS e, conseqüentemente, a biodisponibilidade de NO, sendo o nitrato o metabólito mais estável (KLEINBONGARD *et al.*, 2003). Isto nos sugere que a clorexidina, de fato, reverte o aumento na biodisponibilidade de óxido nítrico causada pelo tratamento com atorvastatina, mostrando a importância deste aumento para a manutenção dos efeitos anti-hipertensivos e vasculares causados pelo tratamento com este fármaco. Não foram encontradas diferenças no nitrato, nitrito ou RXNO diante do tratamento com atorvastatina em animais Sham. Estes achados são esperados, já que foi observado em outros estudos do nosso grupo que a suplementação na ausência de doença usualmente não gera um aumento na produção de NO (BATISTA *et al.*, 2021; PINHEIRO; FERREIRA; *et al.*, 2016b). Não foram encontradas diferenças estatísticas em relação às concentrações de nitrosolúveis mediante nenhum tratamento utilizado.

O estresse oxidativo e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial o superóxido, participam do estabelecimento da disfunção endotelial e do remodelamento vascular observados na hipertensão

arterial (BÖGER *et al.*, 2018; RIZZI *et al.*, 2009). O aumento na produção de superóxido por enzimas como a NADPH oxidase e a XOR gera um sequestro de óxido nítrico para a formação de peroxinitrito (SESSA *et al.*, 2012). Em nosso estudo, o tratamento com atorvastatina, por aumentar o nitrato no vaso pode estimular a formação endógena de NO, prevenindo a inativação do mesmo pelo superóxido e por outras EROs. Além disso, já foi observado que o nitrito, aumenta o acúmulo do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no núcleo, promovendo a transcrição de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase-1 (SOD1), a catalase (CAT), a glutatona peroxidase (GPX) e a tiorredoxina-1 (TRDX-1) e -2 (TRDX-2) (AMARAL *et al.*, 2019). Outro estudo que corrobora estes achados demonstrou um aumento da atividade da enzima SOD nos eritrócitos de animais hipertensos tratados com nitrito (MONTENEGRO *et al.*, 2012). Apesar de não termos demonstrado com nossos experimentos, é possível sugerir que a atorvastatina ao aumentar metabólitos do NO (como o nitrato na aorta) poderia promover a ativação do nrf 2 e a transcrição de enzimas antioxidantes como as citadas anteriormente. Nesse sentido, o enxaguante bucal pode ter revertido os efeitos antioxidantes da atorvastatina por diminuir a formação dos metabólitos do NO e consequentemente destes agentes antioxidantes.

No que se refere ao estresse oxidativo no plasma, foi interessante observar que a peroxidação lipídica aumentou apenas nos animais hipertensos tratados com enxaguante bucal e que mesmo no grupo em que houve o tratamento concomitante com atorvastatina, esse aumento ainda foi observado. Este é um dado importante que nos sugere que, de fato, pode haver aumento da disfunção endotelial e, consequentemente, de riscos cardiovasculares em

indivíduos hipertensos que fazem uso do enxaguante bucal e que drogas que aumentam a disponibilidade de NO podem não ser capazes de reverter estes efeitos deletérios. Estes dados também corroboram a importância da manutenção do ciclo êntero salivar do nitrato para a saúde cardiovascular.

Na aorta, como esperado, foi encontrado um aumento no estresse oxidativo na hipertensão arterial 2R1C, como já demonstrado em vários outros estudos (BATISTA *et al.*, 2021; MONTENEGRO *et al.*, 2011). A atorvastatina foi capaz de diminuir o superóxido produzido pela NADPH oxidase medido pelo método da lucigenina. De maneira semelhante, estudos realizados em modelos *in vitro* e *in vivo* que mimetizam uma situação de hipercolesterolemia, observaram uma regulação negativa na atividade da NADPH oxidase, acompanhada de inibição da agregação plaquetária diante do tratamento com atorvastatina (MOSCARDÓ *et al.*, 2013; PIGNATELLI *et al.*, 2011). A regulação negativa que a atorvastatina exerce na atividade da NADPH oxidase pode estar relacionada também a sua capacidade de aumentar as concentrações dos metabólitos do NO, já que este efeito é abolido com a utilização de enxaguante bucal e que já foi demonstrado que o nitrito é capaz de reduzir a atividade da NADPH oxidase (GAJOS-DRAUS; DUDA; BERSEWICZ, 2021; MONTENEGRO *et al.*, 2011). No que diz respeito ao superóxido, *in situ*, medido pelo método do DHE, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Também não foram encontradas diferenças estatísticas no que diz respeito ao estresse oxidativo medido pela XOR no plasma ou pelo TBARS no fígado.

O uso do enxaguante bucal foi capaz de reverter os efeitos da atorvastatina na diminuição do superóxido oriundo da NADPH oxidase,

indicando efeitos deletérios da clorexidina no sentido de bloquear efeitos antioxidantes de drogas anti-hipertensivas, provavelmente por causar diminuição da conversão de nitrato a nitrito por interrupção do ciclo êntero salivar e bloquear os efeitos antioxidantes destes ânions. Nosso grupo já encontrou resultado semelhante, onde o uso de enxaguante bucal reverteu o efeito antioxidante da L-arginina no modelo de hipertensão 2R1C (BATISTA *et al.*, 2021).

