

LEONARDO ANDRÉ DA COSTA MARQUES

Caracterização Farmacológica de Doadores de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) na Resposta Vasomotora *in vitro* de Anéis de Artéria Mesentérica de Camundongos

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

São Paulo

2020

LEONARDO ANDRÉ DA COSTA MARQUES

Caracterização Farmacológica de Doadores de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) na Resposta Vasomotora in vitro de Anéis de Artéria Mesentérica de Camundongos

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Versão Corrigida

São Paulo

2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

da Costa Marques, Leonardo André
Caracterização Farmacológica de Doadores de
Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) na Resposta Vasomotora
in vitro de Anéis de Artéria Mesentérica de
Camundongos / Leonardo André da Costa Marques;
orientador Marcelo Nicolás Muscará. -- São Paulo,
2020.

84 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Sulfeto de Hidrogênio. 2. Mesentério. 3.
Reatividade vascular. 4. Mitocôndria. 5. Endotélio.
I. Nicolás Muscará, Marcelo , orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leonardo André da Costa Marques

Título da Dissertação/Tese:

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do sulfeto de hidrogênio (H2S) endógeno e exógeno na resposta vasomotora "in vitro" de artéria mesentérica de camundongos.", protocolada sob o CEUA nº 7759060218, sob a responsabilidade de **Marcelo Nicolas Muscara e equipe; Leonardo André da Costa Marques** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 19/03/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of endogenous and exogenous hydrogen sulphide (H2S) in the "in vitro" vasomotor response of mouse mesenteric artery.", utilizing 200 Isogenics mice (200 males), protocol number CEUA 7759060218, under the responsibility of **Marcelo Nicolas Muscara and team; Leonardo André da Costa Marques** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 03/19/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: 24 meses

Depto/Setor: Farmacologia

Origem: Biotério do Departamento de Farmacologia ICB - Unidade II

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Machos

Idade ou peso: 6 a 8 semanas

Linhagem: C57BL/6

N amostral: 200

São Paulo, 21 de março de 2018



Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e toda minha família, pelo amor, apoio e compreensão durante toda a minha vida, tão essenciais para chegar onde cheguei.

Ao professor Marcelo e professora Soraia, pelas oportunidades e ensinamentos, os quais muito contribuíram para meu crescimento pessoal e científico.

Aos técnicos de laboratório e demais funcionários do departamento de Farmacologia do ICB pelo suporte, em especial à Dra. Simone Teixeira e Dr. Antônio Soares, pelos ensinamentos essenciais para a confecção do trabalho e pelos momentos de descontração.

À todos os colegas de laboratório e de pós-graduação, pelos momentos de estudo, trabalho e de descontração.

Aos professores do Departamento de Farmacologia do ICB, pelas oportunidades e ajuda durante a confecção do trabalho e pela minha formação acadêmica no programa de pós-graduação em Farmacologia.

Ao Prof. Matthew Whiteman, da University of Exeter Medical School, Inglaterra, por gentilmente ceder os compostos utilizados no trabalho.

Aos órgãos de fomento à pesquisa FAPESP (auxílio regular à pesquisa) e CNPq (auxílio de chamada universal) pelo apoio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001, processo 88882.3377603/2019-01.

RESUMO

MARQUES, LAC. Caracterização Farmacológica de Doadores de Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) na Resposta Vasomotora in vitro de Anéis de Artéria Mesentérica de Camundongos. 2020. 84 pgs. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A importância do sulfeto de hidrogênio (H₂S) na fisiopatologia é cada vez mais explorada, incluindo os efeitos benéficos de doadores de H₂S no sistema cardiovascular e na inflamação. Novos compostos com especificidade mitocondrial, como o AP39, fornecem H₂S diretamente nas mitocôndrias, embora seus mecanismos de ação ainda sejam desconhecidos. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos e descrever os mecanismos de ação de dois tipos de doadores de H₂S, o doador espontâneo hidrossulfeto de sódio (NaHS) e mitocondrial AP39, na reatividade vascular de artérias mesentéricas de camundongos. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do ICB/USP (CEUA 7759060218). Camundongos C57BL/6 anestesiados foram eutanasiados e seus leitões mesentéricos dissecados, para a dissecação de artérias mesentéricas de primeira ordem. Montou-se anéis destas artérias em miógrafo de arame para registro de tensão isométrica. As atividades vasculares dos compostos AP39, ADT-OH (porção doadora de H₂S do AP39) e NaHS foram avaliadas sobre o tônus basal e sob pré-contracção com fenilefrina (1,7 μM). Ainda, as respostas ao AP39 e NaHS foram avaliadas após inibição farmacológica das enzimas ciclo-oxigenases (com indometacina), óxido nítrico sintases (com L-NAME), guanilato ciclase solúvel (com ODQ), fosfodiesterase V (com sildenafil), produtoras de H₂S (com AOAA), bloqueio inespecífico dos canais de potássio (com TEA), dos canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}; com glibenclamida) ou dos canais de potássio ativados por cálcio (com apamina). Valores de resposta máxima (E_{max}) e potência (pA₂; -log da concentração molar de agonista que causa 50% da resposta máxima) foram calculados a partir das curvas de concentração vs. resposta. A expressão gênica e proteica das enzimas produtoras de H₂S (CSE, CBS e 3MPST) foram analisadas por RT-PCR e *Western blotting*, respectivamente e a produção de H₂S pelos homogenatos das artérias pelo método colorimétrico baseado na formação de sulfeto de chumbo. Os experimentos de RT-

PCR revelaram a expressão gênica das enzimas CSE e 3MPST, enquanto os experimentos de *Western blotting* evidenciaram a expressão proteica de todas as enzimas. A inibição não seletiva das enzimas produtoras de H₂S pelo AOAA aboliu a produção endógena de H₂S, ao passo que PAG (inibidor seletivo da CSE) ou o NPS (doador de NO), reduziram-na em cerca de 50%. O vasorelaxamento promovido por todos os doadores de H₂S testados mostraram-se dependentes da presença do endotélio e especificamente dependentes da sinalização do NO e abertura de canais de potássio. Entretanto, o H₂S endógeno mostrou-se participante do mecanismo de ação do AP39 e a inibição de K_{ATP} não atenuou o vasorelaxamento do AP39, contrastando ao NaHS. No presente estudo evidenciou-se o vasorelaxamento induzido pelos diferentes doadores de H₂S. Notou-se diferenças nos mecanismos de ação, provavelmente associadas às diferenças de mecanismos de liberação e localização do H₂S. Ainda, a maior potência na ordem de dez vezes do AP39 em comparação ao NaHS confere uma vantagem aos doadores mitocondriais de H₂S. Considerando os achados do presente estudo, bem como seus efeitos anteriormente descritos, os doadores mitocondriais de H₂S podem demonstrar uma boa perspectiva para o tratamento das doenças cardiovasculares.

Palavras-Chave: Sulfeto de Hidrogênio, Mesentério, Reatividade vascular, Mitocôndria, Camundongos.

ABSTRACT

MARQUES, LAC. Pharmacological Characterization of Hydrogen Sulfide (H₂S) Donors on the *in vitro* Vasomotor Response of Mouse Mesenteric Artery Rings. 2020. 84 pgs. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The number of studies on the importance of the physiopathological effects of hydrogen sulfide (H₂S) is growing, including those describing the beneficial effects of H₂S-donors on the cardiovascular system and inflammation. Among the H₂S-donors, newly developed mitochondria-targeted compounds, such as AP39, supply H₂S into the mitochondrial environment, however, their mechanisms of action are still unknown. The objective of the present study was, thus, to analyze the effects and describe the mechanisms of action of two types of H₂S-donors, the spontaneous H₂S-donor sodium hydrosulfide (NaHS) and the mitochondria targeted H₂S-donor AP39, on the vascular reactivity of mouse mesenteric artery. All the experimental procedures were approved by the Ethics Committee in Animal Use (CEUA 7759060218). Anesthetized C57BL/6 mice were euthanized and the mesenteric bed dissected for isolating of first-order mesenteric arteries. Mesenteric artery rings were mounted in a wire myograph for isometric tension recording. The vascular activity of AP39, ADT-OH (the H₂S-donor moiety of AP39) and NaHS were analyzed on resting vessels and under 1.7 μM phenylephrine-induced pre-contraction. In addition, the H₂S-donor responses were assessed under pharmacological inhibition of cyclooxygenases (by indomethacin), nitric oxide synthases (by L-NAME), soluble guanylate cyclase (by ODQ), type V-phosphodiesterase (by sildenafil) and the H₂S-producing enzymes (by AOAA), non-selective inhibition of K⁺ channels (by TEA), selective inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels (by glibenclamide) or Ca²⁺-activated K⁺ channels (by apamin). Maximal response (E_{max}) and potency (pA₂; as -log of the agonist concentration necessary to achieve 50% of E_{max}) values were obtained from concentration-response curves. Protein and gene expressions of the H₂S-producing enzymes (CBS, CSE and 3MPST) were analyzed by Western blot and RT-PCR, respectively. The *in vitro* production of H₂S by mesenteric artery homogenates was assessed by a colorimetric method based on the formation of lead sulfide. RT-PCR experiments evidenced the gene expression of CSE and 3MPST in the vessels, whereas the protein expression of all the 3 enzymes

were demonstrated by the Western blotting experiments. Non-selective inhibition of H₂S-producing enzymes by AOAA abolished H₂S production, whereas it was partially inhibited by PAG (a CSE selective inhibitor) or SNP (a NO-donor). Vasorelaxation promoted by AP39, ADT-OH and NaHS were all endothelium-dependent and specifically dependent of NO signaling and K⁺ channels opening. However, endogenous H₂S participates in the mechanism of action of AP39, but not of NaHS. Moreover, K_{ATP} blockade did not attenuate AP39 vasorelaxation. In the present study it is demonstrated the vasorelaxant activities of different classes of H₂S-donors, and their differences are likely associated to the mechanisms of H₂S release as well as the sites where H₂S becomes available. Furthermore, the higher potency of AP39 in comparison with NaHS (approximately ten-fold) confers advantages to mitochondrial H₂S-donors. Considering the results of the present study and the previously demonstrated effects, mitochondria-targeted H₂S-donors may offer a good perspective in cardiovascular disease therapeutics.

Key Words: Hydrogen Sulfide, Mesentery, Vascular reactivity, Mitochondria, Mice.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Vias convencionais da produção endógena de H₂S em mamíferos... pg. 16
- Figura 2** – Os efeitos bioenergéticos do H₂S em mamíferos pg.23
- Figura 3** – A molécula do doador mitocondrial de H₂S AP39 pg.26
- Figura 4** – Procedimento experimental para avaliação da produção endógena de H₂S de homogenatos de artérias mesentéricas camundongos pg.36
- Figura 5** – Expressão proteica e gênica das enzimas produtoras de H₂S e a produção endógena de H₂S de artérias mesentéricas de camundongos pg.43
- Figura 6** – Curvas concentração-resposta da padronização da atividade vascular de artérias mesentéricas de camundongos *in vitro* pg.44
- Figura 7** – Efeitos dos doadores de H₂S, AP39, ADT-OH e NaHS sobre o tônus basal de artérias mesentéricas de camundongos pg.46
- Figura 8** – Curvas concentração-resposta do vasorelaxamento dos doadores de H₂S AP39, ADT-OH e NaHS pg.48
- Figura 9** – Os mecanismos de ação do vasorelaxamento induzido por AP39 e NaHS em artérias mesentéricas de camundongos pg.52
- Figura 10** – Participação dos canais de K⁺ e a associação das vias de sinalização dependentes de NOS e COX no vasorelaxamento induzido pelo AP39 e NaHS pg.53
- Figura 11** – Mecanismo de ação proposto ao vasorelaxamento induzido pelo AP39 pg.67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	<i>A produção endógena de H₂S</i>	15
1.2	<i>Efeitos cardiovasculares do H₂S</i>	16
1.3	<i>Os efeitos anti-inflamatórios do H₂S</i>	18
1.4	<i>Os efeitos bioenergéticos do H₂S</i>	21
1.5	<i>Os doadores de H₂S</i>	24
1.6	<i>Os efeitos do AP39</i>	27
2	OBJETIVOS	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	<i>Animais e Fármacos</i>	31
3.2	<i>Avaliação de expressão proteica por Western Blot</i>	31
3.3	<i>Avaliação da expressão gênica pela reação da cadeia de polimerase (PCR)</i>	33
3.4	<i>Avaliação da produção endógena de H₂S</i>	35
3.5	<i>Reatividade Vascular - procedimentos experimentais</i>	37
3.6	<i>Normalização dos vasos</i>	37
3.7	<i>Teste funcional do músculo liso vascular e endotélio</i>	38
3.8	<i>Caracterização da preparação</i>	38
3.9	<i>Curvas concentração-resposta aos doadores de H₂S e frente aos inibidores</i>	39
3.10	<i>Análises estatísticas</i>	40
4	RESULTADOS	41
4.1	<i>Expressão proteica, gênica e produção de H₂S</i>	41
4.2	<i>Caracterização da montagem</i>	41

4.3 Efeitos do AP39, ADT-OH e NaHS sobre o tônus basal	45
4.4 Efeitos vasorelaxantes do AP39, ADT-OH e NaHS	47
4.5 Participação das ciclo-oxigenases (COX) nos efeitos do AP39 e NaHS ..	49
4.6 Participação da via do NO nos efeitos do AP39 e NaHS	49
4.7 Participação da via de sinalização do H ₂ S endógeno nos efeitos do AP39 e NaHS	50
4.8 Papel dos canais de K ⁺ sobre o efeito do AP39 e NaHS	50
5 DISCUSSÃO	54
5.1 Os achados do presente estudo	56
5.2 O mecanismo proposto	67
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

O sulfeto de hidrogênio (H_2S) é um gás incolor, com odor característico relacionado a putrefação de matéria orgânica. Corrosivo e inflamável, foi descrito primeiramente pelo boticário Carl Wilhelm Scheele no século XVIII (WANG, 2003). Sua ocorrência ambiental é amplamente descrita no metabolismo de organismos anaeróbicos (denominados redutores de sulfato) e na atividade vulcânica subterrânea (misturando o enxofre do magma à água oceânica) ou ainda, contido nas reservas sedimentares dos oceanos. Desta forma, considera-se os oceanos as maiores reservas naturais de H_2S (CANFIELD; KRISTENSEN; THAMDRUP, 2005). O H_2S produzido na atividade geotérmica é emitido à atmosfera através de erupções vulcânicas (SHINOHARA et al., 2002). Este fenômeno foi relacionado a episódios de extinção biológicas durante a história geológica da terra (KNOLL et al., 2007).

A concentração média de H_2S na atmosfera flutua em torno de 0,11 a 0,33 ppb, embora áreas mais próximas de fontes de H_2S , naturais ou antropológicas, frequentemente apresentem concentrações mais altas (REIFFENSTEIN, 1992). Seu odor característico, o qual remete a putrefação de matéria orgânica, pode ser percebido em concentrações superiores a 0,01 ppm. No entanto, efeitos toxicológicos do H_2S no organismo, principalmente no trato respiratório e sistema nervoso, são observados em concentrações superiores a 20 ppm (BEAUCHAMP et al., 1984), sendo letal em concentrações superiores a 1000 ppm (MARSHALL et al., 2009).

Além da sua ocorrência ambiental, a produção enzimática de H_2S em vertebrados foi descrita pela primeira vez por em homogenatos de fígado e rins de ratos (STIPANUK e BECK, 1982). Entretanto, as primeiras contribuições para as descrições da produção e efeitos fisiológicos do H_2S no sistema nervoso (ABE e KIMURA, 1996), vasos sanguíneos (ZHAO, 2001), ou ainda, a descrição de seu efeito direto sobre o músculo liso (TEAGUE; ASIEDU; MOORE, 2002) permitiram o avanço desta nova linha de estudo. Neste sentido, o estudo da importância biológica dos efeitos do H_2S podem ser notados inclusive a partir de estudos os quais demonstraram a relevância da sinalização do H_2S em vegetais e animais invertebrados, como o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (YAMASAKI; COHEN, 2016).

1.1 A produção endógena de H₂S em mamíferos

O sulfeto de hidrogênio (H₂S) é classificado como um gasotransmissor, junto ao óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO). Os gasotransmissores se difundem facilmente por membranas celulares, propriedade que lhes permitem atingir diferentes compartimentos celulares ou células adjacentes (WANG, 2014). Em mamíferos, a elucidação da importância fisiológica do H₂S foi o objetivo de diversos estudos, sendo principalmente descrita nos sistemas nervoso, cardiovascular e imunológico (HOLWERDA; KARUMANCHI; LELY, 2015).

A quantificação das concentrações de H₂S em amostras biológicas ainda é assunto de grande debate na literatura. No entanto, existe um consenso que os efeitos fisiológicos do H₂S são relacionados a concentrações muito baixas, de 1 nM a ordem de 1 μM (SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017). A produção endógena de H₂S em mamíferos basicamente resume-se à atividade de quatro enzimas: cistationina γ-liase (CSE), cistationina β-sintase (CBS), cisteína aminotransferase (CAT) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MPST). As enzimas CSE e CBS, mais abundantes, têm como cofator a vitamina B₆ (5' fosfato pirodoxal) e são catalisadoras da produção do H₂S a partir de aminoácidos dos L-cisteína, L-homocisteína e L-cistationina (SZABO, 2018). Existem vias da síntese de H₂S não enzimáticas descritas, por exemplo, em eritrócitos (BENAVIDES et al., 2007). No entanto, considera-se estas de menor importância relativa para o sistema cardiovascular. As principais vias de síntese endógena de H₂S foram resumidas na figura 1.

Os mecanismos de expressão e atividade das enzimas produtoras mostram-se complexos e têm sido explorados pela literatura (SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017). Atribui-se maior importância à atividade de CSE ao sistema cardiovascular (XU; LIU; LIU, 2014). A expressão e atividade de CAT e 3MPST, associadas ao metabolismo mitocondrial (KIMURA et al., 2017), já foram identificadas em artéria aorta (SHIBUYA et al., 2009a) e artéria carótida (KUO et al., 2016), porém, ainda carece-se de informações a respeito do papel destas no mecanismo fisiológico de artérias de resistência, bem como de possíveis vias de interação entre os compartimentos celulares para os seus efeitos vasculares.

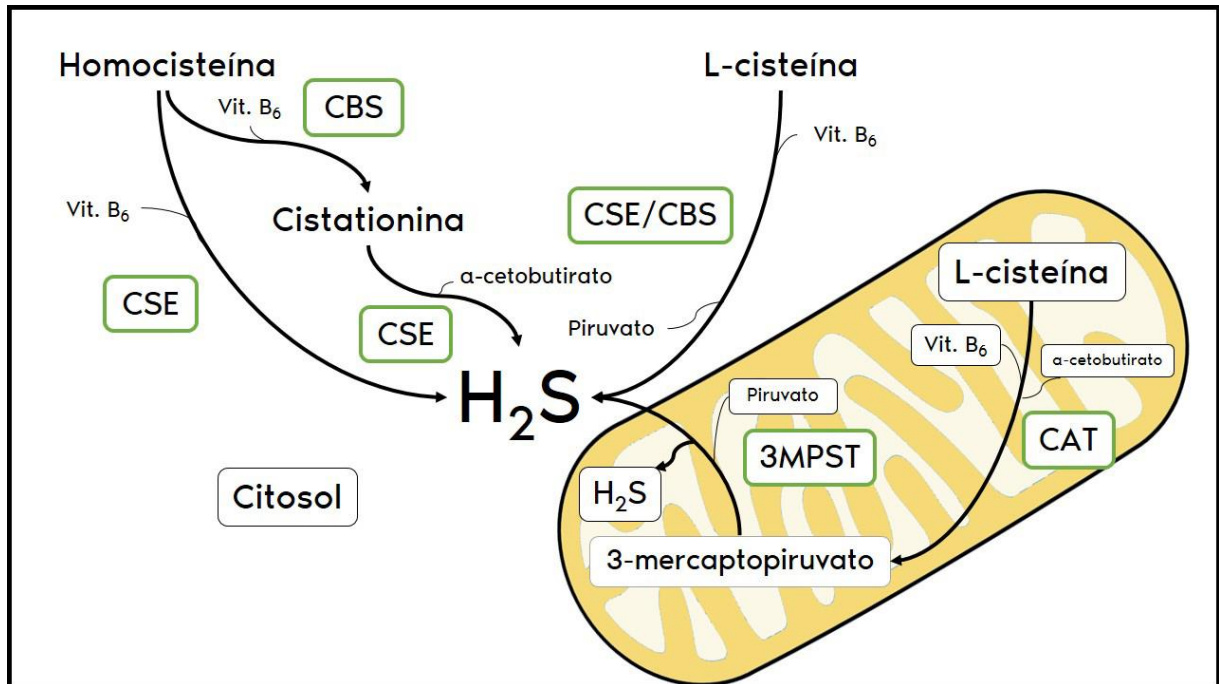


Figura 1 – Vias convencionais da produção endógena de H_2S em mamíferos. Embora o H_2S tenha a propriedade de fluir livremente através das membranas celulares, respeitando o equilíbrio cinético de cada compartimento celular, a produção endógena de H_2S pode ser didaticamente dividida entre citosólica e mitocondrial. Na via citosólica, cita-se principalmente que a produção do H_2S a partir dos aminoácidos L-cisteína e homocisteína pelas enzimas cistationina γ -liase (CSE) e cistationina β -sintase (CBS). Especificamente no caso da homocisteína, ocorre uma transformação intermediária à cistationina a partir da atividade de CBS. Assim, cistationina é substrato tanto de CSE quanto CBS. Como produto das reações enzimáticas citosólicas e mitocondriais, frequentemente observa-se a formação de piruvato. Na via mitocondrial, as enzimas cisteína aminotransferase (CAT) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MPST) participam em conjunto da produção de H_2S no ambiente mitocondrial. CAT cataboliza o aminoácido L-cisteína, formando 3-mercaptopiruvato como produto intermediário e este, por sua vez, é substrato de 3MPST, a qual produz H_2S a partir do complexo persulfeto contido na molécula de 3-mercaptopiruvato. É importante notar que a vitamina B_6 , 5' fosfato piridoxal, é co-fator das enzimas CSE, CBS e CAT, ao passo que 3-MPST não depende de co-fatores, embora o equilíbrio redox mitocondrial controle a atividade de 3MPST. Desta maneira, o H_2S produzido no interior mitocondrial pode ser útil tanto no próprio metabolismo mitocondrial, quanto pode fluir a outros compartimentos celulares. Fonte: Adaptado de (KIMURA, 2014).