Em suma, nosso estudo demonstrou um importante efeito anti-hipertensivo e de melhora na função vascular da atorvastatina. Acreditamos que este efeito possa ser mediado pela já conhecida regulação positiva na atividade da eNOS, levando ao aumento da disponibilidade de NO e de seus metabólitos nitrato e nitrito na aorta e no fígado. Além disso, observou-se efeitos antioxidantes na aorta possivelmente mediados pela também já conhecida regulação negativa da NADPH oxidase pela atorvastatina. Todos esses efeitos benéficos foram revertidos pelo tratamento concomitante com a clorexidina, sugerindo que pelo menos parte deles se devam à conversão de nitrato a nitrito na cavidade oral e manutenção do ciclo êntero salivar do nitrato.

Já que tanto a ação antioxidante da atorvastatina quanto a ação na expressão da eNOS culminam no aumento da disponibilidade de NO e de seus metabólitos, acreditamos que este seja o efector da resposta anti-hipertensiva e de melhora na função vascular exercida por essa droga. Faz sentido, portanto, que a interrupção do ciclo êntero salivar, que diminui a formação de nitrito e consequentemente de NO e espécies relacionadas tenha abolido estes efeitos.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

A atorvastatina exerceu efeitos anti-hipertensivos, melhorou a função vascular, aumentou as concentrações de metabólitos do NO (nitrato e nitrito), e diminuiu a produção de superóxido dependente da NADPH oxidase, sendo que o uso concomitante de enxaguante bucal foi capaz de reverter estes efeitos. Portanto, é possível sugerir que os efeitos anti-hipertensivos da atorvastatina se devam, pelo menos em parte, à sua capacidade de aumentar a disponibilidade de NO, seja por interferir na atividade da eNOS ou por exercer efeitos antioxidantes, já que todos os efeitos benéficos foram abolidos pela utilização concomitante com o enxaguante bucal clorexidina. Nesse sentido, a manutenção do ciclo êntero salivar do nitrato e sustentação da via nitrato-nitrito-NO são cruciais para que a atorvastatina exerça seus efeitos na hipertensão arterial.

REFERÊNCIAS

8. Referências

- AL GHORANI, H.; GÖTZINGER, F.; BÖHM, M.; MAHFOUD, F. Arterial hypertension - Clinical trials update 2021. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, vol. 32, no. 1, p. 21–31, Jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.09.007>.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, England, vol. 357, no. 3, p. 593–615, Aug. 2001. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570593>.
- AMARAL, J. H.; RIZZI, E. S.; ALVES-LOPES, R.; PINHEIRO, L. C.; TOSTES, R. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Antioxidant and antihypertensive responses to oral nitrite involves activation of the Nrf2 pathway. **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 141, p. 261–268, Sep. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.06.028>.
- ATIK, F.; AKTAS, G.; KOCAK, M. Z.; ERKUS, E.; SAVLI, H. Analysis of the Factors Related to the Blood Pressure Control in Hypertension. **Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP**, Pakistan, vol. 28, no. 6, p. 423–426, Jun. 2018. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2018.06.423>.
- AZNAOURIDIS, K.; MASOURA, C.; VLACHOPOULOS, C.; TOUSOULIS, D. Statins in Stroke. **Current medicinal chemistry**, United Arab Emirates, vol. 26, no. 33, p. 6174–6185, 2019. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190620104539>.
- BATISTA, R. I. M.; NOGUEIRA, R. C.; FERREIRA, G. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; DAMACENA-ANGELIS, C.; PINHEIRO, L. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Antiseptic mouthwash inhibits antihypertensive and vascular protective effects of L-arginine. **European journal of pharmacology**, Netherlands, vol. 907, p. 174314, Sep. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174314>.
- BENJAMIN, N.; O'DRISCOLL, F.; DOUGALL, H.; DUNCAN, C.; SMITH, L.; GOLDEN, M.; MCKENZIE, H. Stomach NO synthesis. **Nature**, England, vol. 368, no. 6471, p. 502, Apr. 1994. <https://doi.org/10.1038/368502a0>.
- BESCOS, R.; ASHWORTH, A.; CUTLER, C.; BROOKES, Z. L.; BELFIELD, L.; RODILES, A.; CASAS-AGUSTENCH, P.; FARNHAM, G.; LIDDLE, L.; BURLEIGH, M.; WHITE, D.; EASTON, C.; HICKSON, M. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. **Scientific reports**, vol. 10, no. 1, p. 5254, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61912-4>.
- BODE-BOGER, S. M.; SCALERA, F.; IGNARRO, L. J. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. **Pharmacology & therapeutics**, England, vol. 114, no. 3, p. 295–306, Jun. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.03.002>.
- BÖGER, R. H.; RON, E. S.; NESHER, N.; FROLKIS, I.; SCHWARTZ, D.; CHERNICHOVSKI, T.; LEVI, S.; PRI-PAZ, Y.; CHERNIN, G.; SHTABSKY, A.; BENGAL, Y.; PAZ, Y.; SCHWARTZ, I. F.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; LACCHINI, R.; TANUS-SANTOS, J. E.; PINHEIRO, L. C.; TANUS-SANTOS, J. E.; FÖRSTERMANN, U.; ... ZOCCALI, C. Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. **Free Radical Biology and Medicine**, United States, vol. 43, no. 3, p. 391–397, Oct. 2018. DOI 10.1042/CS20030412. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553744>.

- BONDONNO, C. P.; CROFT, K. D.; HODGSON, J. M. Dietary Nitrate, Nitric Oxide, and Cardiovascular Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 56, no. 12, p. 2036–2052, 2016. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.811212>.
- BONDONNO, C. P.; LIU, A. H.; CROFT, K. D.; CONSIDINE, M. J.; PUDDEY, I. B.; WOODMAN, R. J.; HODGSON, J. M. Antibacterial mouthwash blunts oral nitrate reduction and increases blood pressure in treated hypertensive men and women. **American Journal of Hypertension**, vol. 28, no. 5, p. 572–575, 2015. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu192>.
- BRONIOWSKA, K. A.; HOGG, N. The chemical biology of S-nitrosothiols. **Antioxidants and Redox Signaling**, vol. 17, no. 7, p. 969–980, 2012. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4590>.
- BRYAN, N. S.; TRIBBLE, G.; ANGELOV, N. Oral Microbiome and Nitric Oxide: the Missing Link in the Management of Blood Pressure. **Current Hypertension Reports**, vol. 19, no. 4, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11906-017-0725-2>.
- CURRAN, M. P. Amlodipine/Atorvastatin: a review of its use in the treatment of hypertension and dyslipidaemia and the prevention of cardiovascular disease. **Drugs**, New Zealand, vol. 70, no. 2, p. 191–213, 2010. <https://doi.org/10.2165/11204420-000000000-00000>.
- CYR, A. R.; HUCKABY, L. V.; SHIVA, S. S.; ZUCKERBRAUN, B. S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. **Critical care clinics**, vol. 36, no. 2, p. 307–321, Apr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>.
- DE LA RIVA, I. J.; ROSON, M. I.; VEGA, G. W.; SPEZIALE, N.; ALBORNOZ, L. E.; PALUMBO, E. L.; FERRERO, A. J.; DAMIANO, P. F. Effect of oral L-arginine administration for three weeks in two kidney-two clip hypertensive rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, vol. 108, no. 5, p. 415–421, 2000. [https://doi.org/Doi 10.1076/0954-5794\(200005\)108:05.415.4298](https://doi.org/Doi%2010.1076/0954-5794(200005)108:05%3C415:ID%3E2.0.CO;2).
- DELGADO-MONTERO, A.; ZAMORANO, J. L. Atorvastatin calcium plus amlodipine for the treatment of hypertension. **Expert opinion on pharmacotherapy**, England, vol. 13, no. 18, p. 2673–2685, Dec. 2012. <https://doi.org/10.1517/14656566.2012.742064>.
- DEZFULIAN, C.; RAAT, N. J. H.; GLADWIN, M. T. A pharmacogenomic study of atorvastatin effects on eNOS activity: do “statins” modulate blood nitrite levels and intravascular oxidant stress in susceptible individuals? **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 41, no. 7, p. 1041–1043, Oct. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.034>.
- DHARMASHANKAR, K.; WIDLANSKY, M. E. Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. **Current hypertension reports**, vol. 12, no. 6, p. 448–455, Dec. 2010. <https://doi.org/10.1007/s11906-010-0150-2>.
- DOROSZKO, A.; JANUS, A.; SZAHIDEWICZ-KRUPSKA, E.; MAZUR, G.; DERKACZ, A. Resistant Hypertension. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, Poland, vol. 25, no. 1, p. 173–183, 2016. <https://doi.org/10.17219/acem/58998>.
- ENDRES, M.; LAUFS, U. Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. **Stroke**, United States, vol. 35, no. 11 Suppl 1, p. 2708–2711, Nov. 2004. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143319.73503.38>.

- FAASSEN, V. E. E.; BAHRAMI, S.; FEELISCH, M.; HOGG, N.; KELM, M.; KOZLOV, V. A.; LI, H.; LUNDBERG, J. O.; MASON, R.; RASSAF, T.; SAMOUILOV, A.; SLAMASCHWOK, A.; SHIVA, S. NIH Public Access. vol. 29, no. 5, p. 683–741, 2010. <https://doi.org/10.1002/med.20151.Nitrite>.
- FARNIER, M.; DAVIGNON, J. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. **The American journal of cardiology**, United States, vol. 82, no. 4B, p. 3J-10J, Aug. 1998. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(98\)00423-8](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(98)00423-8).
- FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N.; BRYAN, N. S.; JOURD'HEUIL, D.; KELM, M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. **The FASEB Journal**, United States, vol. 16, no. 13, p. 1775–1785, Nov. 2002. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0363com>.
- FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, vol. 33, no. 7, p. 829–837, 2012. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
- FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological Reviews**, United States, vol. 62, no. 3, p. 525–563, Sep. 2010. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002907>.
- FUCHS, F. D.; WHELTON, P. K. High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, United States, vol. 75, no. 2, p. 285–292, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14240>.
- FURCHGOTT, R F; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, England, vol. 288, no. 5789, p. 373–376, Nov. 1980. .
- FURCHGOTT, Robert F; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, vol. 288, no. 5789, p. 373–376, 1980. <https://doi.org/10.1038/288373a0>.
- GAJOS-DRAUS, A.; DUDA, M.; BERESEWICZ, A. Exercise and nitrite prevent and Nω-nitro-L-arginine methyl ester reproduces imbalance in the nuclear factor-κB/NADPH oxidase 2 and nuclear factor erythroid 2-related factor 2/NADPH oxidase 4/endothelial nitric oxide synthase systems in diabetes. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, Poland, vol. 72, no. 5, Oct. 2021. <https://doi.org/10.26402/jpp.2021.5.03>.
- GALLEY, H. F.; WEBSTER, N. R. Physiology of the endothelium. **British Journal of Anaesthesia**, vol. 93, no. 1, p. 105–113, 2004. DOI 10.1093/bja/ae163. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/bja/ae163>.
- GHASEMI, M.; MALEK, M.; JAVANMARD, S. H.; GHASEMI, A.; ESFAHANI, H. N.; VASEGHI, G. Atorvastatin enhances apoptotic effects of tamoxifen on melanoma cancer cells. **Bratislavské lekárske listy**, Slovakia, vol. 120, no. 10, p. 752–756, 2019. https://doi.org/10.4149/BLL_2019_125.
- GHOSH, S. M.; KAPIL, V.; FUENTES-CALVO, I.; BUBB, K. J.; PEARL, V.; MILSOM, A. B.; KHAMBATA, R.; MALEKI-TOYSERKANI, S.; YOUSUF, M.; BENJAMIN, N.; WEBB, A. J.; CAULFIELD, M. J.; HOBBS, A. J.; AHLUWALIA, A. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**,