1.2 Efeitos cardiovasculares do H_2S

Os primeiros efeitos fisiológicos relacionados a sinalização do H_2S no sistema cardiovascular foram associados ao controle do tônus vascular (ZHAO, 2001; YANG et al., 2008), angiogênese (BIBLI et al., 2015; COLETTA et al., 2015; KATSOUDA et al., 2016) e a contração cardíaca (KONDO et al., 2013; PREDMORE; LEFER, 2011).

As principais enzimas envolvidas na síntese endógena do H_2S (CSE, CBS, CAT e 3MPST) foram identificadas em células do sistema cardiovascular (YANG; WANG, 2015), embora a distribuição destas seja dependente do tipo celular em questão (PAN

et al., 2011). CSE mostra-se a enzima mais importante no sistema cardiovascular, principalmente pela sua expressão tanto em células do músculo liso vascular quanto células endoteliais (FU et al., 2012). Entretanto, é crescente o estudo a respeito da relevância de 3MPST no endotélio vascular (SHIBUYA et al., 2009a).

Quando doadores de H₂S são infundidos experimentalmente em regiões centrais de controle autonômico, como o órgão subfornical (KUKSIS; SMITH; FERGUSON, 2014) e núcleo paraventricular do hipotálamo (GAN et al., 2012), seus efeitos são associados ao aumento da pressão arterial. Entretanto, a infusão de doadores de H₂S não promove efeitos expressivos em estruturas cardiotônicas do núcleo do trato solitário (NTS) como o bulbo rostro-ventrolateral e bulbo caudo-ventrolateral (STREETER et al., 2011). Ainda, a infusão de hidrossulfeto de sódio (NaHS), um doador espontâneo de H₂S, na área postrema (associada ao NTS) diminuiu a pressão arterial de ratos anestesiados (SMITH; WANG; FERGUSON, 2017). Assim, os efeitos do H₂S na regulação central da pressão arterial apresenta-se dependente da região e ainda não possui um mecanismo definido.

Muitos estudos relatam a dependência do NO para a atividade de vasorelaxamento do H₂S. (GHEIBI et al., 2018; KING et al., 2014; POLHEMUS et al., 2014). H₂S e NO compartilham efeitos vasculares, como vasorelaxamento, angiogênese, atenuação de apoptose celular e efeitos antioxidantes. O mecanismo de sinalização do H₂S proposto atualmente leva em consideração a capacidade de aumento da fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e aumentando por consequência a produção de NO (ALTAANY et al., 2014). Doadores de NO, como nitroprussiato de sódio, aumentam a expressão de CSE em células de músculo liso de artéria aorta *in vitro* (ZHAO, 2001), porém, ainda existem lacunas a serem elucidadas na interação entre ambos os gasotransmissores, sobretudo na importância desta interação para o mecanismo de vasorelaxamento de artérias mesentéricas.

Os efeitos do H₂S no relaxamento de artérias parecem ser mais importantes em vasos de resistência, quando comparados aos efeitos observados em vasos de condutância (CHENG et al., 2004; MUSTAFA et al., 2011). Seus efeitos vasculares estão principalmente associados a abertura dos canais de K⁺ sensíveis a ATP (K_{ATP}; ZHAO, 2001) presentes principalmente nas células do músculo liso vascular. Ainda, a capacidade de abertura dos canais K_{ATP} pelo NO também representa uma parcela do mecanismo de interação entre NO e H₂S (SASAKI et al., 2000; ZHAO; NDISANG;

WANG, 2003; ZHAO; WANG, 2003). Além de K_{ATP} , a capacidade de ativação de outros canais de potássio também é associada aos efeitos vasculares do H_2S , como canais de potássio ativados por cálcio (K_{Ca}) e canais de potássio dependentes de voltagem (K_v ; HEDEGAARD et al., 2015; JACKSON-WEAVER et al., 2013; MATERAZZI et al., 2017). Ainda, o H_2S é capaz de interagir com outros canais iônicos no sistema cardiovascular como inibir o canal de Ca^{2+} -tipo L, reduzindo o influxo de cálcio em cardiomiócitos (SUN et al., 2008), além da capacidade de reduzir o pH intracelular em células do músculo liso vascular ao ativar o trocador Cl^-/HCO_3^- , fenômeno que foi associado ao vasorelaxamento promovido pelo NaHS na aorta de ratos (LEE et al., 2007).

Muitas doenças cardiovasculares estão associadas a sinalização deficitária do H_2S , como hipertensão (YANG et al., 2008), aterosclerose (MANI et al., 2013; PAN et al., 2017) e infarto do miocárdio (POLHEMUS et al., 2013). A inibição crônica da síntese de NO reduz a expressão e a atividade de CSE, reduzindo a concentração circulante de H_2S (WHITEMAN et al., 2006). Modelos animais de hipertensão, como a linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) também mostram expressão e atividade de CSE reduzidas, e, a partir da administração crônica de NaHS, atenuou-se a hipertensão destes animais (YAN; DU; TANG, 2004).

1.3 Os efeitos anti-inflamatórios do H_2S

As doenças cardiovasculares frequentemente são agravadas pela disfunção endotelial promovida, por exemplo, pela ativação de vias inflamatórias em resposta aos agentes etiológicos como o estresse oxidativo (KATSIARI; BOGDANOS; SAKKAS, 2019; PAQUISSI, 2016). Alguns efeitos anti-inflamatórios do H_2S descritos, como a inibição da adesão de leucócitos (WALLACE et al., 2010; ZANARDO et al., 2006) a partir da redução da expressão de moléculas de adesão leucocitária (FIORUCCI et al., 2005), além de possivelmente induzir a vasodilatação no processo inflamatório (WALLACE; FERRAZ; MUSCARA, 2012) também podem sugerir sua relevância no tratamento das doenças cardiovasculares.

Dentre os fatores etiológicos das doenças cardiovasculares, destaca-se o estresse oxidativo (INCALZA et al., 2018). O estresse oxidativo é caracterizado pela produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs e de nitrogênio em

conjunto com a deficiência na neutralização destas pelas enzimas antioxidantes. Além das doenças cardiovasculares, o estresse oxidativo assume papel importante na etiologia de doenças correlatas, como obesidade e o diabetes (INCALZA et al., 2018).

Um dos primeiros mecanismos anti-inflamatórios associados ao H₂S envolve o sequestro *per se* de espécies oxidantes, como o peroxinitrito (WHITEMAN et al., 2004), embora as concentrações de H₂S produzidas endogenamente não sejam capazes de induzir efeitos antioxidantes (XIE; LIU; BIAN, 2016). Desta maneira, seus efeitos antioxidantes são melhor observados na atividade de doadores de H₂S (ZHANG et al., 2018). A atividade antioxidante do H₂S é associada a manutenção da atividade da enzima antioxidante glutatona reduzida, responsável pela redução de moléculas oxidantes oriundas do metabolismo celular (KIMURA; GOTO; KIMURA, 2010), mecanismo demonstrado inclusive em modelo *in vivo* de insuficiência cardíaca por oclusão de artéria coronária. No estudo, foi observado que a administração do doador S-propargil-cisteína foi capaz de reverter o estresse oxidativo no tecido e diminuir a área de infarto no coração de ratos (HUANG et al., 2013).

Outro mecanismo muito importante na atividade antioxidante do H₂S relaciona-se a ativação do NRF₂ – “*nuclear fator erythroid 2-related factor*” ou fator de transcrição eritróide-2. NRF₂ é responsável pela regulação da expressão de diversos genes relacionados a atividade antioxidante celular. NRF₂ é encontrado no citoplasma em forma em complexo inativo denominado KEAP₁ – “*Kelch-like ECH-associated protein 1*” (BEAUCHAMP et al., 1984). Quando ativado, KEAP₁ é ubiquitinizado e transloca NRF₂ ao núcleo celular, induzindo a expressão de elementos de resposta antioxidante como tioredoxina (TRX₁), glutatona redutase e ativadores de tioredoxina.

O H₂S é capaz de modificar proteínas de maneira pós-translacional a partir de uma reação denominada S-sulfidração, adicionando covalentemente um enxofre a resíduos de cisteína, formando o complexo -SSH (MENG et al., 2018). A interação do H₂S com o complexo KEAP₁, a partir da S-sulfidração do resíduo cisteína-151, altera a conformação de KEAP₁, liberando NRF₂ e desencadeando sua sinalização nuclear, ativando vias antioxidantes citadas anteriormente. Este mecanismo é responsável pelas propriedades cardioprotetoras da sinalização do H₂S, reduzindo a área de infarto no coração, assim como concentrações de troponina cardíaca circulante além de outros marcadores de estresse oxidativo em modelo de isquemia cardíaca em camundongos (CALVERT et al., 2009).

Uma das consequências do estresse oxidativo no processo inflamatório é a ativação de NADPH oxidases (NOXs) de células fagocitárias, estimulando a produção e liberação de citosinas pelos leucócitos (*burst* respiratório). Em células endoteliais, o estresse oxidativo está envolvido com o desacoplamento das NOS, responsável inclusive pelo aumento da pressão arterial observado (KRÖLLER-SCHÖN et al., 2014). Entretanto, um crescente número de trabalhos demonstra a participação fisiológica das NOX no controle da pressão arterial (SANTILLO et al., 2015). Desta maneira, a produção e sinalização das espécies reativas de oxigênio (principalmente o peróxido de hidrogênio) podem assumir diferentes papéis, de acordo com a situação fisiológica observada.

De maneira geral, a disfunção endotelial é caracterizada por aspectos pró-inflamatórios e pró-trombóticos nas células endoteliais (HIGASHI et al., 2009) e como consequência, observa-se principalmente menor capacidade de síntese de NO, reduzindo assim a capacidade de controle do tônus vascular (FÖRSTERMANN, 2010; KARBACH et al., 2014). Foi demonstrado que a atividade das NOX, sobretudo em condições patológicas, está diretamente associada a depleção de tetrahydrobiopterinas (BH₄), co-fator das NOS (KARBACH et al., 2014; LATINI et al., 2018). Desta maneira, a atividade das NOX é outro fator condicionante para o desacoplamento das NOS, possuindo assim grande importância sobre o processo de disfunção endotelial (HEITZER et al., 2000).

Embora ainda não testados em células endoteliais, a capacidade do H₂S em inibir a atividade da NOX em osteoblastos expostos a H₂O₂ *in vitro* (XU et al., 2011) pode sugerir seu potencial anti-inflamatório a partir da redução da atividade das NOXs para no sistema cardiovascular. Outros mecanismos anti-inflamatórios do H₂S envolvem a inibição da via de NF-κB em macrófagos *in vitro* (WHITEMAN et al., 2010), mecanismo possivelmente útil na resolução de processos inflamatórios relacionados a doenças cardiovasculares como a aterosclerose (FENG et al., 2017; KARBACH et al., 2014). Além disso, o H₂S é capaz de aumentar a expressão de enzimas como superóxido dismutase (SODs), glutatona peroxidase dismutase e tioredoxina em modelo *in vitro* de estresse oxidativo promovido pela metionina em células endoteliais de artéria cerebral (TYAGI et al., 2009). Observamos assim efeitos que poderiam contribuir diretamente para a neutralização dos efeitos do estresse oxidativo nas doenças cardiovasculares.

1.4 Os efeitos bioenergéticos do H₂S

Além dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, o H₂S também possui propriedades bioenergéticas. Em altas concentrações (superiores a 10 µM), o H₂S é tóxico ao metabolismo mitocondrial ao competir com o O₂ na associação ao complexo IV (citocromo C oxidase). A interação entre o O₂ e o complexo IV é essencial a produção de ATP (HILL et al., 1984). Embora relacionado anteriormente ao metabolismo de microrganismos que oxidam H₂S (GRIESHABER; VÖLKELE, 1998), estudos mais recentes demonstram a capacidade de suplementação para a produção de ATP pelo H₂S em mamíferos ao doar elétrons à cadeia respiratória de maneira análoga as funções de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina-adenina dinucleotídeo (FADH₂; LAGOUTTE et al., 2010).

O complexo enzimático sulfeto quinona redutase (SQR) é responsável por parte do processo de oxidação do H₂S. A inibição do complexo III ou do complexo IV com antimicina e cianeto, respectivamente, impedem a oxidação do H₂S, ao passo que a inibição do complexo I com rotenona não afeta a oxidação do H₂S (GOUBERN et al., 2007). Desta forma, indica-se que os elétrons disponibilizados à cadeia respiratória pela oxidação do H₂S ingressam-na a partir da coenzima Q. SQR é capaz de injetar dois elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, reduzindo a coenzima Q dependentemente de O₂ e libera como produto da oxidação o tiosulfato (H₂S₂O₃; HILDEBRANDT; GRIESHABER, 2008). Apesar da oxidação do H₂S ser considerada mais onerosa à célula (com demanda até três vezes maior de O₂), o H₂S possui características que lhe conferem maior flexibilidade ao metabolismo, como a fácil difusão através de membranas, além da pronta oxidação, não necessitando de etapas preparatórias como ocorrem com outros substratos (SZABO et al., 2014).

Os efeitos benéficos do H₂S sobre o metabolismo mitocondrial são observados na faixa de concentrações de 10 nM a 1 µM, ao passo que concentrações superiores a 10 µM são tóxicas ao metabolismo mitocondrial (LAGOUTTE et al., 2010). Para a produção endógena mitocondrial de H₂S, considera-se a 3MPST como a enzima mais abundante, predominantemente localizada no interior mitocondrial (SHIBUYA et al., 2009b). A produção mitocondrial endógena de H₂S depende de uma cascata. CAT produz, a partir de L-cisteína, 3-mercaptopiruvato (3-MP), o qual por sua vez é

substrato de 3MPST. O complexo persulfeto de 3-MP funciona como um reservatório de H₂S, mobilizado por 3MPST. Ainda, a liberação de H₂S deste complexo persulfeto depende do equilíbrio redox promovido por agentes redutores, como as enzimas tioredoxina e glutationas (MIKAMI et al., 2011), dado que a interação entre os resíduos de cisteína de 3MPST e espécies oxidantes livres no ambiente mitocondrial parece ser um fator regulador da atividade de 3MPST, inativando-a (NAGAHARA, 2013).

A relação entre a atividade bioenergética mitocondrial do H₂S oriundo de outras enzimas produtoras de H₂S, CSE e CBS, tem sido discutida. Mesmo que predominantemente citosólicas, o H₂S produzido por estas difunde-se às mitocôndrias (SZABO et al., 2014). Foi demonstrado que em hipóxia a atividade de CSE é capaz de suplementar a demanda energética. CSE transloca-se ao interior mitocondrial a partir da interação com a translocase de membrana externa mitocondrial (Tom-20) em células de músculo liso vascular, aumentando a produção de ATP. Este mecanismo representa uma vantagem à proteção celular promovida pelo H₂S especialmente em condições limitantes específicas (FU et al., 2012). Os mecanismos bioenergéticos do H₂S em células de mamíferos foram resumidos na figura 2.

Outros estudos *in vivo* demonstraram que o H₂S produzido endogenamente também promove efeitos estimulantes bioenergéticos em modelo de nematódeo *Caenorhabditis elegans* (MÓDIS et al., 2013). A partir do silenciamento da principal enzima produtora de H₂S neste modelo, homóloga à CBS de mamíferos, atenuou-se o consumo basal e máximo de oxigênio induzido pelo desacoplador da cadeia respiratória mitocondrial trifluorcarbonilcianeto fenilhidrazona (FCCP) (MÓDIS; WOLANSKA; VOZDEK, 2013; VOZDEK et al., 2012). Estes estudos demonstram que os achados *in vitro* podem correlacionar-se aos efeitos *in vivo* embora a relevância destes em mamíferos ainda esteja por ser estudada.

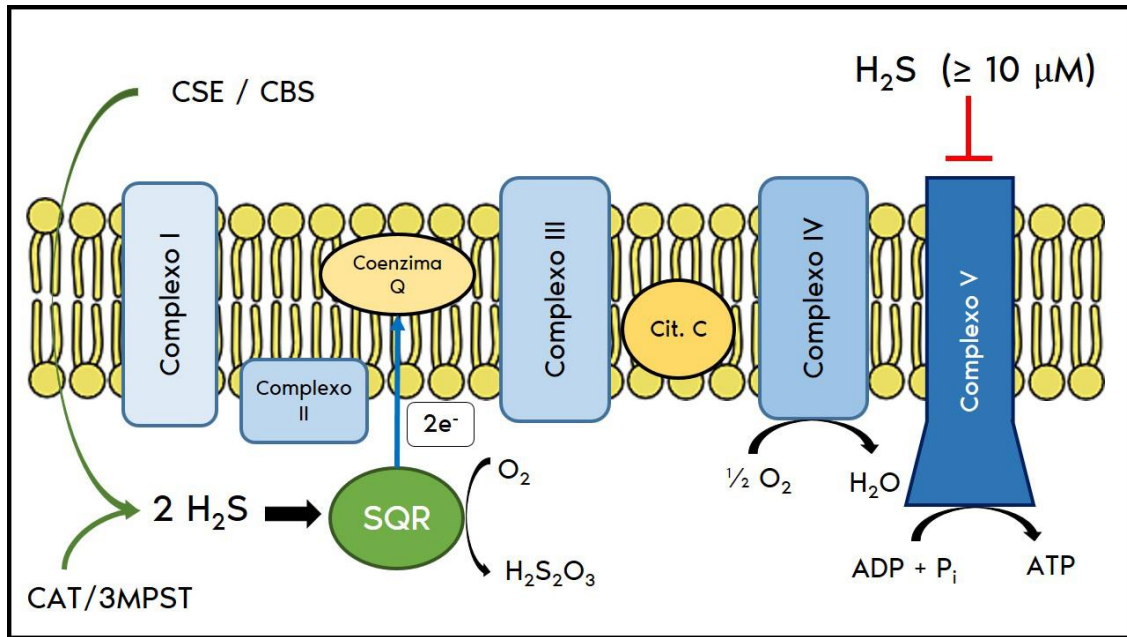
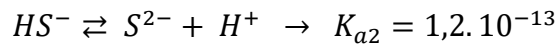
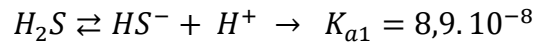


Figura 2 – Os efeitos bioenergéticos do H₂S em mamíferos. Os efeitos bioenergéticos do H₂S não se limitam ao metabolismo bacteriano anaeróbico, sendo descrito também em mamíferos. Em concentrações superiores a 10 μM, o H₂S sobretudo inibe a atividade do complexo V, reduzindo drasticamente a produção de ATP. Assim, para os efeitos bioenergéticos sugere-se concentrações menores, na ordem de 10 nM a 1 μM. O H₂S de origem mitocondrial, a partir da atividade das enzimas CAT e 3MPST, ou então citosólica, da atividade de CSE ou CBS, difunde-se facilmente através de membranas celulares. Ao ser incorporada na cadeia respiratória mitocondrial (CRM), duas moléculas de H₂S são oxidadas a partir da atividade da enzima quinona sulfeto oxidoreductase (SQR), a partir do aporte de O₂ e liberando como produto o tiosulfato (H₂S₂O₃). Esta reação injeta dois elétrons na CRM ao nível da coenzima Q. O aporte elétrico favorece a atividade da CRM e por consequência a formação de ATP. Mesmo que considerada onerosa em aspectos de oxigênio e substratos, esta reação pode ocorrer sobretudo em condições celulares limitantes, como em condições inflamatórias e de isquemia tecidual. Fonte: Adaptado de (LAGOUTTE et al., 2010).