- United States, vol. 61, no. 5, p. 1091–1102, May 2013. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00933>.
- GODO, S.; SHIMOKAWA, H. Endothelial Functions. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, United States, vol. 37, no. 9, p. e108–e114, Sep. 2017. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309813>.
- GOH, C. E.; BOHN, B.; MAROTZ, C.; MOLINSKY, R.; ROY, S.; PASTER, B. J.; CHEN, C.-Y.; ROSENBAUM, M.; YUZEFPOLSKAYA, M.; COLOMBO, P. C.; DESVARIEUX, M.; PAPAPANOU, P. N.; JACOBS, D. R. J.; KNIGHT, R.; DEMMER, R. T. Nitrite Generating and Depleting Capacity of the Oral Microbiome and Cardiometabolic Risk: Results from ORIGINS. **Journal of the American Heart Association**, vol. 11, no. 10, p. e023038, May 2022. <https://doi.org/10.1161/JAHA.121.023038>.
- GUIMARÃES, D. A.; RIZZI, E.; CERON, C. S.; MARTINS-OLIVEIRA, A.; GERLACH, R. F.; SHIVA, S.; TANUS-SANTOS, J. E. Atorvastatin and sildenafil decrease vascular TGF- β levels and MMP-2 activity and ameliorate arterial remodeling in a model of renovascular hypertension. **Redox biology**, vol. 6, p. 386–395, Dec. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.017>.
- GUIMARÃES, D. A.; RIZZI, E.; CERON, C. S.; PINHEIRO, L. C.; GERLACH, R. F.; TANUS-SANTOS, J. E. Atorvastatin and sildenafil lower blood pressure and improve endothelial dysfunction, but only atorvastatin increases vascular stores of nitric oxide in hypertension. **Redox biology**, vol. 1, no. 1, p. 578–585, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.11.004>.
- HAERIAN-ARDAKANI, A.; REZAEI, M.; TALEBI-ARDAKANI, M.; KESHAVARZ VALIAN, N.; AMID, R.; MEIMANDI, M.; ESMAILNEJAD, A.; ARIANKIA, A. Comparison of Antimicrobial Effects of Three Different Mouthwashes. **Iranian journal of public health**, Iran, vol. 44, no. 7, p. 997–1003, Jul. 2015. .
- HEZEL, M. P.; WEITZBERG, E. The oral microbiome and nitric oxide homeostasis. **Oral Diseases**, vol. 21, no. 1, p. 7–16, 2015. <https://doi.org/10.1111/odi.12157>.
- HYDE, E. R.; ANDRADE, F.; VAKSMAN, Z.; PARTHASARATHY, K.; JIANG, H.; PARTHASARATHY, D. K.; TORREGROSSA, A. C.; TRIBBLE, G.; KAPLAN, H. B.; PETROSINO, J. F.; BRYAN, N. S. Metagenomic analysis of nitrate-reducing bacteria in the oral cavity: Implications for nitric oxide homeostasis. **PLoS ONE**, United States, vol. 9, no. 3, p. e88645, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088645>.
- IGNARRO, L. J. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. **Kidney international. Supplement**, United States, vol. 55, p. S2-5, Jun. 1996. .
- IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, vol. 84, no. 24, p. 9265–9269, Dec. 1987. .
- INCALZA, M. A.; D'ORIA, R.; NATALICCHIO, A.; PERRINI, S.; LAVIOLA, L.; GIORGINO, F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular pharmacology**, United States, vol. 100, p. 1–19, Jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>.

- JJ, D.; BENJAMIN, N.; MP, H.; ROGERS, M.; RP, A.; DOEL, J. J.; HECTOR, M. P.; ROGERS, M.; PATRICK, R.; BENJAMIN, N.; HECTOR, M. P.; ROGERS, M.; ALLAKER, R. P. Evaluation of bacterial nitrate reduction in the human oral cavity. **European journal of oral sciences**, England, vol. 113, no. 1, p. 14–19, Feb. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00184.x>.
- KANAKI, A. I.; SARAFIDIS, P. A.; GEORGIANOS, P. I.; KANAVOS, K.; TZIOLAS, I. M.; ZEBEKAKIS, P. E.; LASARIDIS, A. N. Effects of low-dose atorvastatin on arterial stiffness and central aortic pressure augmentation in patients with hypertension and hypercholesterolemia. **American journal of hypertension**, United States, vol. 26, no. 5, p. 608–616, May 2013. <https://doi.org/10.1093/ajh/hps098>.
- KAPIL, V.; HAYDAR, S. M. A.; PEARL, V.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; AHLUWALIA, A. Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 55, p. 93–100, 2013a. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.013>.
- KAPIL, V.; HAYDAR, S. M. A.; PEARL, V.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; AHLUWALIA, A. Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 55, p. 93–100, 2013b. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.013. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0891584912018229/1-s2.0-S0891584912018229-main.pdf?_tid=ce7035d8-6c1f-11e4-a1e1-00000aacb35e&acdnat=1415984639_894eb263dddd59d44ee9dfb8fb2cb838.
- KLEINBONGARD, P.; DEJAM, A.; LAUER, T.; RASSAF, T.; SCHINDLER, A.; PICKER, O.; SCHEEREN, T.; GÖDECKE, A.; SCHRADER, J.; SCHULZ, R.; HEUSCH, G.; SCHAUB, G. A.; BRYAN, N. S.; FEELISCH, M.; KELM, M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 35, no. 7, p. 790–796, Oct. 2003. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00406-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00406-4).
- KOCH, C. D.; GLADWIN, M. T.; FREEMAN, B. A.; LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; MORRIS, A. Enterosalivary nitrate metabolism and the microbiome: Intersection of microbial metabolism, nitric oxide and diet in cardiac and pulmonary vascular health. **Free radical biology & medicine**, vol. 105, p. 48–67, Apr. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.015>.
- KOGAWA, A. C.; PIRES, A. E. D. T.; SALGADO, H. R. N. Atorvastatin: A Review of Analytical Methods for Pharmaceutical Quality Control and Monitoring. **Journal of AOAC International**, England, vol. 102, no. 3, p. 801–809, May 2019. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0200>.
- KRYSIK, R.; GDULA-DYMEK, A.; BACHOWSKI, R.; OKOPIEN, B. Pleiotropic effects of atorvastatin and fenofibrate in metabolic syndrome and different types of pre-diabetes. **Diabetes care**, vol. 33, no. 10, p. 2266–2270, Oct. 2010. <https://doi.org/10.2337/dc10-0272>.
- LANDIM, M. B. P.; CASELLA FILHO, A.; CHAGAS, A. C. P. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelial dysfunction: implications for atherogenesis. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, vol. 64, no. 5, p. 471–478, May 2009. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322009000500015>.
- LAUER, T.; PREIK, M.; RASSAF, T.; STRAUER, B. E.; DEUSSEN, A.; FEELISCH, M.;

- KELM, M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, vol. 98, no. 22, p. 12814–12819, Oct. 2001. <https://doi.org/10.1073/pnas.221381098>.
- LECLERC, P. C.; LANCTOT, P. M.; AUGER-MESSIER, M.; ESCHER, E.; LEDUC, R.; GUILLEMETTE, G. S-nitrosylation of cysteine 289 of the AT 1 receptor decreases its binding affinity for angiotensin II. , p. 306–313, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706725>.
- LENNERNÄS, H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. **Clinical pharmacokinetics**, Switzerland, vol. 42, no. 13, p. 1141–1160, 2003. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342130-00005>.
- LI, Z.; XI, X.; GU, M.; FEIL, R.; YE, R. D.; EIGENTHALER, M.; HOFMANN, F.; DU, X. A stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. **Cell**, United States, vol. 112, no. 1, p. 77–86, Jan. 2003. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)01254-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)01254-0).
- LIAO, J. K.; LAUFS, U. Pleiotropic effects of statins. **Annual review of pharmacology and toxicology**, vol. 45, p. 89–118, 2005. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748>.
- LIN, C.-P.; TUNG, Y.-C.; HSIAO, F.-C.; YANG, C.-H.; KAO, Y.-W.; LIN, Y.-S.; CHU, Y.-C.; CHU, P.-H. Fixed-dose combination of amlodipine and atorvastatin improves clinical outcomes in patients with concomitant hypertension and dyslipidemia. **Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)**, vol. 22, no. 10, p. 1846–1853, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1111/jch.14016>.
- LIU, X.; XU, X.; SHANG, R.; CHEN, Y. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as an important risk factor for the increased cardiovascular diseases and heart failure in chronic kidney disease. **Nitric oxide : biology and chemistry**, United States, vol. 78, p. 113–120, Jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.06.004>.
- LUNDBERG, J. O.; CARLSTRÖM, M.; WEITZBERG, E. Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease. **Cell metabolism**, United States, vol. 28, no. 1, p. 9–22, Jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.007>.
- LUNDBERG, J. O. N.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. M.; ALVING, K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: Measurements in expelled air. **Gut**, England, vol. 35, no. 11, p. 1543–1546, Nov. 1994. <https://doi.org/10.1136/gut.35.11.1543>.
- LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; COLE, J. A.; BENJAMIN, N. Nitrate, bacteria and human health. **Nature Reviews Microbiology**, England, vol. 2, no. 7, p. 593–602, Jul. 2004. <https://doi.org/10.1038/nrmicro929>.
- LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 7, no. 2, p. 156–167, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrd2466>.
- MARON, B. A.; TANG, S.-S.; LOSCALZO, J. S-nitrosothiols and the S-nitrosoproteome of the cardiovascular system. **Antioxidants & redox signaling**, vol. 18, no. 3, p. 270–287, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4744>.
- MCKEAGE, K.; SIDDIQUI, M. A. A. Amlodipine/atorvastatin fixed-dose combination: a review of its use in the prevention of cardiovascular disease and in the treatment of hypertension and dyslipidemia. **American journal of cardiovascular drugs :**