1.5 Os doadores de H₂S

Considerando os efeitos cardiovasculares, antioxidantes, anti-inflamatórios e bioenergéticos do H₂S, a suplementação de H₂S tem sido amplamente utilizada no combate e prevenção das doenças cardiovasculares (XU; LIU; LIU, 2014). A literatura tem utilizado amplamente doadores espontâneos de H₂S, classificados de acordo com a rápida e intensa liberação do H₂S quando administrados.

Dentre os doadores de H₂S mais utilizados experimentalmente, destacam-se os sais de sulfeto NaHS (hidrossulfeto de sódio) e Na₂S (sulfeto de sódio). Estes compostos aumentam a concentração de H₂S no meio em função do pH, com base nas equações de equilíbrio ácido-base (25°C):



Diferentes estudos mostram os efeitos dos doadores NaHS e Na₂S sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos *in vivo*. A infusão dos doadores NaHS ou Na₂S reduziu a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos saudáveis (YOO et al., 2015), além de reduzir a pressão arterial e prevenir a progressão da nefropatia diabética em ratos SHR (AHMAD et al., 2012). Além disto, o tratamento com NaHS foi capaz de atenuar o desenvolvimento de hipertensão induzida pelo nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; ZHONG et al., 2003).

A literatura mostra importante relação do H₂S com a atenuação de fatores etiológicos da aterosclerose (QIAO et al., 2010) ao reduzir a oxidação do LDL induzida por hipoclorito (LAGGNER et al., 2007) ou suprimir a proliferação das células musculares lisas (YAN; DU; TANG, 2004). Embora possuam efeitos úteis ao tratamento de doenças cardiovasculares, os compostos doadores espontâneos de H₂S liberam-no à taxas muito mais altas do que as observados fisiologicamente. Assim, a cinética de liberação destes não reproduzem fielmente o mecanismo fisiológico, sendo utilizados exclusivamente de maneira experimental. Desta forma, algumas estratégias foram adotadas para reproduzir melhor a taxa de liberação fisiológica, como o desenvolvimento de doadores de liberação lenta (ZHANG et al., 2018).

Um estudo com o composto GYY-4137 (“*Morpholin-4-ium (4-methoxyphenyl)-morpholin-4-ylsulfanylidenesulfido-λ5-phosphane*”) demonstrou sua atividade sobre aspectos inflamatórios da aterosclerose (LIU et al., 2013). Demonstrou-se que o tratamento com o composto GYY-4137 diminuiu o acúmulo de lipídios induzido pelo LDL oxidado, assim como a expressão da enzima NOS induzível e de NF-κB em cultura de células. *In vivo*, o tratamento com GYY-4137 por 30 dias diminuiu a formação da placa aterosclerótica e a restaurou parcialmente o relaxamento endotélio-dependente de animais KO para a apolipoproteína-E (LIU et al., 2013).

Uma nova classe de doadores, denominada doadores mitocondriais de H₂S, destinam o H₂S essencialmente às mitocôndrias. Considerando seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e bioenergéticos (SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017), estes compostos possuem grupos moleculares que direcionam-nos às mitocôndrias a partir de interações eletrostáticas entre composto e a membrana mitocondrial (MURPHY, 2008). Compostos ainda mais novos desta classe possuem peptídeos como direcionadores às mitocôndrias (TORREGROSSA et al., 2017).

Dentre os doadores mitocondriais de H₂S, os compostos AP39 e AP123 recebem destaque na literatura. A molécula do doador mitocondrial de H₂S AP39 (“*10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphonium bromide*”) é composta por um grupo trifenilfosfônio (TPP⁺), responsável pelo direcionamento ao ambiente mitocondrial. O TPP⁺ proporciona o acúmulo do AP39 até 500 vezes maior no interior mitocondrial em relação ao citosol (GERÓ et al., 2016; MURPHY, 2008; SZCZESNY et al., 2014). A porção doadora de H₂S do AP39, denominada ADT-OH (“*5-(4-hydroxyphenyl)-3H-1,2-dithiole-3-thione*”) é ligada ao TPP⁺ por uma cadeia alifática de 10 carbonos, a qual também é responsável pela diminuição dos efeitos deletérios do TPP⁺ sobre a cadeia respiratória mitocondrial, como o extravasamento de prótons (TRNKA; ELKALAF; ANDĚL, 2015). A molécula do AP39 foi projetada na figura 3.

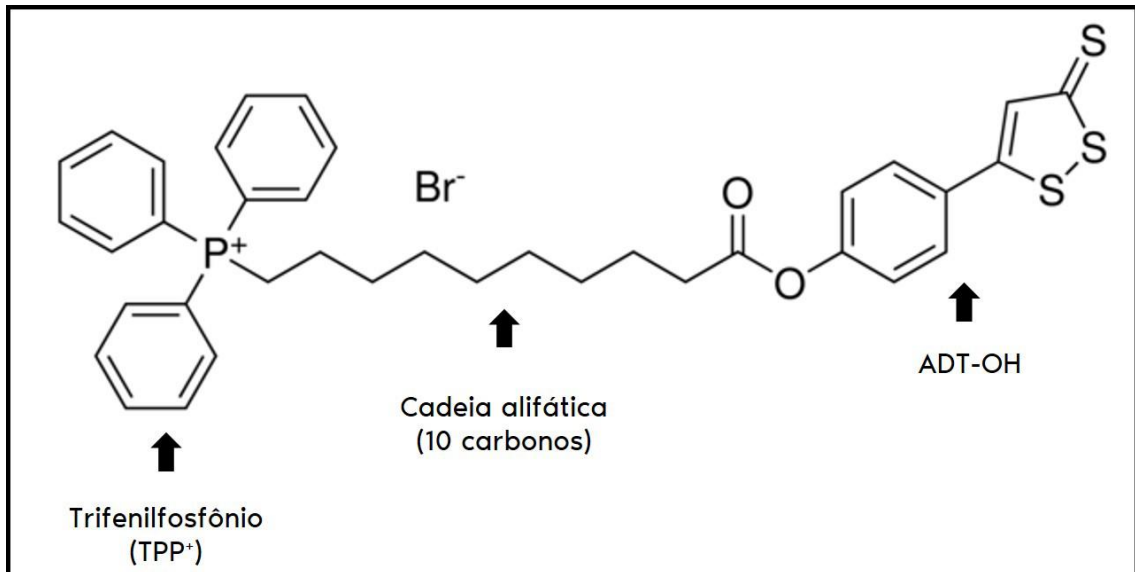


Figura 3 – A molécula do doador mitocondrial de H₂S AP39. O AP39 é um composto doador mitocondrial de H₂S. Sua molécula é composta por três porções com funções distintas, porém, essenciais aos seus efeitos mitocondriais, antioxidantes e citoprotetores já descritos na literatura. A porção trifenilfosfônio (TPP⁺) é responsável pelo encaminhamento do AP39 ao interior mitocondrial, a partir da diferença entre a carga do composto (levemente positivo) e a carga da membrana mitocondrial (levemente negativa). Pela atração de cargas opostas, o composto é direcionado ao interior mitocondrial, entretanto, o TPP⁺ também pode interagir por si só na cadeia transportadora de elétrons, provocando extravasamento de prótons. Assim, a cadeia alifática conectora, composta por 10 carbonos, possui além da função estrutural, a função de reduzir os efeitos do TPP⁺. A molécula ADT-OH (“5-(4-hidroxiifenil)-3H-1,2-ditioil-3-tiona”) é responsável pela liberação de H₂S. A interação com o H₂S é liberado por hidrólise de maneira pH-dependente, de acordo com o equilíbrio do meio. Fonte: Adaptado de (SZCZESNY et al., 2014).

1.6 Os efeitos do AP39

Os primeiros efeitos do AP39 publicados remetem ao trabalho de SZCZESNY e colaboradores, (2014). Neste, foi verificado que o AP39 concentrou-se nas mitocôndrias e, em baixas concentrações (30-100 nM), estimulou a cadeia respiratória mitocondrial de células endoteliais *in vitro*. Em modelo de estresse oxidativo induzido a partir da exposição de células endoteliais ao H₂O₂ produzido por glicose oxidase a partir da glicose contida no meio, o tratamento com AP39 diminuiu a oxidação de proteínas, o acúmulo de EROs nas células e diminuiu o comprometimento da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, além de prevenir danos ao DNA mitocondrial (SZCZESNY et al., 2014).

Outros achados em células endoteliais remetem ao trabalho de GERÕ e colaboradores, (2016). No estudo, o estresse oxidativo foi induzido por modelo *in vitro* de hiperglicemia também utilizando a glicose oxidase. O tratamento prévio com AP39 reduziu a hiperpolarização da membrana mitocondrial causada pelo estresse oxidativo, assim como a diminuição da produção mitocondrial de EROs. O AP39 foi capaz de aumentar a atividade da cadeia transportadora de elétrons ao nível de complexo III. Ainda, foi observado que o direcionamento do H₂S ao ambiente mitocondrial foi capaz de aumentar a potência do H₂S em mais de 1000 vezes contra os danos associados a hiperglicemia *in vitro* (GERÕ et al., 2016).

O estudo de AHMAD e colaboradores, (2016), demonstrou os efeitos do tratamento com AP39 em modelo de hipóxia e estresse oxidativo em células epiteliais renais. Os danos associados ao modelo (representados pela diminuição da produção de ATP e aumento da produção de EROs) foram revertidos pelo tratamento com AP39 (30-300 nM). Em modelo de isquemia-reperfusão renal *in vivo*, o AP39 também foi capaz de atenuar os efeitos deletérios observados anteriormente ao tratamento (como o aumento da infiltração de neutrófilos, concentrações aumentadas de malondialdeído e de interleucina 12 no plasma) além reduzir danos ao DNA das células (AHMAD et al., 2016).

Os efeitos bioenergéticos do AP39 em baixas concentrações (25 nM-100 nM) também foram observados em modelo *in vitro* da doença de Alzheimer (ZHAO et al., 2016). O AP39 foi capaz de aumentar a produção de ATP, diminuir a produção de EROs e proteger o DNA mitocondrial, além de induzir a fissão mitocondrial de

neurônios primários de camundongos. *In vivo*, o tratamento dos camundongos com AP39 (100 nM/kg) melhorou os índices de memória espacial no labirinto alagado de Morris (ZHAO et al., 2016).

O estudo de CHATZIANASTASIOU e colaboradores, (2016) demonstrou que a inibição da produção do NO não reduziu as propriedades citoprotetoras do AP39 contra os efeitos deletérios do H₂O₂ em cardiomiócitos *in vitro*, assim como no modelo de isquemia-reperfusão *in vivo*. Além disso, foi verificado que o AP39 aumentou a capacidade mitocondrial de retenção de cálcio em animais com genes para a ciclofilina-D silenciados. A ciclofilina-D é um regulador da abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTm). Desta maneira, os resultados do estudo mostram que o AP39 seja capaz de inibir diretamente o PPTm, mecanismo diretamente associado ao seu efeito cardioprotetor.

A abertura do PPTm é relacionada ao inchaço mitocondrial causado pela entrada de íons ao interior das mitocôndrias, despolarizando-as e reduzindo drasticamente o potencial eletroquímico e diminuindo a produção de ATP (SCHINDER et al., 1996; STAVROVSKAYA; KRISTAL, 2005). Este processo pode desencadear apoptose a partir da sinalização do citocromo C a fatores pro-apoptóticos (PRIAULT et al., 1999) em diversos modelos de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (RASOLA; BERNARDI, 2007). Além disto, EROs são produzidas e permite-se a saída de moléculas antioxidantes, como a glutathiona, do interior da mitocôndria a partir da abertura do PPTm (LUETJENS et al., 2000).

O estudo de KARWI et al., (2017) mostrou a capacidade do AP39 em reduzir a área de infarto do coração de ratos, independentemente do envolvimento da sinalização de PI3K/AKT, eNOS ou guanilato ciclase solúvel. Em estudos com mitocôndrias isoladas *in vitro*, o AP39 reduziu a produção de EROs sem afetar necessariamente a atividade dos complexo I e III, além de inibir a abertura do PPTm, contribuindo para os atributos cardioprotetores do AP39 anteriormente descritos.

O estudo de TOMASOVA et al., (2015) mostrou que o AP39 é capaz de reduzir a pressão arterial de ratos anestesiados normotensos e com hipertensão arterial induzida a partir do tratamento crônico com L-NAME. Em experimentos eletrofisiológicos *in vitro*, foi observado que o AP39 impediu a corrente de cálcio através dos canais de Cav3, reduziu a atividade dos receptores de rianodina (RyR₂) e

aumentou a condutância e tempo médio de abertura de canais de cloreto. Segundo os autores, estes resultados sugerem vias associadas aos efeitos vasculares, embora nenhum mecanismo tenha sido proposto até então.

Desta maneira, o AP39 mostra potencial como anti-hipertensivo e foram descritos alguns possíveis mecanismos de ação. Desta maneira, muitos efeitos cardiovasculares foram relacionados ao AP39, embora seu mecanismo de ação no vasorelaxamento não tenha sido explorado. Considerando todos os efeitos benéficos associados ao H₂S e especificamente ao AP39, a elucidação dos mecanismos de ação sobre o vasorelaxamento poderia complementar a combinação de efeitos moleculares e cardiovasculares do AP39.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a atividade farmacológica dos doadores de H₂S AP39, ADT-OH e NaHS na reatividade vascular de anéis de artéria mesentérica de 1ª ordem de camundongos *in vitro* e os mecanismos de ação envolvidos.

A estratégia experimental empregada para atingir os objetivos propostos consistiu em:

- Analisar expressão proteica e gênica das enzimas produtoras de H₂S nas artérias mesentéricas de 1ª ordem;
- Avaliar e caracterizar (pelo uso de diferentes inibidores) a produção de H₂S nestas artérias;
- Caracterizar os efeitos dos doadores de H₂S (AP39, ADT-OH e NaHS) sobre a reatividade vascular *in vitro*;
- Elucidar farmacologicamente os possíveis mecanismos de ação do AP39, considerando as vias descritas anteriormente pela literatura acerca do H₂S.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Fármacos

O protocolo experimental foi aprovado pela CEUA/ICB – USP (nº 7759060218). Foram utilizados camundongos C57BL/6 (8 a 10 semanas, 23±1 g), oriundos do biotério de produção de camundongos SPF da Faculdade de Medicina – Rede de Biotérios da Universidade de São Paulo, alojados no biotério II do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12h, água e ração padrão *ad libitum*), de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Os fármacos utilizados no presente estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido) ou Cayman Chemical Co. (Ann Harbor, EUA), com exceção dos doadores de H₂S, AP39 e ADT-OH, que foram gentilmente cedidos pelo Prof. Matthew Whiteman (University of Exeter Medical School, Inglaterra). Segundo o caso, os fármacos foram inicialmente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%, água destilada ou carbonato de sódio 10% e posteriormente diluídos às concentrações utilizadas na respectiva solução de ensaio (solução de Krebs-Henseleit ou tampão fosfato 200 mM). As concentrações finais de DMSO corresponderam até 0,01%.

3.2 Avaliação de expressão proteica por Western Blot

A expressão das enzimas CSE, CBS e 3-MPST em amostras de artérias mesentéricas foi estudada através da técnica de *Western blot*. As amostras foram homogeneizadas em uma proporção volume/massa de amostra de 10 a partir do emprego de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de PMSF, leupeptina (10 µg/ml), inibidor de tripsina (10 µg/ml) e aprotinina (2 µg/ml). Em seguida os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 minutos, e, quantificou-se a concentração total de proteínas dos sobrenadantes (BRADFORD, 1976). As amostras foram diluídas em tampão de Laemmli (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001% e 2-mercaptoetanol 5%) e fervidas em banho-maria por 5 min.

Em seguida, as proteínas presentes nas amostras (10 µg/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo lauril sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) conforme originalmente descrito por LAEMMLI (1970). Durante a eletroforese foi utilizado tampão contendo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e SDS 0,1% e aplicou-se uma amperagem constante de 35 mA por 2 horas. Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas por eletroforese em sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose (200 mA, ~65 V; 1,5 horas). Durante a transferência foi utilizado tampão Tris 25 mM contendo glicina 192 mM, SDS 0,1% e etanol absoluto 18% (V/V). A eficiência da transferência foi verificada pela coloração das membranas com vermelho de Ponceau (0,1% em ácido acético 5%).

Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução de albumina de soro bovino (BSA 3%) em TBS-t (Tris-HCl 20 mM contendo NaCl 137 mM e Tween-20 0,1%, pH 7,4). A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos para as proteínas estudadas (Tabela 1) diluídos em BSA 3% e após lavagens apropriadas (6 vezes, 10 min com TBS-t) as membranas foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase proveniente de raiz forte (HRP) diluídos em BSA 1,5%. As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens (6 vezes, 10 min) e as bandas imunorreativas foram reveladas utilizando-se um kit baseado em reação de quimioluminescência (tipo ECL). O peso molecular das bandas foi comparado com as bandas obtidas do reagente *Precision Plus Protein®* (Bio-Rad, EUA). A tabela 1 indica os pesos moleculares, as quantidades de proteína analisadas e os anticorpos primários e secundários utilizados para cada proteína estudada.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para caracterização da expressão proteica das enzimas produtoras de H₂S por *Western blot* de artérias mesentéricas de camundongos.

Proteína	PM (kDa)	Anticorpo primário	Anticorpo secundário
CSE	43-45	Anti CSE (policlonal, coelho); Proteintech, 1:1500	Anti coelho + HRP (Bio Rad), 1:3000
CBS	~60	Anti CBS (monoclonal, camundongo); Abnova, 1:1500	Anti camundongo + HRP (Bio Rad), 1:3000
3-MST	~32	Anti MPST (policlonal, camundongo); Abnova, 1:1000	Anti camundongo + HRP (Bio Rad), 1:3000

3.3 Avaliação da expressão gênica pela reação da cadeia de polimerase (PCR)

Amostras de artérias mesentéricas de primeira ordem foram coletadas e armazenadas em reagente de extração de RNA (Trizol, Thermo-Fischer, EUA), junto a amostras de cérebro e fígado (utilizadas como controle positivo) na proporção média de 1:10 (mg de amostra/ µL de reagente), sendo prontamente congeladas a -80°C. O RNA total das amostras foi extraído segundo as instruções do fabricante. Após a homogeneização, adicionou-se 200 µL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24/1 v/v) por mL de Trizol e centrifugou-se as amostras (12.000 g, 15 min, 4°C), reservando o sobrenadante.

Quinhentos microlitros do sobrenadante obtido foram transferidos para novos tubos contendo 500 µL de isopropanol para a precipitação do RNA e as amostras foram novamente centrifugadas (12.000 g, 10 min a 4°C). Então, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado com 1 mL de etanol 95%, submetendo-se a uma nova centrifugação (7.000 g, 5 min a 4°C). Repetiu-se o processo anterior com etanol 75%. Após a evaporação do etanol, o precipitado de RNA foi solubilizado em água DEPC e a quantificação do RNA total foi realizada em leitor *Nanodrop 2000®* (Thermo-Scientific, EUA). As concentrações de RNA total foram calculadas em µg/µL.