- drugs, devices, and other interventions**, New Zealand, vol. 8, no. 1, p. 51–67, 2008. <https://doi.org/10.2165/00129784-200808010-00007>.
- MILLER, M. L.; WRIGHT, C. C.; BROWNE, B. Lipid-lowering medications for children and adolescents. **Journal of clinical lipidology**, United States, vol. 9, no. 5 Suppl, p. S67-76, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2015.06.013>.
- MONCADA, S. Nitric oxide. **Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension**, England, vol. 12, no. 10, p. S35-9, Dec. 1994. .
- MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; PINHEIRO, L. C.; SAKAMOTO, E. K.; FERREIRA, G. C.; REIS, R. I.; MARCAL, D. M. O.; PEREIRA, R. P.; TANUS-SANTOS, J. E. Sodium nitrite downregulates vascular NADPH oxidase and exerts antihypertensive effects in hypertension. **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 51, no. 1, p. 144–152, Jul. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.005>.
- MONTENEGRO, M. F.; PINHEIRO, L. C.; AMARAL, J. H.; MARCAL, D. M. O.; PALEI, A. C. T.; COSTA-FILHO, A. J.; TANUS-SANTOS, J. E. Antihypertensive and antioxidant effects of a single daily dose of sodium nitrite in a model of renovascular hypertension. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, Germany, vol. 385, no. 5, p. 509–517, May 2012. <https://doi.org/10.1007/s00210-011-0712-0>.
- MOSCARDÓ, A.; VALLÉS, J.; LATORRE, A.; MADRID, I.; SANTOS, M. T. Reduction of platelet cytosolic phospholipase A2 activity by atorvastatin and simvastatin: biochemical regulatory mechanisms. **Thrombosis research**, United States, vol. 131, no. 4, p. e154-9, Apr. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.01.007>.
- MOSE, F. H.; LARSEN, T.; BECH, J. N.; PEDERSEN, E. B. Effects of atorvastatin on systemic and renal nitric oxide in healthy man. **Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y. : 1993)**, England, vol. 35, no. 2, p. 148–157, 2013. <https://doi.org/10.3109/10641963.2012.702835>.
- MOSS, M. B.; BRUNINI, T. M. C.; SOARES DE MOURA, R.; NOVAES MALAGRIS, L. E.; ROBERTS, N. B.; ELLORY, J. C.; MANN, G. E.; MENDES RIBEIRO, A. C. Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. **Clinical Science**, vol. 107, no. 4, p. 391–397, 2004. <https://doi.org/10.1042/CS20030412>.
- MÜNZEL, T.; FEIL, R.; MÜLSCH, A.; LOHMANN, S. M.; HOFMANN, F.; WALTER, U. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by cyclic guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. **Circulation**, vol. 108, no. 18, p. 2172–2183, 2003. .
- NESHER, N.; FROLKIS, I.; SCHWARTZ, D.; CHERNICHOVSKI, T.; LEVI, S.; PRI-PAZ, Y.; CHERNIN, G.; SHTABSKY, A.; BEN-GAL, Y.; PAZ, Y.; SCHWARTZ, I. F. L-Arginine improves endothelial function, independently of arginine uptake, in aortas from chronic renal failure female rats. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, vol. 306, no. 4, p. F449--F456, 2014. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00457.2013>.
- NING, D.; YANG, X.; WANG, T.; JIANG, Q.; YU, J.; WANG, D. Atorvastatin treatment ameliorates cardiac function and remodeling induced by isoproterenol attack through mitigation of ferroptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, vol. 574, p. 39–47, Oct. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.017>.

- NOGUEIRA, R. C.; PINHEIRO, L. C.; SANCHES-LOPES, J. M.; PARENTE, J. M.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; CONDE, S. O.; CASTRO, M. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Omeprazole induces vascular remodeling by mechanisms involving xanthine oxidoreductase and matrix metalloproteinase activation. **Biochemical pharmacology**, England, vol. 190, p. 114633, Aug. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114633>.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, United States, vol. 95, no. 2, p. 351–358, Jun. 1979. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
- PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, England, vol. 333, no. 6174, p. 664–666, Jun. 1988. <https://doi.org/10.1038/333664a0>.
- PARK, M.; SANDNER, P.; KRIEG, T. cGMP at the centre of attention: emerging strategies for activating the cardioprotective PKG pathway. **Basic research in cardiology**, vol. 113, no. 4, p. 24, May 2018. <https://doi.org/10.1007/s00395-018-0679-9>.
- PERTICONE, F.; SCIACQUA, A.; MAIO, R.; PERTICONE, M.; MAAS, R.; BOGER, R. H.; TRIPEPI, G.; SESTI, G.; ZOCCALI, C. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. **Journal of the American College of Cardiology**, United States, vol. 46, no. 3, p. 518–523, Aug. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.04.040>.
- PETERSSON, J.; CARLSTRÖM, M.; SCHREIBER, O.; PHILLIPSON, M.; CHRISTOFFERSSON, G.; JÄGARE, A.; ROOS, S.; JANSSON, E. Å.; PERSSON, A. E. G.; LUNDBERG, J. O.; HOLM, L. Gastroprotective and blood pressure lowering effects of dietary nitrate are abolished by an antiseptic mouthwash. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 46, no. 8, p. 1068–1075, 2009. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.011. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.01.011>.
- PIGNATELLI, P.; CARNEVALE, R.; DI SANTO, S.; BARTIMOCCIA, S.; SANGUIGNI, V.; LENTI, L.; FINOCCHI, A.; MENDOLICCHIO, L.; SORESINA, A. R.; PLEBANI, A.; VIOLI, F. Inherited human gp91phox deficiency is associated with impaired isoprostane formation and platelet dysfunction. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, United States, vol. 31, no. 2, p. 423–434, Feb. 2011. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.217885>.
- PINHEIRO, L. C.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; PORTELLA, R. L.; CERON, C. S.; MONTENEGRO, M. F.; TOLEDO, J. C. J.; TANUS-SANTOS, J. E. Gastric S-nitrosothiol formation drives the antihypertensive effects of oral sodium nitrite and nitrate in a rat model of renovascular hypertension. **Free radical biology & medicine**, United States, vol. 87, p. 252–262, Oct. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.038>.
- PINHEIRO, L. C.; FERREIRA, G. C.; AMARAL, J. H.; PORTELLA, R. L.; TELLA, S. de O. C.; PASSOS, M. A.; TANUS-SANTOS, J. E. Oral nitrite circumvents antiseptic mouthwash-induced disruption of enterosalivary circuit of nitrate and promotes nitrosation and blood pressure lowering effect. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 101, no. October, p. 226–235, 2016a. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.013>.
- PINHEIRO, L. C.; FERREIRA, G. C.; AMARAL, J. H.; PORTELLA, R. L.; TELLA, S. de O.

- C.; PASSOS, M. A.; TANUS-SANTOS, J. E. Oral nitrite circumvents antiseptic mouthwash-induced disruption of enterosalivary circuit of nitrate and promotes nitrosation and blood pressure lowering effect. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 101, no. October, p. 226–235, 2016b. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.013>.
- PINHEIRO, L. C.; MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; OLIVEIRA, A. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Free Radical Biology and Medicine Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 53, no. 4, p. 701–709, 2012. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.001>.
- PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA-PAULA, G. H.; PORTELLA, R. L.; GUIMARÃES, D. A.; DE ANGELIS, C. D.; TANUS-SANTOS, J. E. Omeprazole impairs vascular redox biology and causes xanthine oxidoreductase-mediated endothelial dysfunction. **Redox Biology**, vol. 9, p. 134–143, 2016. DOI 10.1016/j.redox.2016.08.001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.001>.
- POTENZA, M. A.; GAGLIARDI, S.; NACCI, C.; CARRATU', M. R.; MONTAGNANI, M. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. **Current medicinal chemistry**, United Arab Emirates, vol. 16, no. 1, p. 94–112, 2009. <https://doi.org/10.2174/092986709787002853>.
- PROFUMO, E.; BUTTARI, B.; SASO, L.; RIGANO, R. Pleiotropic effects of statins in atherosclerotic disease: focus on the antioxidant activity of atorvastatin. **Current topics in medicinal chemistry**, United Arab Emirates, vol. 14, no. 22, p. 2542–2551, 2014. <https://doi.org/10.2174/1568026614666141203130324>.
- QIN, L.; LIU, X.; SUN, Q.; FAN, Z.; XIA, D.; DING, G.; ONG, H. L.; ADAMS, D.; GAHL, W. A.; ZHENG, C.; QI, S.; JIN, L.; ZHANG, C.; GU, L.; HE, J.; DENG, D.; AMBUDKAR, I. S.; WANG, S. Sialin (SLC17A5) functions as a nitrate transporter in the plasma membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 109, no. 33, p. 13434–13439, Aug. 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116633109>.
- RAJAMANNAN, N. M.; SUBRAMANIAM, M.; STOCK, S. R.; STONE, N. J.; SPRINGETT, M.; IGNATIEV, K. I.; MCCONNELL, J. P.; SINGH, R. J.; BONOW, R. O.; SPELSBERG, T. C. Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. **Heart (British Cardiac Society)**, vol. 91, no. 6, p. 806–810, Jun. 2005. <https://doi.org/10.1136/hrt.2003.029785>.
- REAMY, B. V.; WILLIAMS, P. M.; KUCKEL, D. P. Prevention of Cardiovascular Disease. **Primary Care - Clinics in Office Practice**, vol. 45, no. 1, p. 25–44, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.11.003>.
- RIZZI, E.; CASTRO, M. M.; FERNANDES, K.; BARBOSA, F. J.; ARISI, G. M.; GARCIA-CAIRASCO, N.; BENDHACK, L. M.; TANUS-SANTOS, J. E.; GERLACH, R. F. Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. **Archives of toxicology**, Germany, vol. 83, no. 5, p. 439–449, May 2009. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0363-1>.
- SAFFARI, F.; DANESH, M.; ZANDI, H.; HEIDARZADEH, H.; HASSAN, M.; DANESH ARDAKANI, M.; ZANDI, H.; HEIDARZADEH, H.; MOSHAFI, M. H. The Effects of