A síntese de cDNA das amostras foi realizada utilizando-se 180 ng de RNA total em tampão de reação que continha dNTP 10 mM, oligo DT 100mM, DNase I e inibidor de RNases (40 U, *RiboLock® RNase Inhibitor* – Thermo-Fischer, EUA). A reação foi realizada em termociclador (*Personal Cycler®* – Analytik Jena, Alemanha) com

temperaturas e períodos respectivos distintos: 37°C por 10 min; 75°C por 5 min e 37°C por 2 min. A seguir, adicionou-se enzima transcriptase reversa (200 U, *Mm-LV Reverse Transcriptase* – Promega, EUA): 37°C por 1h; 75°C por 15 min; 37°C por 2 min; 4°C por 15 minutos. As amostras foram mantidas a -20°C até a PCR. Os *primers* utilizados para CBS, CSE, 3MPST e GAPDH (tabela 2) foram diluídos para 5 µM com água isenta de nucleases.

Tabela 2 – *Primers* utilizados para a PCR das diferentes enzimas produtoras de H₂S e GAPDH de artérias mesentéricas de camundongos.

Gene	Sequência	Tamanho produto (pb)
CSE	F: 5' - GCA CAA ATT GTC CAC AAA CG - 3' R: 5' – GTC CTT CTC AGG CAC AGA GG – 3'	573
CBS	F: 5' – CTT GGA CAT GCA CTC AGA AAA G - 3' R: 5' – TGA TAG TGT CTC CAG GCT TCA A – 3'	365
3-MST	F: 5' – ATG CCC CAA GAG GAG AAA GT- 3' R: 5' – TAG GCA GCA TGT GGT CGT AG – 3'	381
GAPDH	F: 5' – GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA - 3' R: 5' – TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT – 3'	400

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 4 µL de cDNA, 2,5 uL tampão de PCR (10X), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM), primer 3' (0,3 µM), primer 5' (0,3 µM) e 2 unidades de Taq DNA polimerase (Thermo Fisher, EUA) e água isenta de nucleases. Os ciclos de amplificação foram desenvolvidos em termociclador (*Personal Cycler®* – Analytik Jena, Alemanha), compostos pela desnaturação inicial (94°C por 10 min) seguido por 40 ciclos: 94°C por 1 min, 57 °C por 30s e 72°C por 10 min). Após o término do último ciclo, as amostras foram incubadas a 72°C por 10 min e então, a 4°C por 15 min.

Alíquotas de 12 µL dos produtos da reação de PCR das amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio 3%. Os géis foram revelados sob luz UV utilizando o equipamento de captura *ChemiDoc™ MP Imaging System* (Bio Rad, EUA). Os tamanhos dos produtos do PCR foram estimados a partir da régua 100-Pair ladder (Thermo-Fischer, EUA), comparando com o tamanho esperado dos produtos obtidos.

3.4 Avaliação da produção endógena de H₂S

A produção endógena de H₂S foi avaliada em homogenatos de artéria mesentérica, preparadas em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4 contendo PMSF 1 mM, leupeptina (10 µg/ml), inibidor de tripsina (10 µg/ml) e aprotinina (2 µg/ml). Em seguida os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g por 10 minutos, e, quantificou-se a concentração total de proteínas nos sobrenadantes (BRADFORD, 1976). A concentração de proteínas das amostras foi ajustada para 0,2 mg/mL. Amostras de coração e segmentos de aorta torácica também foram coletados e preparados nas mesmas condições.

Impregnaram-se papéis de filtro com acetato de chumbo (20 mM) e foram colocados em estufa por 12h para secarem. Em placa de 96 poços, incubaram-se os homogenatos (100 µL) a 37°C por 20 minutos junto aos inibidores da produção enzimática de H₂S: DL-propargilglicina (PAG, inibidor seletivo da CSE; 10 mM) e ácido amino-oxiacético (AOAA, inibidor não seletivo das enzimas produtoras de H₂S; 10 mM) de acordo com ASIMAKOPOULOU e colaboradores, (2013). Ainda, para a investigação de possíveis interações do óxido nítrico na produção de H₂S, em outros experimentos foi adicionado nitroprussiato de sódio (NPS, 10 µM; ZHAO, 2001) e as artérias mantidas incubadas neste por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se L-cisteína (10 mM) e 5' fosfato de pirodoxal (2 mM). O papel de filtro impregnado com acetato de chumbo foi sobreposto a placa e o conjunto colocado em estufa a 37°C durante 3h. O procedimento foi sintetizado na figura 4.

A produção de H₂S foi avaliada pela formação de precipitado marrom escuro de sulfeto de chumbo no papel de filtro sobreposto a placa de 96 poços, o que permite a sua quantificação a partir de densitometria (HINE et al., 2015), extrapolando os valores obtidos de uma curva padrão de NaHS (15,1 µM – 500 µM). As produções endógenas de H₂S do coração e artéria torácica, assim como de artérias mesentéricas sob os inibidores (PAG e AOAA) ou NPS, foram avaliadas a partir da normalização da taxa de produção controle (referente a produção total com a adição de veículo).

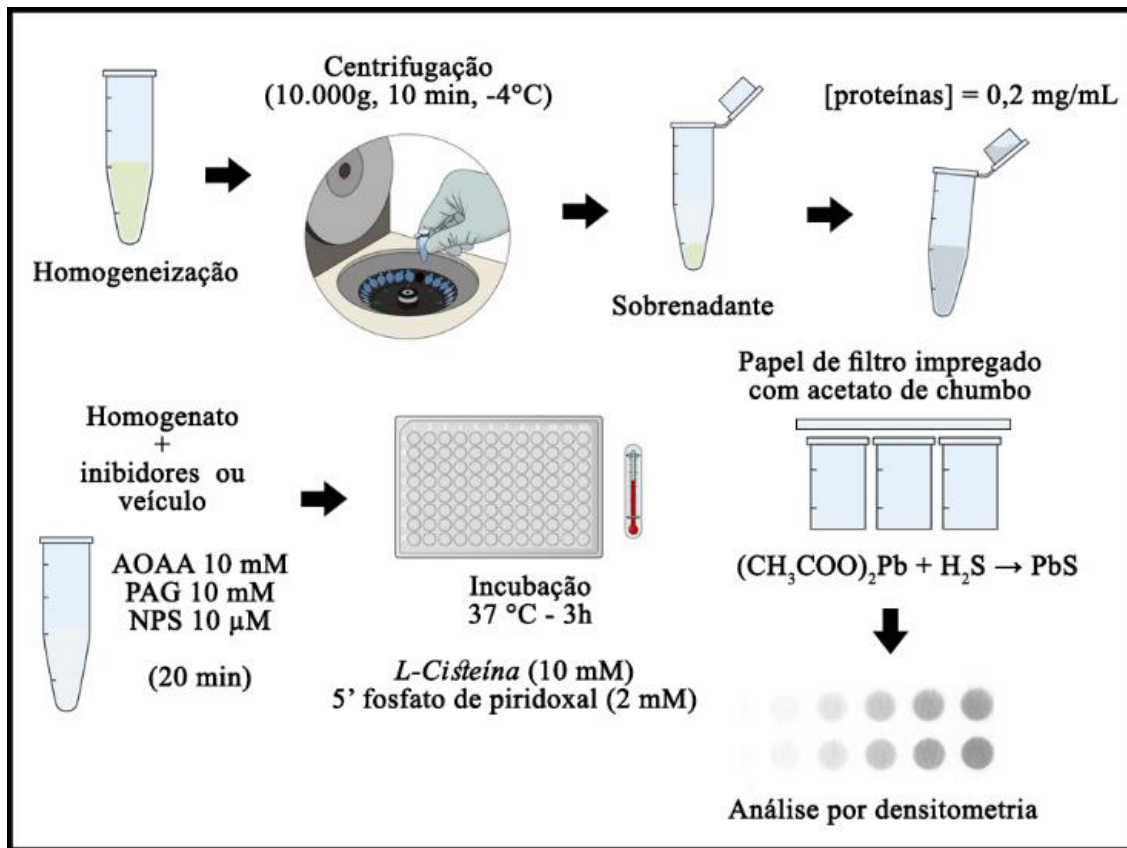


Figura 4 – Procedimento experimental para avaliação da produção endógena de H_2S de homogenatos de artérias mesentéricas camundongos. Após a homogeneização do tecido, as amostras foram centrifugadas. Amostras de coração e artéria aorta torácica foram coletadas nas mesmas condições. A concentração de proteínas totais do sobrenadante foi determinada a partir do método de Bradford (BRADFORD, 1976). A concentração de proteínas utilizada pelo presente estudo foi padronizada a 0,2 mg/mL. Impregnou-se acetato de chumbo (20 mM) em papeis de filtro. O sobrenadante foi misturado aos diferentes inibidores enzimáticos da produção de H_2S endógena: ácido aminoxoacético (AOAA, 10 mM) e D,L propargilglicina (PAG, 10 mM), ao nitroprussiato de sódio (NPS, 10 µM) ou veículo (tampão fosfato 100 mM, pH 7,4) por 20 minutos. Em seguida, as misturas foram dispostas em placa de 96 poços, adicionando-se substrato (*L*-Cisteína 10 mM) e co-fator (5' fosfato de piridoxal 2 mM) enzimáticos. O papel de filtro com acetato de chumbo foi disposto sobre a placa de 96 poços, sendo incubados a 37° C por 3h. O produto da reação entre o H_2S e acetato de chumbo é o sulfeto de chumbo (PbS), o qual precipita-se no papel de filtro. A partir da análise por densitometria, calculou-se as concentrações de H_2S extrapolando-se as concentrações de H_2S de uma curva-padrão de NaHS (15,1 µM – 500 µM). Método adaptado de (HINE et al., 2015). Figura original do autor.

3.5 *Reatividade Vascular - procedimentos experimentais*

Após serem anestesiados pela injeção intraperitoneal (i.p) de uma mistura de cetamina (80 mg. kg⁻¹) e xilazina (20 mg. kg⁻¹), os animais foram eutanasiados por exsanguinação (por secção da artéria carótida e da veia jugular) e retirou-se o leito mesentérico. Os segmentos vasculares foram preparados de acordo com o proposto por Mulvany & Halpern (1977): após dissecação do leito mesentérico, retiraram-se os ramos de artérias mesentéricas de 1ª ordem, colocando-os em placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (em mM: NaCl, 115; NaHCO₃, 25; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄·7 H₂O 1,2; CaCl₂·2 H₂O, 2,5; EDTA, 0,01; glicose 11,1) à 4°C, segmentando-os em anéis de 2 mm. Inseriram-se no lúmen de cada artéria dois fios de tungstênio (40 µm), fixando-os em miógrafo de força (*MultWire Myograph System 620M*, DMT, Dinamarca). Para estudo do papel do endotélio, a retirada mecânica deste se deu pela leve fricção do próprio fio de tungstênio contra a parede interna do anel. Registrou-se a tensão isométrica, processada por um sistema digital de aquisição dos dados (*PowerLab / 8SP*, *ADInstruments*, Austrália).

3.6 *Normalização dos vasos*

A normalização das artérias tem como objetivo determinar a circunferência interna de um anel vascular a qual o desenvolvimento de força é máximo (IC1). A circunferência interna que o anel vascular possui é denominado IC100. Artérias mesentéricas apresentam valor de pressão transmural alvo de 100 mmHg, correspondendo a 13,3 kPa (MULVANY; HALPERN, 1977). Os anéis vasculares foram estabilizados e aquecidos em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4, 37 °C) gaseificada com mistura carbogênica (5% de CO₂ e 95% de O₂), distendendo-os gradualmente e registrando a distância entre os fios de tungstênio (µm) e a força aplicada a cada ponto. O programa de normalização "*DMT Normalization Module*" (ADInstruments, Austrália) foi utilizado para calcular a circunferência interna (µm) a partir da distância dos fios de tungstênio, do diâmetro dos fios utilizados e da tensão da parede (mN/mm) a partir da divisão da força pelo comprimento da parede (duas vezes o comprimento do segmento vascular).

A equação de Laplace [Pressão = tensão da parede / (circunferência interna/(2□))] foi utilizada para estimar a pressão necessária para distender o anel vascular a cada circunferência interna calculada. Ajustando a equação de Laplace na curva gerada pela tensão na parede do vaso plotada contra a circunferência interna, determinou-se IC100. IC1 foi calculada através da fórmula $IC1 = 0,90 \times IC100$, resultando na circunferência interna cuja produção de força e sensibilidade do vaso aos agonistas é máxima. Obteve-se o diâmetro interno normalizado, a partir da divisão de IC1 por π .

3.7 *Teste funcional do músculo liso vascular e endotélio*

Após o processo de normalização, verificou-se a integridade funcional do músculo liso vascular das artérias pela adição de cloreto de potássio (KCl 120 mM). Foram utilizados os segmentos vasculares que responderam à contração ao KCl com amplitude de tensão vascular ativa acima de 1,5 mN/mm.

Após 30 min de repouso, testou-se a integridade funcional do endotélio. Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (Phe) até a resposta contrátil referente a 70% da tensão resposta ao KCl ($1,7 \pm 0,3 \mu\text{M}$), e em seguida, adicionou-se acetilcolina (ACh, 10 μM). Os anéis que apresentaram relaxamento acima de 80% foram utilizados para a construção de curvas concentração-resposta para os diversos agentes vasoativos a serem descritos adiante. Os anéis sem endotélio não mostraram relaxamento frente à ACh. Após o teste da integridade do endotélio, os vasos foram lavados e mantidos em repouso por 35 minutos.

3.8 *Caracterização da preparação*

Como primeira medida da avaliação do papel do endotélio, foi avaliada a resposta ao KCl na presença ou não do endotélio. Além disso, foram confeccionadas curvas concentração-resposta aos agentes vasoativos: Phe, ACh e nitroprussiato de sódio (NPS) a fim de caracterizar a importância do papel do endotélio na preparação do presente estudo. As amplitudes de concentrações utilizadas na caracterização foram sintetizadas na tabela 3. Além da retirada física do endotélio, foi avaliada a inibição farmacológica das principais vias sinalizadoras envolvidas na resposta à ACh

pela utilização de nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μM ; MOAT et al., 2006) junto a indometacina (10 μM ; MOAT et al., 2006), assim como o papel da sinalização endógena do H_2S através da inibição não específica das enzimas produtoras de H_2S a partir do ácido amino-oxiacético (10 mM, AOAA).

Tabela 3 – Agentes vasoativos e suas respectivas concentrações utilizadas na padronização da resposta vascular de anéis de artérias mesentéricas de camundongos.

Reagente	Concentração (M)
KCl	$1,2 \times 10^{-1}$
fenilefrina (Phe)	10^{-9} a 3×10^{-5}
acetilcolina (ACh)	10^{-11} a 10^{-4}
nitroprussiato de sódio (NPS)	10^{-11} a 3×10^{-4}

3.9 Curvas concentração-resposta aos doadores de H_2S e frente aos inibidores

As concentrações de AP39 utilizadas foram definidas a partir dos resultados obtidos por Gerõ e colaboradores, (2016), considerando a viabilidade de células endoteliais expostas ao composto. Curvas sem estímulo pré-contrátil foram confeccionadas a fim de avaliar os efeitos do AP39 e ADT-OH sobre artérias mesentéricas *in vitro* sem estímulos contráteis prévios, diferenciando os efeitos sobre artérias entre artérias com endotélio intacto (E+) ou mecanicamente removido (E-).

Em experimentos seguintes, foram confeccionadas curvas concentração-resposta pré-contraindo os anéis de artéria com ou sem endotélio a tensão referente a 70% da resposta ao KCl 120 mM (concentração média de fenilefrina = $1,6 \pm 0,34 \mu\text{M}$). As concentrações de ADT-OH e NaHS utilizadas foram equimolares as concentrações de AP39. No caso do NaHS, adicionou-se concentrações mais elevadas para a formação do platô inferior. As faixas de concentrações de ambos os compostos utilizadas nas curvas concentração-resposta foram sintetizadas na tabela 4. O efeito máximo obtido (E_{max}), assim como a potência, expressa como pA_2 e obtida por $-\log\text{EC}_{50}$ (EC_{50} é a concentração de agonista necessária para obter-se 50% do efeito máximo) de cada doador foram calculados a partir das curvas concentração-resposta.

Tabela 4 – Doadores de H₂S e suas respectivas concentrações utilizadas nas curvas concentração-resposta vascular sobre o tônus basal e sob pré-contracção com fenilefrina.

Doador de H₂S	Concentrações (M)
AP39	10 ⁻¹³ a 3.10 ⁻⁸
ADT-OH	10 ⁻¹³ a 3.10 ⁻⁸
NaHS	10 ⁻¹³ a 10 ⁻⁵

As vias de transdução de sinal envolvidas na resposta ao AP39 e NaHS foram avaliadas farmacologicamente utilizando indometacina, inibidor não seletivo das ciclo-oxigenases (10 µM – MOAT et al., 2006), L-NAME, inibidor não seletivo das óxido nítrico sintases (100 µM – MOAT et al., 2006), ODQ, inibidor seletivo da guanilil ciclase solúvel (10 µM, SANTOS et al., 2017), sildenafil, inibidor da fosfodiesterase tipo V (1 nM, BUCCI et al., 2012), ácido oxi-aminoacético, inibidor não seletivo das enzimas produtoras de H₂S (AOAA, 10 mM), tetraetilamônio, bloqueador não seletivo de canais de potássio (TEA, 3 mM – HEDEGAARD et al., 2016), glibenclamida, bloqueador seletivo dos canais K_{ATP} (10 µM; HEDEGAARD et al., 2016) e apamina, bloqueador seletivo de K_{Ca} (5 µM; CHENG et al., 2004). Os inibidores foram adicionados às cubas do miógrafo 30 min antes da confecção das curvas concentração-resposta.

3.10 Análises estatísticas

Foi utilizado o software GraphPad Prism 6.0 para a análise estatística dos dados. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Diferenças entre os grupos quanto ao diâmetro dos vasos, E_{max} na tensão basal, E_{max} e pA₂ nos experimentos de vasorelaxamento foram avaliadas através de teste *t* de Student para valores não pareados. Após análise de homogeneidade e normalidade das variâncias, diferenças de produção de H₂S na presença dos inibidores e nitroprussiato de sódio foram analisadas por ANOVA de uma via. Diferenças com valores de P<0,05 foram consideradas estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão proteica, gênica e produção de H₂S

As expressões de todas as enzimas (CSE, CBS e 3MPST) foram detectadas pela análise por *Western Blot* (Figura 5A). No caso da expressão gênica, apenas a enzima CSE foi identificada a partir da análise pela PCR (Figura 5B).

Para a caracterização da produção de H₂S, a comparação entre a produção de artérias mesentéricas (24,9±2,7 μM; n=5), artéria aorta torácica (39,1±5,5 μM; n=5) e coração (44,9±12,4 μM; n=5) não mostrou diferenças estatisticamente significativas (Figura 5C). A produção endógena de H₂S dos homogenatos de artérias mesentéricas foi reduzida pelos inibidores PAG (10 mM, n=5) e AOAA (10 mM, n=5) para 47,8±11% (*P<0,05) e 0% (**P<0,001), respectivamente (Figura 5D). Além disso, o NPS (10 μM, n=5) também reduziu a produção de H₂S (54,1±3,5%; *P<0,05; Figura 5D).

4.2 Caracterização da montagem

Os diâmetros médios das artérias com (182±11 μm; n=15) ou sem (176±20 μm; n=15) endotélio não se mostraram diferentes. A retirada do endotélio não alterou a resposta ao KCl ($E_{\max} E+=2,9\pm0,2$ mN/mm⁻¹, n=15; $E_{\max} E-=3,2\pm0,3$ mN/mm⁻¹, n=15; Figura 6A), assim como não afetou a resposta à Phe ($E_{\max} E+=2,3\pm0,1$ mN/mm⁻¹, n=6; $E_{\max} E-=2,3\pm0,2$ mN/mm⁻¹, n=6; pA₂ E⁺=6,60±0,10, n=6; pA₂ E⁻=6,70±0,15, n=6; Figura 6B).

A concentração média de Phe necessária para atingir-se 70% da resposta ao KCl foi de 1,7±0,3μM. A retirada do endotélio atenuou a resposta à ACh ($E_{\max} E+=102,1\pm9,1\%$, n=5; $E_{\max} E-=56,5\pm7,6\%$, n=5; **P<0,01; Figura 6C). Ainda, a inibição concomitante da produção de NO e de prostanoídes reduziu o efeito da ACh ($E_{\max} E+=102,1\pm9,1\%$, n=5; $E_{\max} ACh_{L-NAME+Indo}=50,0\pm4,7\%$, n=5; ***P<0,001) e sua potência (pA₂ E⁺=7,40±0,50, n=6; pA₂ ACh_{L-NAME+Indo}=9,60±0,70, n=5, *P<0,05; Figura 6C). A retirada do endotélio não afetou o vasorelaxamento em resposta ao NPS ($E_{\max} E+=102,5\pm1,4\%$, n=8; $E_{\max} E-=102\pm2,3\%$, n=5; pA₂ E⁺=7,93±0,90, n=5; pA₂ E⁻=8,90±0,20, n=5; Figura 6D).