- Chlorhexidine and Persica Mouthwashes on Colonization of *Streptococcus mutans* on Fixed Orthodontics O-rings. **Journal of dentistry (Shiraz, Iran)**, Iran, vol. 16, no. 1, p. 54–57, Mar. 2015. .
- SALUVEER, O.; BERGH, N.; GROTE, L.; ANDERSSON, O.; HRAFNKELSDÓTTIR, T. J.; WIDGREN, B. R. Acute vascular effects of atorvastatin in hypertensive men: a pilot study. **Scandinavian cardiovascular journal: SCJ**, England, vol. 47, no. 5, p. 275–280, Oct. 2013. <https://doi.org/10.3109/14017431.2013.821204>.
- SAREN, G.; YI, X.; GONG, Y. Pleiotropic effects and biological activities of atorvastatin: The sun never set. **International journal of cardiology**, Netherlands, vol. 254, p. 261, Mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.06.097>.
- SATO-SUZUKI, Y.; WASHIO, J.; WICAKSONO, D. P.; SATO, T.; FUKUMOTO, S.; TAKAHASHI, N. Nitrite-producing oral microbiome in adults and children. **Scientific reports**, vol. 10, no. 1, p. 16652, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73479-1>.
- SELEMIDIS, S.; DUSTING, G. J.; PESHAVARIYA, H.; KEMP-HARPER, B. K.; DRUMMOND, G. R. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. **Cardiovascular research**, England, vol. 75, no. 2, p. 349–358, Jul. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.030>.
- SELLAK, H.; CHOI, C.; DEY, N. B.; LINCOLN, T. M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of cGMP-dependent protein kinase (PKG-I): pathophysiological significance. **Cardiovascular research**, vol. 97, no. 2, p. 200–207, Feb. 2013. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs327>.
- SESSA, W. C.; FO, U.; FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, England, vol. 33, no. 7, p. 829–37, 837a-837d, Apr. 2012. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
- TENOPOULOU, M.; DOULIAS, P.-T. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. **F1000Research**, vol. 9, 2020. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19998.1>.
- VANHATALO, A.; BLACKWELL, J. R.; L'HEUREUX, J. E.; WILLIAMS, D. W.; SMITH, A.; VAN DER GIEZEN, M.; WINYARD, P. G.; KELLY, J.; JONES, A. M. Nitrate-responsive oral microbiome modulates nitric oxide homeostasis and blood pressure in humans. **Free radical biology & medicine**, vol. 124, p. 21–30, Aug. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.078>.
- VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H.; FELETOU, M.; TANG, E. H. C. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta physiologica (Oxford, England)**, England, vol. 219, no. 1, p. 22–96, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>.
- WADA, K.; INOUE, K.; HAGIWARA, M. Identification of methylated proteins by protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1, with a new expression cloning strategy. **Biochimica et biophysica acta**, Netherlands, vol. 1591, no. 1–3, p. 1–10, Aug. 2002. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(02\)00202-1](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(02)00202-1).
- WEBB, A.; BOND, R.; MCLEAN, P.; UPPAL, R.; BENJAMIN, N.; AHLUWALIA, A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. **Proceedings of the National Academy of**

- Sciences of the United States of America**, vol. 101, no. 37, p. 13683–13688, Sep. 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402927101>.
- WHELTON, P. K.; CAREY, R. M.; ARONOW, W. S.; CASEY, D. E.; COLLINS, K. J.; DENNISON HIMMELFARB, C.; DEPALMA, S. M.; GIDDING, S.; JAMERSON, K. A.; JONES, D. W.; MACLAUGHLIN, E. J.; MUNTNER, P.; OVBIAGELE, B.; SMITH, S. C.; SPENCER, C. C.; STAFFORD, R. S.; TALER, S. J.; THOMAS, R. J.; WILLIAMS, K. A.; ... WRIGHT, J. T. Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 71, no. 19, p. e127 LP-e248, 15 May 2018. DOI 10.1016/j.jacc.2017.11.006. Available at: <http://www.onlinejacc.org/content/71/19/e127.abstract>.
- WINK, D. A.; NIMS, R. W.; DARBYSHIRE, J. F.; CHRISTODOULOU, D.; HANBAUER, I.; COX, G. W.; LAVAL, F.; LAVAL, J.; COOK, J. A.; KRISHNA, M. C. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. **Chemical research in toxicology**, United States, vol. 7, no. 4, p. 519–525, 1994. .
- WOLIN, M. S.; GUPTE, S. A.; NEO, B. H.; GAO, Q.; AHMAD, M. Oxidant-redox regulation of pulmonary vascular responses to hypoxia and nitric oxide-cGMP signaling. **Cardiology in review**, vol. 18, no. 2, p. 89–93, 2010. <https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e3181c9f088>.
- YINJUAN, T.; JIANJUN, W.; YINGLU, G.; WEIJUN, C.; WEIJUN, T.; MINGYING, L. [Effect of atorvastatin on LOX-1 and eNOS expression in collateral vessels of hypercholesterolemic rats]. **Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University**, vol. 39, no. 11, p. 1265–1272, Nov. 2019. <https://doi.org/10.12122/j.issn.1673-4254.2019.11.01>.
- ZETTERQUIST, W.; PEDROLETTI, C.; LUNDBERG, J. O. N.; ALVING, K. Salivary contribution to exhaled nitric oxide. **European Respiratory Journal**, vol. 13, no. 2, p. 327–333, 1999. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.13b18.x>.
- ZHANG, P.; XING, X.; HU, C.; YU, H.; DONG, Q.; CHANG, G.; QIN, S.; LIU, J.; ZHANG, D. 15-Lipoxygenase-1 Is Involved in the Effects of Atorvastatin on Endothelial Dysfunction. **Mediators of inflammation**, vol. 2016, p. 6769032, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6769032>.