A incubação em AOAA diminuiu o vasorelaxamento da ACh (E_{\max} ACh=72,5±4,6%, n=6; E_{\max} ACh+AOAA=76,8±8,45%, n=6; *P<0,05) mas aumentou sua potência (pA_2 ACh=7,40±0,50, n=6; pA_2 ACh + AOAA = 9,80±0,60, n=6; *P<0,05; Figura 6E). A resposta ao NPS não foi alterada pela incubação em AOAA (E_{\max} NPS=102,5±1,4%, n=7; E_{\max} NPS+AOAA=99,3±1,0%, n=6; pA_2 NPS=12,20±0,35, n=7; pA_2 NPS+AOAA=8,55±0,40, n=6; Figura 6F). Os dados a respeito da caracterização da montagem foram sintetizados na tabela 5.

Tabela 5 - Caracterização da resposta vascular de artérias mesentéricas de camundongos C57BL/6 a diferentes agentes vasoativos constritores, como cloreto de potássio (KCl), fenilefrina (Phe), ou relaxadores, como acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (NPS) em artérias pré-contraídas com Phe. *P<0,05, **P<0,01 ou ***P<0,001 vs. E+.

Grupo	E_{\max}	pA_2	n
KCl E+	2,9±0,2 mN/mm ⁻¹	-	15
KCl E-	3,2±0,3 mN/mm ⁻¹	-	15
Phe E+	2,3±0,1 mN.mm ⁻¹	6,60±0,10	6
Phe E-	2,3±0,2mN.mm ⁻¹	6,70±0,15	6
ACh E+	102,1±9,1%	7,60±0,50	5
ACh E-	56,5±7,6%**	7,80±0,80	5
ACh L-NAME+ Indo	50,0±4,7%***	9,60±0,70*	5
ACh + AOAA	76,8±8,45%*	9,80±0,60*	5
NPS E+	102,5±1,4%	7,93±0,90	7
NPS E-	102,0±2,3%	8,90±0,20	8
NPS + AOAA	99,3±1,0%	8,55±0,40	6

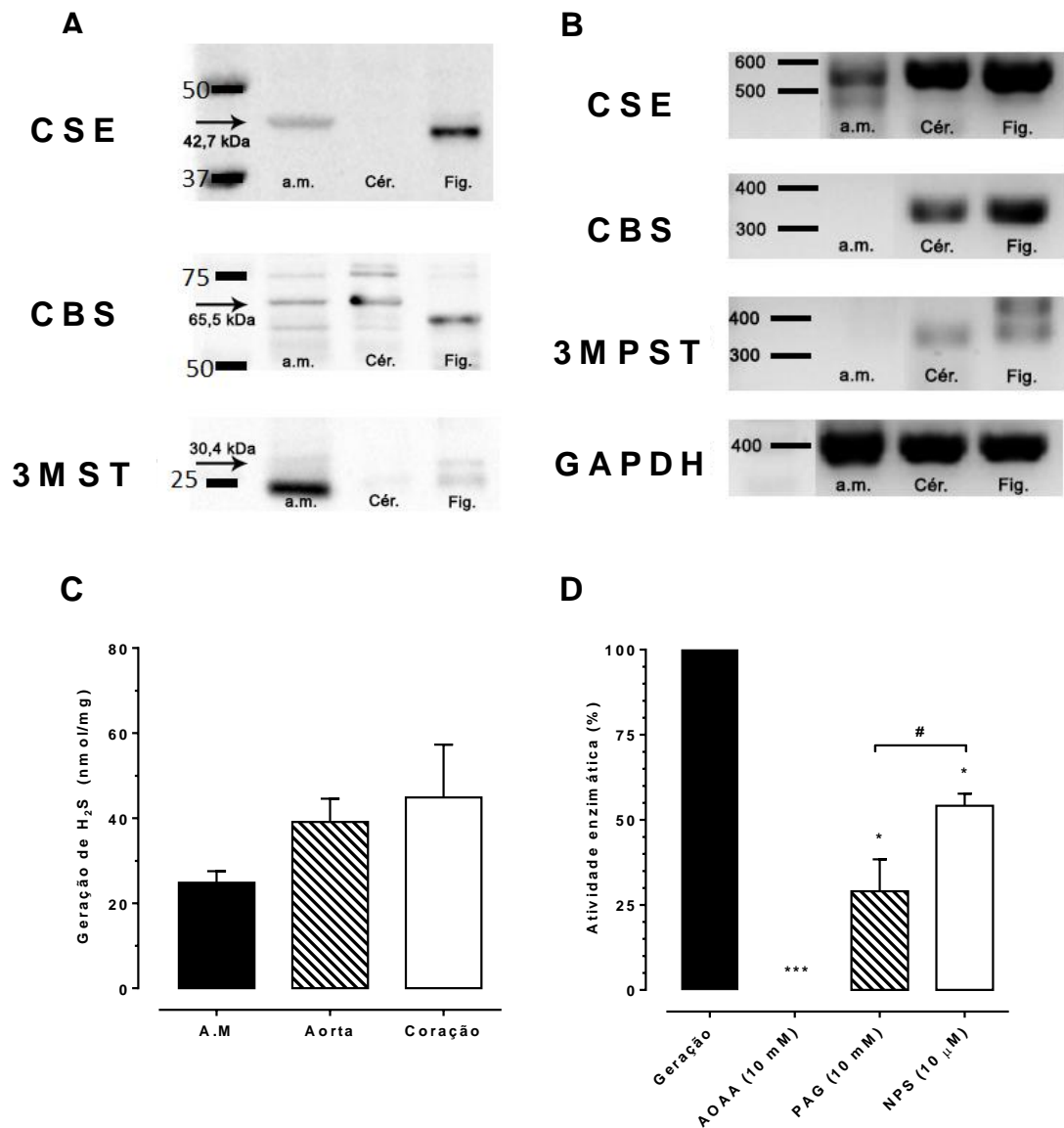


Figura 5 – Expressão proteica e gênica das enzimas produtoras de H₂S a partir da análise de Western Blot e PCR, e capacidade de produção endógena de H₂S em artérias mesentéricas de camundongos C57BL/6 a partir do método baseado na formação de sulfeto de chumbo. **Painel A e B:** imagens representativas da expressão proteica e gênica das enzimas CSE, CBS e 3MPST, junto aos controles positivos utilizados para CSE e 3MPST (fígado) e CBS (cérebro) e controle interno do PCR (GADPH). **Painel C:** Produção endógena de H₂S de homogenatos de artérias mesentéricas, artéria aorta torácica e coração de camundongos. **Painel D:** Produção endógena de H₂S das artérias mesentéricas (n=5) e produção na presença de inibidor não específico das enzimas produtoras de H₂S (ácido aminooxoacético - AOAA, 10 mM, n=5), inibidor com maior seletividade a CSE, (D,L-propargilglicina - PAG, 10 mM, n=5) ou nitroprussiato de sódio (NPS, 10 μM, n=5). Dados expressos como média±EPM. ANOVA 1-via, *P<0,05 vs. Geracão, ***P<0,001 vs. Geracão, # P<0,05.

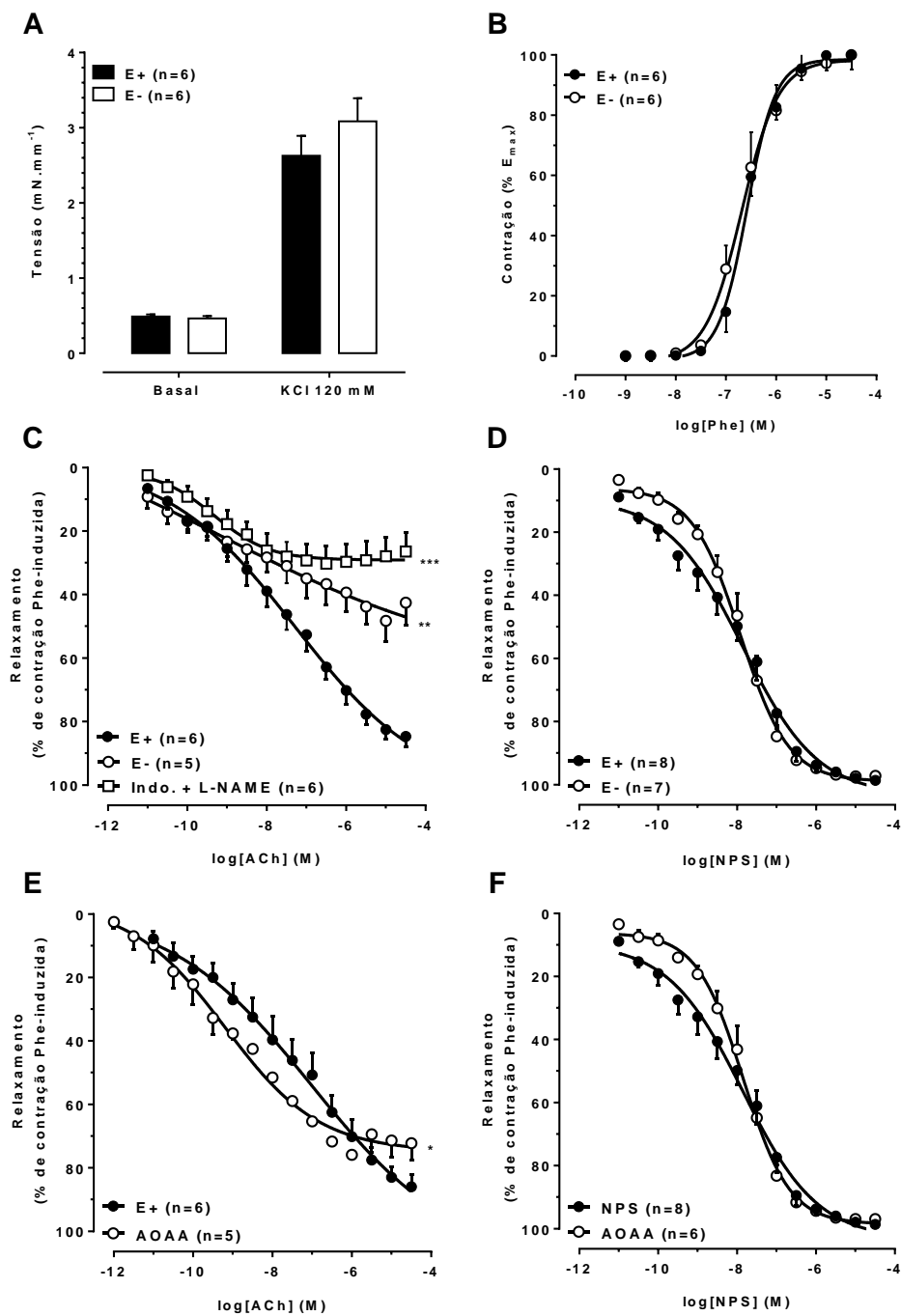


Figura 6 – Curvas concentração-resposta da padronização da atividade vascular de artérias mesentéricas de camundongos in vitro na presença (E+) ou não (E-) do endotélio. **Painel A:** Resposta ao KCl 120 mM. **Painel B:** Resposta à fenilefrina (Phe). **Painel C:** Resposta à acetilcolina (ACh) e resposta à ACh após inibição farmacológica das enzimas NOS, COX e de canais de K^+ com N^{G} -Nitroarginina Metil Éster (L-NAME) 100 μM , indometacina 10 μM e tetraetilamônio (TEA), respectivamente. **Painel D:** Resposta ao nitroprussiato de sódio (NPS). **Painel E e F:** Resposta à ACh e NPS após inibição farmacológica não específica das enzimas produtoras de H_2S (ácido aminoacético - AOAA, 10 mM). Resultados expressos como média \pm EPM. Teste t de Student não pareado. Diferenças de E_{max} expressas como * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ vs. E+.

4.3 Efeitos do AP39 e ADT-OH sobre o tônus basal

As concentrações de AP39 utilizadas alteraram a tensão basal das artérias mesentéricas com endotélio removido (E_{\max} E- = $7,1 \pm 1,1\%$; n=5), quando comparado ao grupo com o endotélio intacto (E_{\max} E+ = $1,60 \pm 0,50\%$; n=5; **P<0,01; Figura 7). O ADT-OH não promoveu qualquer diferença na tensão basal de artérias mesentéricas com o endotélio intacto (E_{\max} ADT-OH E+ = $2,20 \pm 2,28\%$; n=6) comparando-se ao grupo com o endotélio removido (E_{\max} ADT-OH E- = $4,3 \pm 4,7\%$; n=6; Figura 7). Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação entre o ADT-OH e AP39 nos grupos com o endotélio intacto (E_{\max} AP39 E+ = $1,60 \pm 0,50\%$; n=5; E_{\max} ADT-OH E- = $2,20 \pm 2,28\%$; n=6; Figura 7). A tabela 6 resume os dados dos experimentos relacionados a alterações na tensão basal das artérias mesentéricas com as diferentes espécies utilizadas no presente estudo.

Tabela 6 – Variação máxima do tônus basal de anéis de artérias mesentéricas de camundongos com endotélio intacto (E+) ou removido (E-) induzida pelos doadores de H₂S AP39 e ADT-OH. **P<0,01 vs. E+.

Protocolo	E_{max} (%)	n
AP39 E+	1,6±0,5	5
AP39 E-	7,1±1,1**	5
ADT-OH E+	2,2±2,3	6
ADT-OH E-	4,25±4,7	6

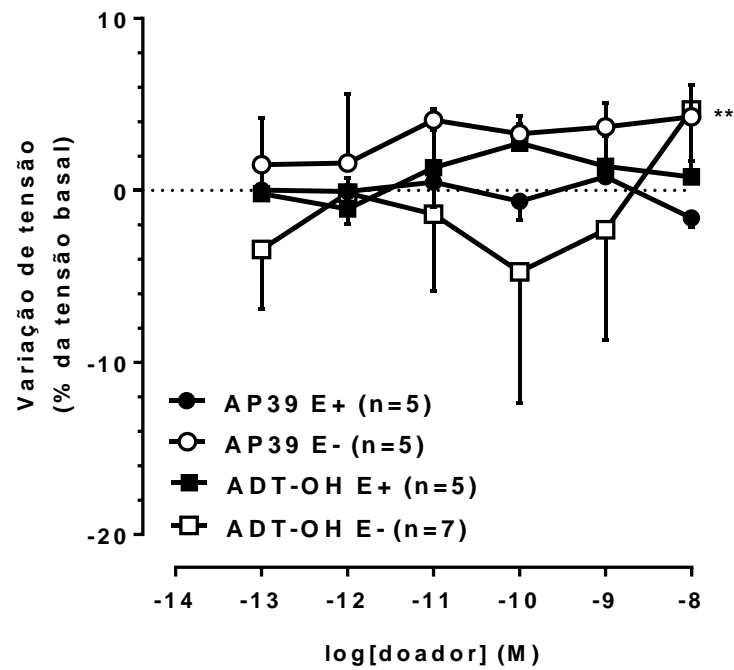


Figura 7 – Efeitos dos doadores de H₂S, AP39, ADT-OH e NaHS sobre o tônus basal de artérias mesentéricas de camundongos. Curvas concentração-resposta dos grupos AP39 e ADT-OH sobre o tônus basal de anéis de artérias mesentéricas com endotélio intacto (E+) ou removido (E-). Dados expressos como média±EPM. Teste t de Student não pareado. Diferenças de E_{max} expressas como **P<0,01 vs. AP39 E+.

4.4 Efeitos vasorelaxantes do AP39, ADT-OH e NaHS

A retirada do endotélio diminuiu o vasorelaxamento do AP39 em artérias pré-contraídas com Phe (E_{\max} AP39 E+=72,5±4,6%, n=7; E_{\max} AP39 E-=34,6±2,0%, n=5; ***P<0,001; pA_2 AP39 E+=12,20±0,35, n=7; pA_2 AP39 E-=9,40±0,60, n=5; **P<0,01; Figura 8A), relação também observada no vasorelaxamento promovido pela porção doadora de H₂S do AP39, ADT-OH (E_{\max} ADT-OH E+=52,4±5,0%, n=8; E_{\max} ADT-OH E-=36,75±2,2%, n=7; *P<0,05; Figura 8B). Ainda, o vasorelaxamento promovido pelo ADT-OH se mostrou menor ao promovido pelo AP39 (E_{\max} ADT-OH E+=52,4±5,0%, n=8; E_{\max} AP39 E-=72,5±4,6%, n=7; *P<0,05; Figura 8C).

O vasorelaxamento do NaHS mostrou-se dependente do endotélio (E_{\max} NaHS E+=84,0±7,7%, n=5; E_{\max} NaHS E-=47,1±5,7%, n=5; **P<0,01; Figura 8D). Todos os resultados referentes a atividade vasorelaxante dos diferentes doadores testados foram resumidos na tabela 7.

Tabela 7 – Vasorelaxamento induzido pelos doadores de H₂S AP39, ADT-OH e NaHS em artérias mesentéricas de camundongos pré-contraídas com Phe com endotélio intacto (E+) ou removido (E-). *P<0,05 e **P<0,01 vs. E+.

Grupo	E_{\max} (%)	pA_2	n
AP39 E+	72,5±4,6	12,20±0,35	7
AP39 E-	34,6±2,0**	9,40±0,60*	5
ADT-OH E+	52,4±5,0 [#]	11,50±0,35	8
ADT-OH E-	36,75±2,2*	11,00±0,45	7
NaHS E+	84,0±7,7	11,45±0,45	5
NaHS E-	47,1±5,7**	10,60±1,00	5

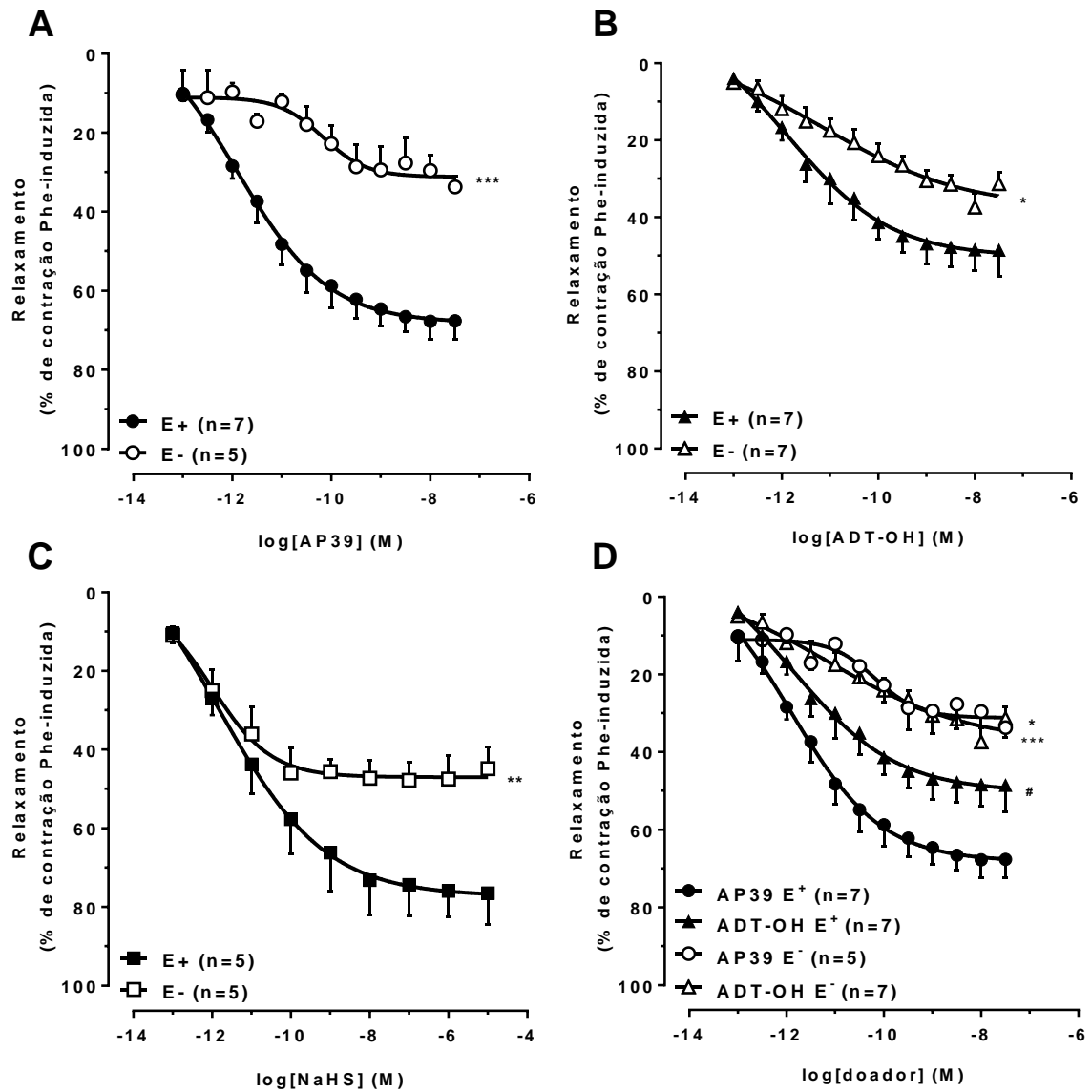


Figura 8 – Curvas concentração-resposta do vasorelaxamento dos doadores de H_2S AP39, ADT-OH e NaHS. **Painéis A, B e C**: Vasorelaxamento induzido pelo AP39, ADT-OH e NaHS na presença ou não do endotélio em artérias mesentéricas de camundongos pré-contraídas com fenilefrina. **Painel D**: Comparação do papel do endotélio no vasorelaxamento induzido pelos doadores de H_2S AP39 e ADT-OH. Dados expressos como média \pm EPM. Teste t de Student não pareado. Diferenças de E_{max} - expressas como * $P < 0,05$ vs. E+; ** $P < 0,01$ vs. E+; *** $P < 0,001$ vs. E+; # $P < 0,05$ e # $P < 0,05$ vs. AP39 E+.

4.5 Participação das ciclo-oxigenases (COX) nos efeitos do AP39 e NaHS

A incubação com indometacina não atenuou o vasorelaxamento promovido pelo AP39 (E_{\max} AP39=72,5±4,6%, n=7; E_{\max} AP39+indometacina=57,1±6,30%, n=7; pA_2 AP39=12,20±0,35, n=7; pA_2 AP39+indometacina=11,90±0,35, n=7; Figura 9A), assim como o vasorelaxamento promovido pelo NaHS (E_{\max} NaHS=84,0±7,8%, n=5; E_{\max} NaHS+indometacina=70,0±4,6%, n=5 – pA_2 NaHS=11,45±0,45, n=5; pA_2 NaHS+indometacina=11,55±0,60; Figura 9B).

4.6 Participação da via do NO nos efeitos do AP39 e NaHS

Na presença de L-NAME, o vasorelaxamento induzido pelo AP39 foi significativamente diminuído (E_{\max} AP39=72,5±4,6%, n=7; E_{\max} AP39+L-NAME=23,9±5,1%, n=5; ***P<0,001; pA_2 AP39 = 12,20±0,35, n=7; pA_2 AP39+L-NAME=10,50±0,70, n=5; ***P<0,001; Figura 9C), assim como no vasorelaxamento promovido pelo NaHS (E_{\max} NaHS=84,0±7,7%, n=5; E_{\max} NaHS+L-NAME=44,0±7,0%, n=5; ***P<0,001; pA_2 NaHS=11,45±0,45, n=5; pA_2 NaHS+L-NAME=11,20±0,40, n=5; ***P<0,001; Figura 9D).

Além disso, a inibição das guanilato ciclases solúveis (GCs) pelo ODQ também diminuiu o vasorelaxamento induzido pelo AP39 (E_{\max} AP39=72,5±4,6%, n=7; E_{\max} AP39+ODQ=22,9±3,4%, n=6; **P<0,01; pA_2 AP39=12,20±0,35, n=7; pA_2 AP39+ODQ=11,3±0,2, n=6; ***P<0,001; Figura 9C), assim como no vasorelaxamento promovido pelo NaHS (E_{\max} NaHS=84,0±7,7%, n=5; E_{\max} NaHS+ODQ=32,9±4,4%, n=6; **P<0,01; pA_2 NaHS=11,45±0,45, n=5; pA_2 NaHS+ODQ=9,6±0,45, n=6; *P<0,05; Figura 9D). Entretanto, a inibição da fosfodiesterase 5 não interferiu no vasorelaxamento promovido pelo AP39 (E_{\max} AP39=72,5±4,6%, n=7; E_{\max} AP39+sildenafil=81,0±5,7%, n=7; pA_2 AP39=12,20±0,35, n=7; pA_2 AP39+sildenafil=11,7±0,30, n=7; Figura 9C) ou pelo vasorelaxamento induzido pelo NaHS (E_{\max} NaHS=84,0±7,7%, n=5; E_{\max} NaHS+sildenafil=87,8±3,9%, n=6; pA_2 NaHS=11,45±0,45, n=5; pA_2 NaHS+sildenafil=12,25±0,90, n=6; Figura 9D).

4.7 Participação da via de sinalização do H₂S endógeno nos efeitos do AP39 e NaHS

A inibição promovida pelo AOAA não alterou o vasorelaxamento promovido pelo AP39, entretanto diminuiu sua potência (pA_2 AP39=12,20±0,35, n=7; pA_2 AP39+AOAA=10,95±0,25, n=6; *P<0,05; Figura 9E). A inibição da produção endógena de H₂S não afetou o vasorelaxamento induzido pelo NaHS (Figura 9F).

4.8 Papel dos canais de K⁺ sobre o efeito do AP39 e NaHS

A inibição inespecífica dos canais de K⁺ diminuiu o vasorelaxamento induzido pelo AP39 (E_{max} AP39=72,5±4,6%, n=7; E_{max} AP39+TEA=38,6±4,6%, n=7; ***P<0,001; Figura 10A), assim como no caso do NaHS (E_{max} NaHS=84,0±7,7%, n=5; E_{max} NaHS+TEA=45,8±4,7%, n=5; **P<0,01; Figura 10B).

Além disso, a inibição dos canais K_{Ca} reduziu ambos os relaxamentos promovidos pelo AP39 (E_{max} AP39=72,5±4,6%, n=7; E_{max} AP39+apamina=52,0±4,8%, n=6; *P<0,05; Figura 10C) e NaHS (E_{max} NaHS=84,0±7,7%, n=5; E_{max} NaHS+apamina=45,0±3,0%, n=5; Figura 10D), entretanto, não alterou suas potências. O vasorelaxamento induzido pelo AP39 não foi reduzido pela inibição de K_{ATP} (E_{max} AP39=72,5±4,6%, n=7; E_{max} AP39+glibenclamida=72,6±4,3%, n=5; Figura 10E). Por outro lado, a inibição de K_{ATP} reduziu significativamente o vasorelaxamento promovido pelo NaHS (E_{max} NaHS=84,0±7,7%, n=5; E_{max} NaHS+glibenclamida=42,5±7,6%, n=5; **P<0,01; pA_2 NaHS=11,45±0,45, n=5; pA_2 NaHS+glibenclamida=9,50±0,90, n = 5; *P<0,05; Figura 10F).

Por último, a inibição conjunta das NOS, COX e não seletiva de canais de K⁺ diminuiu o vasorelaxamento induzido pelo AP39 (E_{max} AP39=72,5±4,6%, n=7; E_{max} AP39+L-NAME+TEA+Indo.=31,0±7,8%, n=7; ***P<0,01; pA_2 AP39=12,20±0,35, n=7; pA_2 AP39+ L-NAME+TEA+Indo.=10,20±0,4, n=7; **P<0,01; Figura 10E) e pelo NaHS (E_{max} NaHS=84,0±7,7%, n=5; E_{max} NaHS+L-NAME+TEA+Indo.=39,6±4,0%, n=5; ***P<0,01; pA_2 NaHS=11,45±0,45, n=5; pA_2 NaHS+L-NAME+TEA+Indo.= 9,90±0,85; n=5; Figura 10F). Todos os resultados referentes aos mecanismos de ação do AP39 e NaHS foram resumidos na tabela 8.

Tabela 8 – Descrição dos mecanismos de ação do vasorelaxamento induzido por AP39 e NaHS em artérias mesentéricas de camundongos pré-contraídas com Phe com endotélio intacto (E+), removido (E-) ou com endotélio intacto na presença de diferentes inibidores. *P<0,05 e **P<0,01 vs. E+.

Protocolo	AP39			NaHS		
	E _{max} (%)	pA ₂	n	E _{max} (%)	pA ₂	n
E+	72,5±4,60	12,2±0,35	7	83,7±7,8	11,45±0,45	5
E-	34,6±3,10**	9,95±0,60**	5	47,1±5,7**	10,6±0,95	5
Indometacina 10 µM	57,1±6,30	11,6±0,40	7	69,8±4,7	11,55±0,6	5
L-NAME 100 µM	23,9±5,10**	10,5±0,70*	5	44,0±7,0**	11,2±0,40	5
ODQ 10 µM	22,9±3,30**	11,3±0,20	7	32,9±4,4**	9,6±0,45*	5
Sildenafil 5 nM	81,0±5,70	11,7±0,30	7	87,8±3,9	12,25±0,90	5
AOAA 10 mM	72,8±6,40	10,95±0,25*	7	63,6±5,3	11,87±0,40	7
TEA 3 mM	38,6±4,6**	11,5±0,30	7	45,8±4,7**	9,7±1,00	5
Glibenclamida 10 µM	72,6±4,20	11,2±0,55	5	42,5±7,7**	9,05±1,00*	5
Apamina 5 µM	52±4,90*	11,5±0,40	7	45,05±3,05**	11,15±0,40	5
L-NAME + TEA + Indo.	31,0±7,80**	10,2±0,40*	7	39,6±4,0**	9,9±0,85	5

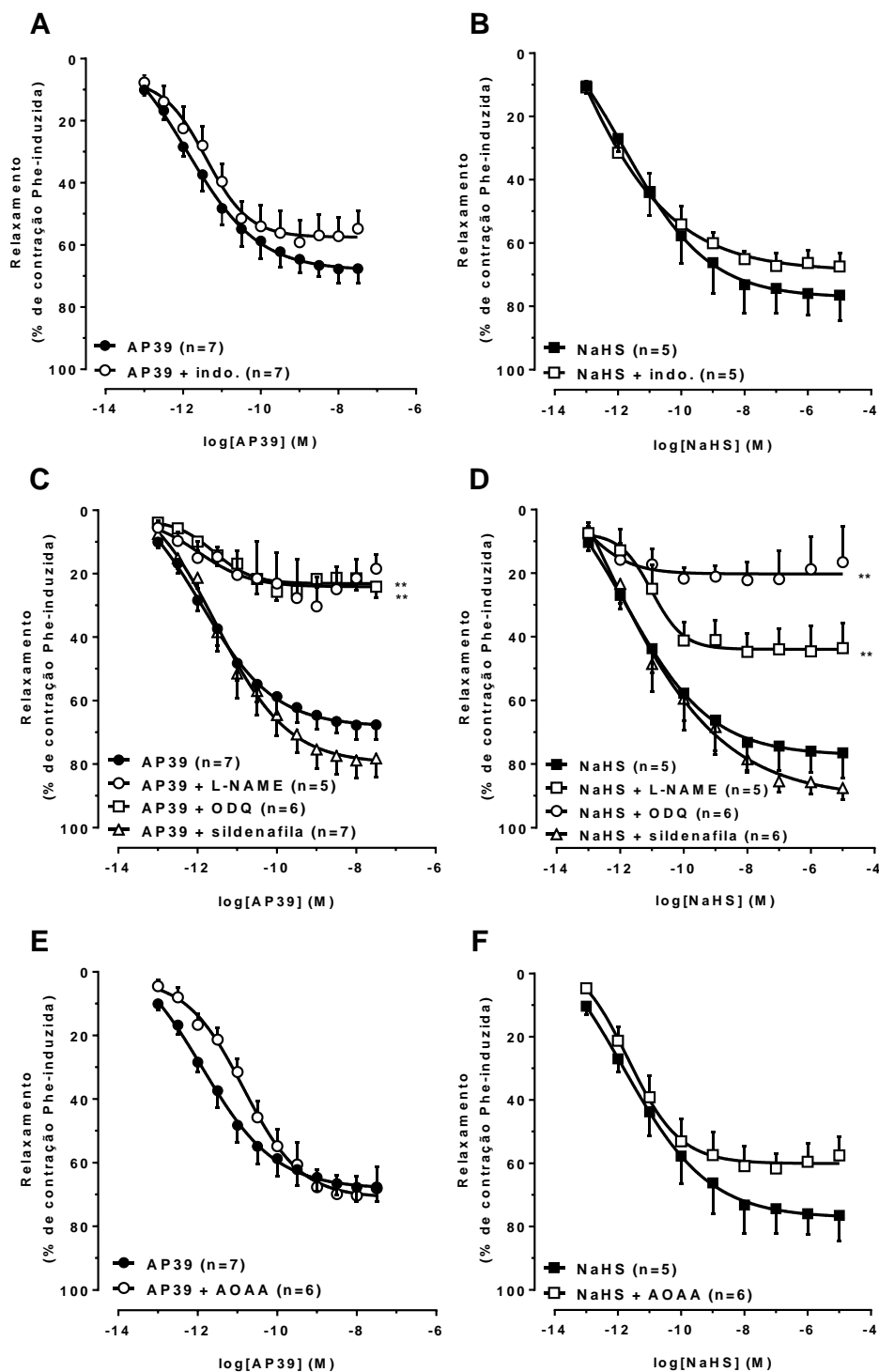


Figura 9 – Os mecanismos de ação do vasorelaxamento induzido por AP39 e NaHS em artérias mesentéricas de camundongos. **Painéis A e B:** Curvas concentração-resposta ao AP39 e NaHS após incubação em indometacina 10 μ M. **Painéis C e D:** Curvas concentração-resposta ao AP39 e NaHS após incubação com L-NAME 100 μ M, ODQ 10 μ M ou sildenafil 1 nM. **Painéis E e F:** Curvas concentração-resposta ao AP39 e NaHS após incubação com ácido oxoaminoacético (AOOA, 10 mM). Dados expressos como média \pm EPM. Teste t de Student não pareado. Diferenças de E_{max} expressas como * $P < 0,05$ vs. E+ e *** $P < 0,05$ vs. E+.

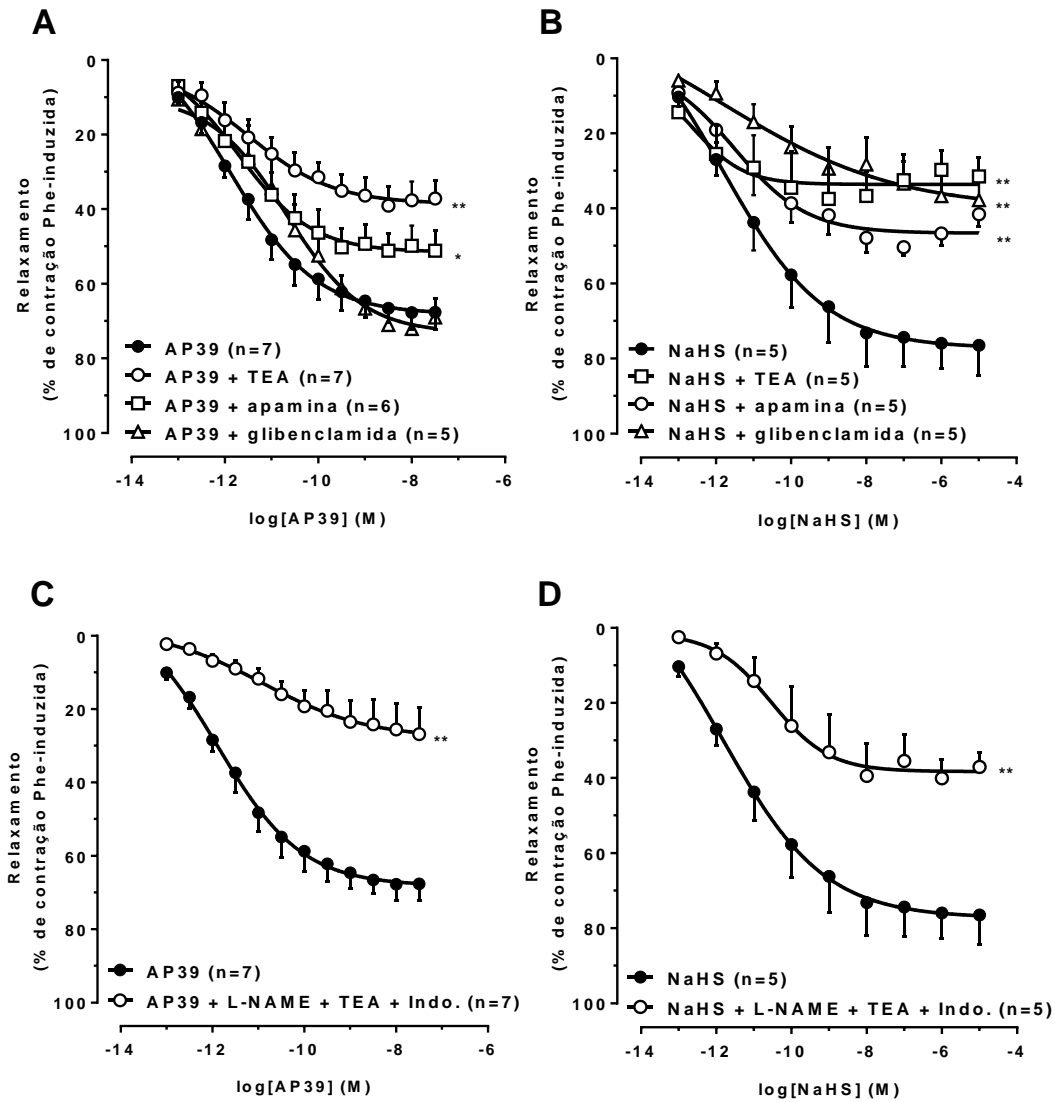


Figura 10 – Participação dos canais de K^+ e a associação das vias de sinalização dependentes de NOS e COX no vasorelaxamento induzido pelo AP39 e NaHS. **Painéis A e B:** Curvas concentração-resposta ao AP39 e NaHS após incubação em TEA 3 mM, apamina 5 μ M ou glibenclamide 10 μ M. **Painéis C e D:** Curvas concentração-resposta ao AP39 e NaHS após a incubação da combinação de L-NAME 100 μ M, TEA 3 mM e indometacina 10 μ M e. Dados expressos como média \pm EPM. Teste t de Student não pareado. Diferenças de E_{max} expressas como * $P < 0,05$ vs. E+ e *** $P < 0,01$ vs. E+.

5 DISCUSSÃO

As doenças cardiovasculares possuem grande importância na saúde pública, dada a grande incidência e prevalência destas na população mundial (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016). Aspectos genéticos e ambientais como o estresse psíquico, consumo de álcool, tabagismo e dieta desbalanceada são relacionados aos fatores etiológicos moleculares das doenças cardiovasculares (WONG et al., 2006). Desta maneira, para o combate adequado frente ao risco destas na sociedade, o constante estudo de novas estratégias para o combate e prevenção das doenças cardiovasculares é necessário.

Além disso, as doenças cardiovasculares também são caracterizadas pela menor produção de óxido nítrico (NASEEM, 2007), diretamente associado ao aumento do estresse oxidativo celular (FÖRSTERMANN, 2010), causando a disfunção endotelial observada em grande parte das doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, hipertensão e doença obstrutiva coronária (HIGASHI et al., 2009).

Atualmente a interação entre as vias de produção do H₂S e NO é interpretada como um mecanismo de regulação da produção destes neurotransmissores no sistema cardiovascular. Em células endoteliais, o H₂S foi capaz de induzir a produção de NO, ao passo que a inibição de CSE reduziu a produção de NO (ALTAANY; YANG; WANG, 2013). Desta forma, considerando os efeitos diretos no vasorelaxamento das artérias, funções antioxidantes e ainda na produção de NO, a suplementação de H₂S demonstra-se uma possível abordagem interessante para contornar os problemas relacionadas à disfunção endotelial.

É crescente o número de trabalhos na literatura investigando a sinalização endógena do H₂S no sistema cardiovascular (ZHANG et al., 2018). Dentre os primeiros efeitos descritos, destaca-se o relaxamento de artérias *in vitro* (ZHAO, 2001). A partir da descrição de efeitos antioxidantes (KIMURA; KIMURA, 2004), e protetores ao estresse oxidativo (ESECHIE et al., 2008; HADADHA; VAKILI; BANDEGI, 2015; KING et al., 2014) ou ainda, facilitadores da produção de ATP

(BOUILLAUD; BLACHIER, 2011; FU et al., 2012), cada vez mais reúne-se indícios dos efeitos protetores do H₂S no sistema cardiovascular (MARTELLI et al., 2012).

Neste contexto, uma das novas vertentes no estudo das doenças cardiovasculares é o papel do H₂S como marcador cardiovascular (POLHEMUS et al., 2014). As doenças cardiovasculares são caracterizadas pela menor capacidade de produção de H₂S pelos componentes do sistema cardiovascular, em especial as células endoteliais na condição fisiopatológica da aterosclerose, agravando a formação da placa aterosclerótica (WANG et al., 2009). Além disso, destaca-se a importância fisiológica do H₂S para o controle da pressão arterial. O bloqueio gênico da enzima CSE foi responsável pelo desenvolvimento da hipertensão em camundongos (YANG et al., 2008). Assim, embora ainda muito discutida pela literatura, é crescente o número de evidências para uma correlação inversa entre as concentrações de H₂S no plasma e danos à diversas funções cardiovasculares, como o controle do tônus vascular (PAN et al., 2017).

Ao reunir os resultados de estudos mais recentes os quais demonstraram a capacidade citoprotetoras de moléculas doadoras mitocondriais de H₂S, como o AP39 em células endoteliais (GERÓ et al., 2016; LATORRE et al., 2018; SZCZESNY et al., 2014), além de efeitos cardioprotetores em modelo *in vivo* de isquemia-reperfusão (CHATZIANASTASIOU et al., 2016; KARWI et al., 2017), ou ainda, de seu efeito vasodilatador *in vivo* (TOMASOVA et al., 2015), constituem-se evidências para prospectar o AP39 como agente em novas estratégias terapêuticas no tratamento de doenças cardiovasculares. Assim, a principal contribuição do presente estudo é a descrição do mecanismo de vasorelaxamento do AP39 em artérias mesentéricas *in vitro*.

As mitocôndrias possuem importante contribuição para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs; BROWN; BORUTAITE, 2012). A produção destas está aumentada na maioria das doenças cardiovasculares (SUGAMURA; KEANEY, 2011). Considerando os efeitos protetores do H₂S, a disponibilização do H₂S em ambiente mitocondrial é uma abordagem válida no combate ao estresse oxidativo. Compostos doadores mitocondriais de H₂S direcionam-no ao ambiente mitocondrial, onde é capaz de suplementar a produção de ATP

principalmente sob hipóxia, a partir da oxidação do H₂S pela enzima sulfeto quinona oxidoreductase, consequentemente reduzindo a quinona Q da cadeia respiratória (SZABO et al., 2014). Além disso, o H₂S disponibilizado em ambiente mitocondrial foi capaz de compensar os efeitos do estresse oxidativo (GUO et al., 2012). Estudos anteriores demonstraram a capacidade do AP39 em compensar efeitos deletérios oriundos do estresse oxidativo em células endoteliais (GERŐ et al., 2016; LATORRE et al., 2018; SZCZESNY et al., 2014).

5.1 Os achados do presente estudo

A caracterização da expressão proteica e gênica, a partir das análises de *Western-blot* e PCR, respectivamente, das enzimas produtoras de H₂S em artérias mesentéricas de primeira ordem de camundongos C57BL/6 utilizados no presente estudo. A partir da análise qualitativa foi possível identificar a expressão proteica de todas as enzimas (CSE, CBS e 3MPST; Figura 5A), porém, somente de CSE na análise da expressão gênica (Figura 5B). Estes resultados corroboram com os dados disponíveis na literatura (MANI et al., 2013; PAN et al., 2011). A enzima CSE é a principal enzima atuante no sistema cardiovascular (YANG et al., 2008) e sua atividade também é ligada a ação de outras moléculas vasoativas, como a acetilcolina. CSE é encontrada tanto em células endoteliais quanto nas células do músculo liso vascular (MUSTAFA et al., 2011).

Ainda, foi detectada a presença da enzima CBS nos homogenatos de artérias mesentéricas. A literatura não possui um consenso acerca de sua expressão em tecidos vasculares, embora existam evidências de sua expressão em células endoteliais em cultura (SAHA et al., 2016). Alguns trabalhos também relatam a presença da enzima 3MPST (SHIBUYA et al., 2009b) em células endoteliais, sobretudo no interior mitocondrial (KABIL et al., 2011). Considerando a natureza do AP39 como doador mitocondrial de H₂S, o estudo de possíveis interações entre o composto e a enzima poderiam ser conduzidos futuramente.

A produção de H₂S de homogenatos de artérias mesentéricas foi avaliada com dois objetivos: o primeiro objetivo foi comparar a produção dos homogenatos de artérias mesentéricas com a produção de homogenatos de

outros órgãos do sistema cardiovascular (artéria aorta torácica e coração; Figura 5C). Não foi observada qualquer diferença estatística quanto a capacidade de produção de H₂S nos órgãos avaliados. É importante notar que o H₂S assume atividades distintas de maneira órgão-dependente. Nos vasos de resistência, sua atividade é relacionada ao controle do tônus vascular (YANG et al., 2008), ao passo que no coração é relacionada a inibição de canais de cálcio tipo L (SUN et al., 2008) e seu importante papel protetor aos danos associados a isquemia e reperfusão (BIAN, 2005). Desta maneira, uma correlação direta entre produção e efeito não pode ser validada inclusive por conta de diferenças na expressão e atividade destas enzimas (KUO et al., 2016), além da diferença da concentração relativa de H₂S em cada órgão em questão (PAN et al., 2011).

A segunda finalidade da avaliação da produção de H₂S foi descrever quais enzimas são responsáveis pela produção de H₂S das artérias mesentéricas. O inibidor AOAA foi capaz de inibir totalmente a produção de H₂S, ao passo que o inibidor PAG reduziu parcialmente a produção (Figura 5D). A partir dos resultados do presente estudo, podemos concluir que cerca de metade da produção do H₂S nas artérias mesentéricas se deve a atividade de CSE. Mesmo que a literatura discuta a seletividade do inibidor AOAA (ASIMAKOPOULOU et al., 2013), o resultado obtido com a inibição pelo PAG corrobora com o descrito pela literatura (CIRINO; VELLECCO; BUCCI, 2017; KANAGY; SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017), ao passo que a outra parcela ficou dividida entre as atividades de CBS e 3MPST. No presente momento, nenhuma molécula apresenta seletividade suficiente para diferenciar a atividade de CBS ou 3MPST, assim, outros experimentos poderiam ser desempenhados para a diferenciação da atividade destas enzimas.

Além disso, notou-se a capacidade do NO (oriundo do nitroprussiato de sódio 10 µM) em inibir a síntese de H₂S (Figura 5D). Desta maneira, este resultado corrobora com a hipótese já abordada na literatura quanto a relação da intercomunicação entre as vias de sinalização de ambos ao controle fino da produção de cada sinalizador (PAN et al., 2017). O mecanismo sugerido para a interação na produção dos gasotransmissores baseia-se na relação entre o NO como um interruptor para a produção de H₂S e o H₂S um gatilho para a produção de NO a partir da interação direta entre o H₂S e eNOS (ALTAANY et al., 2014;

MAZZA et al., 2013), da atividade de proteínas kinases (BIBLI et al., 2017) ou ainda, da atividade do microRNA 455 (LI et al., 2017), embora existam estudos que possam contrariar esta hipótese (KLOESCH et al., 2016; KUBO et al., 2007).

Zhao, 2001, utilizando-se de homogenatos de artéria aorta de ratos, verificou a inibição da produção de H₂S pelo NO de maneira concentração-dependente, além disso o resultado obtido pelo presente estudo corrobora com os resultados de outros estudos (MENG et al., 2018). Além disso, Altaany e colaboradores, 2014 demonstraram que H₂S e o NO competem (a partir das interações S-sulfidração e S-nitrosilação) pelos resíduos de cisteína de eNOS para regular sua fosforilação e consequente atividade. Esta competição é útil no ajuste fino da produção do NO para o controle do tônus vascular, por exemplo. No entanto, um estudo mais aprofundado desta relação e seus efeitos práticos sobre o controle atividade da atividade vasomotora ainda é necessário, dado que as concentrações de H₂S e NO utilizadas pelos trabalhos até então são muito superiores às concentrações consideradas fisiológicas ativas no relaxamento do músculo liso vascular (NAGY et al., 2014).

Para caracterizar a resposta *in vitro* das artérias mesentéricas de primeira ordem de camundongos C57BL/6 em miógrafo de arame, primeiramente foram avaliados os efeitos de vasoconstritores como o KCl e fenilefrina na presença ou não do endotélio (Figura 6A e 6B). A preparação do presente estudo não mostrou alterações na resposta quanto à eficácia ou potência destes vasoconstritores, resultado que pode ser observado em outros estudos os quais utilizaram artérias mesentéricas (DORA et al., 2000; WHITE; RIVERA; DAVISON, 1996), entretanto, estas respostas não se conservam em preparações com artéria aorta (AUER; WARD, 1998; ROSSONI et al., 2002). Desta maneira, para as respostas a fenilefrina, o endotélio assume importância dependente do vaso estudado.

Entretanto, o papel do endotélio mostrou-se essencial para o vasorelaxamento promovido pela acetilcolina (Figura 6C). Os resultados obtidos permitem afirmar que a retirada mecânica do endotélio foi capaz de proporcionar um modelo experimental com a ausência do papel do endotélio. Já é bem documentado na literatura o papel essencial do endotélio no vasorelaxamento induzido pela acetilcolina (FUJIWARA et al., 2012; FURCHGOTT; ZAWADZKI,

1980). No presente estudo, a remoção mecânica do endotélio a partir da leve fricção do próprio fio de montagem na parede interior dos anéis de artéria reduziu significativamente a resposta à ACh, embora ainda seja possível identificar uma resposta residual (Figura 6C). Para esta resposta, assume-se que células endoteliais remanescentes ou ainda, que a fricção tenha causado disfunção destas células, com pequena atividade residual. De toda maneira, assume-se que os resultados obtidos simulem a condição de ausência do endotélio e fornecem evidências suficientes para a comprovação do papel do endotélio nas respostas aos diferentes agentes vasoativos utilizados.

Um resultado semelhante foi obtido pela inibição concomitante da produção de NO endógeno, inibição das COX e ainda dos canais de K⁺. A inibição conjunta reduziu os efeitos da acetilcolina (Figura 6C). A literatura traz resultados semelhantes quanto a inibição das NOS (BENNETT; WATT; THURSTON, 1992) e canais de K⁺ (FUJII et al., 1992; FUJIWARA et al., 2012), entretanto, a literatura não demonstra resultados conclusivos quanto a inibição das COX, com trabalhos mostrando seu papel (BENNETT; WATT; THURSTON, 1992) ou não (FUJII et al., 1992) nos efeitos da acetilcolina em artérias mesentéricas. O vasorelaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS), por sua vez, não demonstrou dependência do endotélio (Figura 6D), corroborando desta maneira com dados prévios disponíveis na literatura (TINKER; MICHENFELDER, 1976).

A inibição da produção endógena de H₂S a partir do ácido aminoxoacético (AOAA) reduziu parcialmente a resposta a acetilcolina (Figura 6E), mas não do NPS (Figura 6F). Pode-se notar desta maneira que a sinalização endógena do H₂S participa do mecanismo de vasorelaxamento da acetilcolina. A sinalização de acetilcolina induz a produção de H₂S em células endoteliais (MENDIOLA et al., 2017). Outros estudos anteriores também demonstraram a dependência da sinalização do H₂S endógeno para o vasorelaxamento induzido por acetilcolina (COLETTA et al., 2012; YANG et al., 2008), inclusive em preparações de corpo cavernoso (AYDINOGLU et al., 2017), artéria cerebral (HAN; CHEN; HE, 2013) e artéria mesentérica de camundongo (MUSTAFA et al., 2011).

Ainda, reunindo os dados obtidos da literatura e os resultados dos ensaios de geração de H₂S, nota-se que este, além de diretamente induzir o vasorelaxamento, também poderia orquestrar a produção de NO, evidenciando-se assim novamente o mecanismo de intercomunicação entre as duas vias de sinalização da acetilcolina.

A molécula do AP39 é composta por uma porção direcionadora ao ambiente mitocondrial (trifenilfosfônio, TPP+) e uma porção doadora de H₂S (ADT-OH) unidas por um conector alifático (Figura 3). Embora o AP39 seja direcionado ao ambiente mitocondrial, não se descarta a possibilidade de uma parcela localizar-se no citosol. A taxa de acúmulo deste é estimada entre 5 a 10 vezes maior no interior celular em relação ao meio extracelular e entre 100 a 500 vezes maior no ambiente mitocondrial em relação ao citosol (SMITH; HARTLEY; MURPHY, 2011). Estudos anteriores mostraram a localização do H₂S em células endoteliais, demonstrando assim que a maior parcela do H₂S é direcionada ao interior mitocondrial e apenas uma parcela residual seria responsável por possíveis sinalizações no citosol (SZCZESNY et al., 2014). Desta forma, possíveis interações entre o AP39 e demais componentes do citosol representariam apenas uma pequena parte de seu efeito.

Os estudos comparando os efeitos do AP39 e as moléculas componentes deste em separado (ADT-OH e TPP+) não demonstraram qualquer efeito destas molécula sobre a recuperação de área de infarto do miocárdio (KARWI et al., 2017). Entretanto, o TPP+, mas não ADT-OH, foi capaz de aumentar significativamente a pressão arterial de ratos anestesiados (TOMASOVA et al., 2015). Alguns trabalhos trazem ainda os efeitos derivados do ADT-OH não necessariamente associados somente ao H₂S. A classe do composto ADT-OH, ditionia, é conhecida pela capacidade de ativar vias associadas ao mecanismo do fator de transcrição NRF-2, aumentando a atividade intracelular de enzimas antioxidantes, como as glutatonas, catalase e outras associadas ao equilíbrio redox intracelular (KWAK et al., 2003; MUNDAY, 2004; MUNDAY et al., 2006).

A utilização do TPP+ está ligada a diferentes estratégias para o direcionamento de moléculas ao interior mitocondrial, como antioxidantes (SMITH et al., 1999; ZIELONKA et al., 2017) amenizando os danos associados

ao estresse oxidativo em modelo de sepse (LOWES et al., 2008) ou doadores de NO (PRIME et al., 2009) com efeitos importantes sobre a recuperação dos danos associados a isquemia/reperfusão do miocárdio (METHNER et al., 2014).

Entretanto, o TPP+ reduz o potencial da membrana mitocondrial e a atividade da cadeia respiratória, efeitos ligados a sua propriedade hidrofóbica. Porém, com a utilização de conectores alifáticos, ou então, de compostos que diminuam sua propriedade hidrofóbica, este efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial é diminuído (TRNKA; ELKALAF; ANDĚL, 2015). Desta maneira, além dos componentes funcionais do AP39, a cadeia alifática conectora detém o papel de reduzir os efeitos deletérios ao metabolismo mitocondrial oriundos do TPP+.

Em vista dos possíveis efeitos do AP39 sobre o metabolismo mitocondrial, assim como os efeitos do H₂S sobre o tônus vascular, um dos primeiros pontos avaliados no presente trabalho foi o efeito dos doadores de H₂S testados sobre o tônus basal de artérias mesentéricas *in vitro*. Dentre todos os doadores testados, a única diferença significativa observada foi o efeito do AP39 sobre artérias mesentéricas com o endotélio removido, aumentando da tensão basal em relação a resposta na presença do endotélio (Figura 7). Este achado indica possíveis efeitos diretos sobre o músculo liso vascular da preparação.

A literatura mostra efeitos diferentes, de acordo com o vaso estudado, para o H₂S na tensão basal de artérias. O doador Na₂S não afetou a tensão basal de artérias umbilicais, ao passo que induziu contração concentração-dependente em veias umbilicais (MOHAMMED et al., 2017). A administração em *bolus* de NaHS (56 µmol/kg/dia; i.p) não afetou a pressão arterial de ratos saudáveis, entretanto, diminuiu de maneira substancial a pressão arterial de ratos hipertensos, em modelo de clip de artéria renal (XIAO et al., 2016). Não foi observada qualquer alteração no tônus basal por parte do ADT-OH, independente da presença do endotélio (Figura 7). Este resultado corrobora com os achados *in vivo*, uma vez que o ADT-OH também não promoveu qualquer alteração na pressão arterial de ratos anestesiados (TOMASOVA et al., 2015).

Conclui-se que as alterações no tônus basal de anéis de artéria mesentérica com o endotélio removido não foram oriundas dos efeitos do H₂S,

mas possivelmente devido à localização do H₂S em ambiente mitocondrial, ou então, ao próprio efeito do TPP+ em células musculares lisas. No entanto, para a elucidação destas hipóteses, seriam necessários outros experimentos avaliando a atividade específica dos composto TPP+ ou possíveis sinalizações oriundas do metabolismo mitocondrial no citosol, em especial nas células musculares lisas (CHANDEL, 2014).

Todos os doadores de H₂S testados induziram vasorelaxamento das artérias mesentéricas pré-contraídas com fenilefrina (Figura 8). Este achado corrobora com a literatura do AP39 e ADT-OH (TOMASOVA et al., 2015), dado os efeitos observados *in vivo*. Especificamente, o efeito do ADT-OH foi significativamente menor (Figura 8B), embora a atividade do endotélio se mostre necessária para os efeitos de ambos os doadores. No caso dos resultados obtidos com o NaHS (Figura 8C) corroboram o já bem documentado papel do endotélio (BUCCI et al., 2010; CHENG et al., 2004; COLETTA et al., 2012; MUSTAFA et al., 2011; ZHAO, 2001).

Nota-se que a diferença entre a magnitude dos efeitos do ADT-OH e AP39 (Figura 8D) permite concluir que há possíveis mecanismos relacionados à sinalização mitocondrial os quais induzem o vasorelaxamento. Compostos capazes de despolarizar a membrana mitocondrial, como o diazóxido, ou então, ativadores dos canais de K_{ATP} mitocondriais, como o composto BMS-191095, induzem o vasorelaxamento de artérias cerebrais a partir da via PI3K-Akt-NO (KATAKAM et al., 2013). Desta maneira, não se descarta a ideia de que os efeitos do AP39 poderiam ser oriundos de sinalizações mitocondriais, visto que outros efeitos do AP39 também estão associados à interações com canais iônicos mitocondriais, como os efeitos cardioprotetores relacionados ao aumento da capacidade de retenção mitocondrial de cálcio (CHATZIANASTASIOU et al., 2016), além da capacidade do AP39 em interagir com canais iônicos, inibindo canais de Ca_v3, receptor de rianodina-2 e canal de cloreto (TOMASOVA et al., 2015). Entretanto, um estudo específico a respeito deste eixo ainda é necessário para a identificação de sua relevância fisiológica.

Não foi observada qualquer alteração sobre o vasorelaxamento do AP39 e NaHS após o bloqueio farmacológico das COX com indometacina (Figura 9A

e 9B). A literatura atual não apresenta qualquer associação direta entre o H₂S e efeitos cardiovasculares derivados de produtos da COX, embora conheça-se alguns prostanóides capazes de induzir o vasorelaxamento, como a prostaciclina (PGI₂), inclusive participando do controle do tônus vascular (STITHAM et al., 2011). Atualmente, a independência da sinalização de COX para os efeitos do AP39 é interpretada como um fator positivo, dada a redução de possíveis interações com vias intracelulares e efeitos indesejados.

O papel da sinalização da via do NO nos efeitos do H₂S é alvo de debate na literatura atual (CIRINO; VELLECCO; BUCCI, 2017; DONGÓ et al., 2018; KING et al., 2014; KOLLURU; SHEN; KEVIL, 2013). É importante notar que o próprio NO é capaz de ativar canais de K⁺ (SASAKI et al., 2000) e esta relação não pode ser descartada no mecanismo de ação de doadores de H₂S. No presente estudo, o vasorelaxamento do AP39 e do NaHS demonstraram-se dependentes da sinalização do NO (Figura 9C e 9D). Para outros efeitos, no entanto, esta dependência não é observada no caso dos efeitos em modelos de isquemia-reperfusão do miocárdio (CHATZIANASTASIOU et al., 2016; KARWI et al., 2017). Ainda, *in vivo*, o AP39 foi capaz de diminuir a pressão arterial média de ratos anestesiados mesmo após a prévia infusão de L-NAME (TOMASOVA et al., 2015).

Estes dados reunidos demonstram que embora o mecanismo de ação do AP39 seja dependente da sinalização do NO, este ainda é capaz de reduzir a pressão arterial *in vivo*, mesmo sob baixa disponibilidade de NO, como observado na disfunção endotelial (FÖRSTERMANN, 2010; NASEEM, 2007), o que reforça o papel de outras vias de sinalização além do NO. AP39 e NaHS demonstraram vasorelaxamento significativamente reduzido após a incubação das artérias em L-NAME (inibidor não seletivo das NOS) e ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel), o que demonstra que seus mecanismos sejam dependentes da sinalização de NO e GMPc (Figura 9C e 9D). Este mecanismo já foi descrito para o NaHS anteriormente (MATERAZZI et al., 2017; ZHAO; WANG, 2003), embora nem sempre se preserve *in vivo* (YOO et al., 2015).

Ainda, ao passo que o vasorelaxamento do AP39 foi afetado de maneira semelhante após a inibição com L-NAME ou ODQ, mesmo que não

estatisticamente significativo, o vasorelaxamento do NaHS foi mais afetado pelo ODQ do que pelo L-NAME. Esta diferença representa diferenças no mecanismo de ação de ambos os doadores. Desta maneira, propõe-se que mecanismo de ação do AP39 dependa da produção endotelial de NO, ao passo que o NaHS pode induzir o vasorelaxamento também a partir de outras vias diretamente no músculo liso, como a inibição da fosfodiesterase 5 (BUCCI et al., 2010).

O vasorelaxamento induzido pelo AP39 ou pelo NaHS não demonstrou diferenças estatisticamente significativas após o bloqueio das fosfodiesterase 5 a partir da incubação com sildenafil. Esta relação representaria uma potencial segurança no uso concomitante a outros fármacos também utilizados em disfunções associadas.

A potência do AP39 foi reduzida após a inibição da produção endógena de H₂S (Figura 9E). Entretanto, embora exista uma tendência visual ($P < 0,058$), o bloqueio da produção endógena de H₂S não alterou o vasorelaxamento ao NaHS (Figura 9F). Estes resultados sugerem que o vasorelaxamento do AP39, mas não do NaHS, dependa da sinalização endógena de H₂S. Como sugerido anteriormente pelos achados do presente trabalho, a menor produção de H₂S pode afetar a produção de NO. Dada a dependência do mecanismo de sinalização NO-GCs-GMPc, a menor concentração citosólica de H₂S diminuiria a produção de NO e conseqüentemente os efeitos do AP39. O AP39 localiza o H₂S em ambiente mitocondrial, diferente do observado com o NaHS, um doador espontâneo que não localiza o H₂S em ambientes celulares específicos, assim, repondo as concentrações citosólicas de H₂S.

A S-sulfidração é uma interação molecular entre o H₂S e resíduos livres de cisteína, sendo responsável pela ativação de diferentes proteínas (LU et al., 2013; ZHANG et al., 2017), dentre estas os canais de K⁺ (MENG et al., 2018; WALEWSKA; SZEWCZYK; KOPROWSKI, 2018), sendo inclusive o principal mecanismo de ação proposto ao H₂S para ativação dos canais K_{ATP} (MUSTAFA et al., 2011). Estudos recentes mostraram a ativação de eNOS por parte do H₂S, aumentando a produção de NO. ALTAANY e colaboradores., 2014, demonstraram que o H₂S aumenta a atividade de eNOS a partir de S-sulfidração, favorecendo sua fosforilação e dimerização. Além disso, a S-sulfidração

desfavorece a S-nitrosilação. A atividade de eNOS é reduzida quando S-nitrosilada, assim, observou-se um mecanismo de retroalimentação negativa por parte do NO sobre eNOS, o qual pode ser modulado pelo H₂S. Desta forma, H₂S e NO atuam diretamente sobre eNOS para regular a produção de NO.

Senão o mais importante, a ativação de canais de potássio é um dos mecanismos de ação mais associados aos efeitos do H₂S (HEDEGAARD et al., 2015). Especificamente a ativação dos canais K_{ATP} é o mecanismo mais relevante no sistema cardiovascular, sendo associado aos diferentes doadores já utilizados (ZHAO, 2001). Na preparação, a inibição com o inibidor não seletivo dos canais de K⁺, cloreto de tetraetilamônio (3 mM, TEA), reduziu os vasorelaxamentos induzidos tanto pelo AP39 e NaHS (Figuras 10A e 10B). No caso do NaHS, este efeito já foi descrito na literatura (HEDEGAARD et al., 2015).

A redução do vasorelaxamento induzido pelo NaHS a partir do bloqueio específico dos canais K_{ATP} a partir da incubação das artérias em glibenclamida (10 µM) no presente estudo e demais trabalhos da literatura (Figura 10B; BUCCI et al., 2012; CHENG et al., 2004; ZHAO, 2001) também embasam esta afirmação. A inibição dos canais K_{ATP} não reduziu o vasorelaxamento induzido pelo AP39 (Figura 10B). O emprego da glibenclamida é associado a inibição do canais K_{ATP} presentes na membrana plasmática das células componentes das artérias, entretanto, conhece-se a existência de canais K_{ATP} na membrana mitocondrial (LACZA et al., 2003). A especificidade da glibenclamida é muito semelhante tanto para os canais K_{ATP} da membrana plasmática quanto para os canais K_{ATP} mitocondriais (ARDEHALI; O'ROURKE, 2005). Desta forma, o principal mecanismo associado aos efeitos do H₂S estaria descartado dos mecanismos possíveis associados aos efeitos vasculares observados no presente estudo.

Considerando a capacidade de localização do H₂S no interior mitocondrial pelo AP39 e considerando por exemplo, os mecanismos de cardioproteção envolvidos com o canal K_{ATP} mitocondrial (ARDEHALI, 2004), um estudo mais aprofundado a respeito dos efeitos diretos do H₂S nos canais da membrana mitocondrial seria interessante para a elucidação de possíveis consequências fisiológicas destas interações para o relaxamento do músculo liso vascular. O

composto ácido 5-hidroxideconóico é conhecido pela sua maior afinidade aos canais K_{ATP} mitocondriais, ao passo que a glibenclamida é capaz de inibir tanto os K_{ATP} mitocondriais como de membrana plasmática (PATEL et al., 2005), porém, dadas as limitações metodológicas, aferir especificamente a atividade do AP39 sobre os canais K_{ATP} mitocondriais poderia ser mais útil em preparações com mitocôndrias isoladas ou cultura de células.

Atuando especificamente sobre os canais K_{Ca} , localizados principalmente nas células endoteliais, a apamina foi capaz de reduzir significativamente o vasorelaxamento do AP39 e NaHS (Figuras 10A e 10B). A relação deste canal com os efeitos de vasorelaxamento promovido pelo NaHS já foi descrita na literatura (JACKSON-WEAVER et al., 2013). O envolvimento deste canal na sinalização do AP39, no entanto, sugere possíveis interações entre o AP39 e estes canais, assim como a possível interação de vias intracelulares, com a do óxido nítrico, com estes (ARCHER et al., 1994; KHAN; MATHEWS; MEISHERI, 1993).

A inibição das NOS e COX a partir do L-NAME e indometacina, respectivamente, reduziu consideravelmente os efeitos da ACh na preparação do presente estudo (Figura 6E). O NO possui grande importância no mecanismo de ação da acetilcolina, o qual também envolve canais de potássio (BENNETT; WATT; THURSTON, 1992; DING; KUBES; TRIGGLE, 2000).

Os resultados do presente estudo demonstraram o papel dos canais de K^+ e da sinalização do NO no mecanismo de ação do vasorelaxamento induzido pelos doadores NaHS e AP39. Baseando-se na possível interação entre a via de sinalização do NO, das COX e dos canais de K^+ , como já mostrado em outros estudos presentes na literatura (MUSTAFA et al., 2011) para o efeito da acetilcolina, desenvolveu-se experimentos com a inibição o concomitante de COX, NOS e canais de K^+ para avaliar o papel desta interação nos efeitos dos doadores de H_2S .

Desta forma, a inibição conjunta destas vias inibiu em magnitude semelhante observada nos grupos L-NAME e ODQ em ambos os casos de AP39 e NaHS (Figuras 10C e 10D). Assim, podemos assumir que possíveis interações entre a via do NO e dos canais de K^+ possam existir. Este processo também

contribui para a liberação do NO associado ao controle do tônus vascular (CALLIES et al., 2011), porém a atividade desta interação não parece ser determinante para os efeitos de ambos os doadores testados.

5.2 O mecanismo proposto

A partir dos objetivos propostos e resultados obtidos pelo presente estudo, ao propor um mecanismo de ação para o AP39 na presente preparação, os efeitos do AP39 demonstraram ser dependentes da atividade da sinalização do NO, da formação de GMPc, assim como da ativação de canais de K^+ , porém, independente dos canais K_{ATP} da membrana celular (Figura 11).

Além disto, os efeitos mitocondriais do AP39 não podem ser descartados como gatilhos celulares para respostas vasomotoras. Ainda não foi comprovado o efeito do H_2S sobre os canais K_{ATP} mitocondriais especificamente, porém, a utilização do doador de H_2S , 4-carboxifenil isotiocianato, em mitocôndrias isoladas de coração de ratos, promoveu a despolarização da membrana mitocondrial, efeito o qual foi inibido pela exposição ao ATP (SIVARAJAH et al., 2009). A capacidade de ativação do canal BK_{Ca} mitocondrial pelo H_2S , no entanto, é ainda desconhecida (WALEWSKA; SZEWCZYK; KOPROWSKI, 2018). Desta maneira, são necessários outros experimentos para validar a capacidade, assim como o mecanismo de ação do H_2S , de alteração do potencial de membrana mitocondrial no contexto das artérias mesentéricas.

A sinalização endógena do H_2S também está envolvida na regulação da produção de NO pelas NOS, participando de alguma maneira ainda não elucidada dos mecanismos de ação do AP39. Não se descarta uma possível sinalização direta do AP39 nos canais de K^+ , bem como entre a sinalização do NO em canais de K^+ , como o K_{Ca} , das células endoteliais. Ainda, também não se desconsidera o efeito direto do AP39 sobre as células musculares lisas. Sua atividade sobre canais de K^+ presentes nestas poderiam fundamentar os resultados obtidos nos grupos com o endotélio mecanicamente removido. Para a validação destas hipóteses, no entanto, são necessários outros experimentos acerca dos efeitos desta interação.

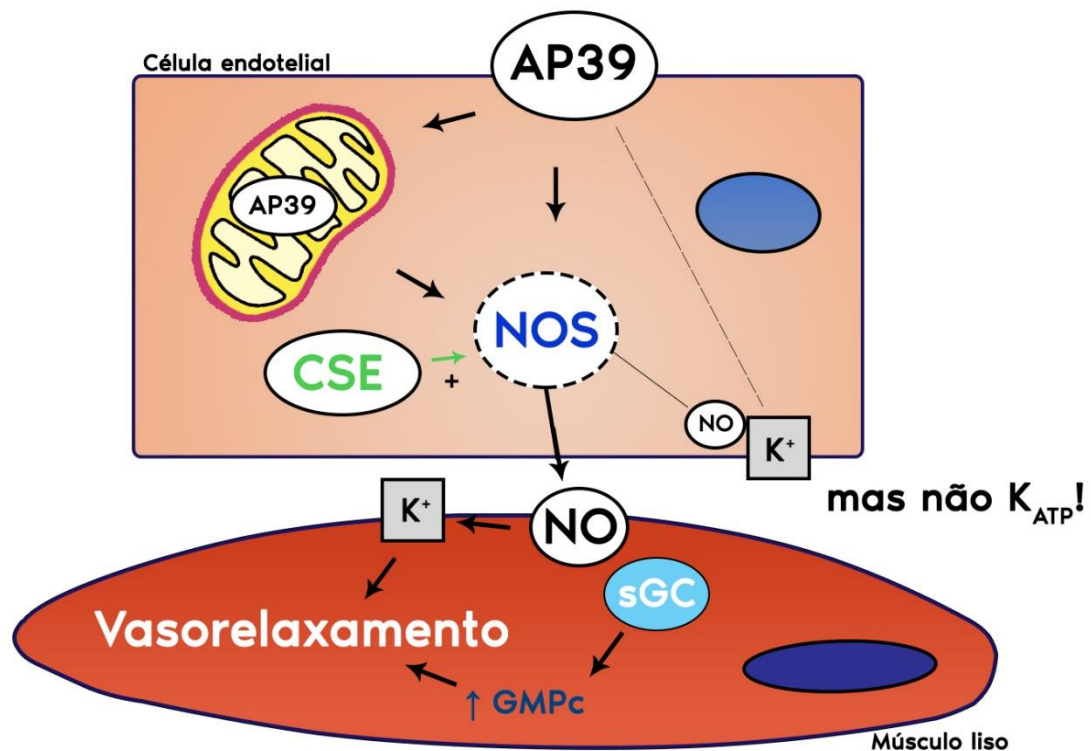


Figura 11 – Mecanismo de ação proposto ao vasorelaxamento induzido pelo AP39. A atividade do AP39 estaria baseada no H₂S liberado da molécula, assim como da participação de vias endógenas. Os efeitos bioenergéticos poderia atuar em conjunto. O H₂S oriundo do AP39 induziria a abertura de canais de K⁺ da célula endotelial, além de induzindo uma despolarização mitocondrial. Assim, um eixo de comunicação intracelular entre a mitocôndria e eNOS estaria ativado. Com a participação das NOS, assim como a modulação da atividade do H₂S endógeno sobre a atividade destas, o NO produzido atua tanto diretamente sobre o músculo liso, quanto na abertura de canais de K⁺ da célula endotelial. O principal mecanismo de ação relacionado ao H₂S anteriormente, a abertura dos canais K_{ATP}, no entanto, não está envolvido no mecanismo de ação do AP39. Dentre os canais possivelmente envolvidos, K_{Ca}, expresso em células endoteliais, evidencia o importante papel das células endoteliais para o vasorelaxamento induzido pelo AP39. Este mecanismo representa um grande destaque em relação às demais classes de compostos doadores de H₂S até então testados. Fonte: compilação do autor.

O presente estudo se comprometeu em descrever os efeitos do doador mitocondrial de H₂S AP39, de sua porção doadora componente do AP39, ADT-OH, e compará-los aos efeitos do doador espontâneo NaHS de acordo com diferenças no mecanismo de disponibilização intracelular do H₂S. Além disso, o presente estudo comprometeu-se em buscar possíveis mecanismos de ação dos efeitos do AP39 e compará-los aos do NaHS.

Desta maneira, o presente estudo buscou elucidar o funcionamento do AP39 especificamente sobre artérias mesentéricas, na tentativa de validá-lo como possível componente de uma nova estratégia na terapêutica de doenças

cardiovasculares com componente hipertensivo expressivo, dada a importância de leitos de resistência, como o leito mesentérico, para o controle da pressão arterial. Mesmo que as vias intracelulares não tenham sido completamente descritas, os resultados do presente estudo indicam o AP39 capaz de induzir o vasorelaxamento principalmente a partir da via do NO e ativação de canais de K^+ . A independência do principal mecanismo de ação associado ao H_2S inclusive no sistema cardiovascular, a ativação dos canais K_{ATP} , foi observada e indica a principal singularidade dos mecanismos de ação do AP39.

Estes achados permitem a futuros estudos investigarem como os efeitos antioxidantes e efeitos no metabolismo mitocondrial induzidos pelo AP39 se relacionam aos efeitos vasculares. A associação de ambos os efeitos sugere grande importância terapêutica: os efeitos mostrados pelo AP39 seriam úteis assim para o combate a disfunção endotelial, induzida pelo aumento do estresse oxidativo, a qual resulta em um desequilíbrio no controle da pressão arterial e assim, predispõe o organismo à complicações vasculares, como a aterosclerose. Desta maneira, os resultados de estudos prévios em cultura de células (GERÓ et al., 2016; SZCZESNY et al., 2014) e *in vivo* (CHATZIANASTASIOU et al., 2016; TOMASOVA et al., 2015) associados aos resultados obtidos pelo presente estudo demonstram o grande potencial do AP39 na terapêutica cardiovascular.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou os efeitos e os primeiros mecanismos de ação propostos ao doador mitocondrial de H_2S , AP39, para o vasorelaxamento de artérias mesentéricas *in vitro*. As concentrações de H_2S liberadas pelo AP39 não desencadeiam qualquer efeito deletério sobre o tônus basal de artérias mesentéricas. Além disso, o vasorelaxamento promovido pelo AP39 possui mecanismos em comum com o NaHS, entretanto, também mostra suas singularidades. Embora alguns dados ainda sejam necessários para a definição da melhor aplicação terapêutica do AP39, os dados reunidos até então apontam para um panorama favorável para a sua utilização do AP39 na terapêutica cardiovascular.

REFERÊNCIAS

ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 1066–1071, 1 fev. 1996.

AHMAD, A. et al. AP39, A Mitochondrially Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Exerts Protective Effects in Renal Epithelial Cells Subjected to Oxidative Stress in Vitro and in Acute Renal Injury in Vivo. **SHOCK**, v. 45, n. 1, p. 88–97, jan. 2016.

AHMAD, F. UD D. et al. Exogenous Hydrogen Sulfide (H₂S) Reduces Blood Pressure and Prevents the Progression of Diabetic Nephropathy in Spontaneously Hypertensive Rats. **Renal Failure**, v. 34, n. 2, p. 203–210, 9 mar. 2012.

ALTAANY, Z. et al. The coordination of S-sulfhydration, S-nitrosylation, and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide. **Science Signaling**, v. 7, n. 342, p. 1–10, 2014.

ALTAANY, Z.; YANG, G.; WANG, R. Crosstalk between hydrogen sulfide and nitric oxide in endothelial cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 879–888, 2013.

ARCHER, S. L. et al. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7583–7587, 2 ago. 1994.

ARDEHALI, H. Role of the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels in cardioprotection. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 2, p. 379–390, 2004.

ARDEHALI, H.; O'ROURKE, B. Mitochondrial K_{ATP} channels in cell survival and death. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 39, n. 1, p. 7–16, jul. 2005.

ASIMAKOPOULOU, A. et al. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 4, p. 922–932, 2013.

AUER, G.; WARD, M. E. Impaired reactivity of rat aorta to phenylephrine and KCl after prolonged hypoxia: Role of the endothelium. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, n. 2, p. 411–417, 1998.

AYDINOGLU, F. et al. The interaction of l-cysteine/H₂S pathway and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in mouse corpus cavernosum. **Nitric Oxide**, v. 70, p. 51–58, 2017.

BEAUCHAMP, R. O. et al. A Critical Review of the Literature on Hydrogen Sulfide Toxicity. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, Advances in Cancer

Research. v. 13, n. 1, p. 25–97, 26 jan. 1984b.

BENAVIDES, G. A. et al. Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 46, p. 17977–17982, 2007.

BENNETT, M. A.; WATT, P. A. C.; THURSTON, H. Endothelium-dependent modulation of resistance vessel contraction: studies with NG-nitro-L-arginine methyl ester and NG-nitro-L-arginine. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 2, p. 616–621, out. 1992.

BIAN, J. S. Role of Hydrogen Sulfide in the Cardioprotection Caused by Ischemic Preconditioning in the Rat Heart and Cardiac Myocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 2, p. 670–678, 6 out. 2005.

BIBLI, S. I. et al. Hydrogen Sulfide Preserves Endothelial Nitric Oxide Synthase Function by Inhibiting Proline-Rich Kinase 2: Implications for Cardiomyocyte Survival and Cardioprotection. **Molecular Pharmacology**, v. 92, n. 6, p. 718–730, dez. 2017.

BIBLI, S. I. et al. Cardioprotection by H₂S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway. **Cardiovascular Research**, 2015.

BOUILLAUD, F.; BLACHIER, F. Mitochondria and Sulfide: A Very Old Story of Poisoning, Feeding, and Signaling? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 2, p. 379–391, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROWN, G. C.; BORUTAITE, V. There is no evidence that mitochondria are the main source of reactive oxygen species in mammalian cells. **Mitochondrion**, v. 12, n. 1, p. 1–4, 2012.

BUCCI, M. et al. Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Inhibitor of Phosphodiesterase Activity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 10, p. 1998–2004, 1 out. 2010.

BUCCI, M. et al. cGMP-Dependent Protein Kinase Contributes to Hydrogen Sulfide-Stimulated Vasorelaxation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e53319, 28 dez. 2012.

CALLIES, C. et al. Membrane potential depolarization decreases the stiffness of vascular endothelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 11, p. 1936–1942, 2011.

CALVERT, J. W. et al. Hydrogen Sulfide Mediates Cardioprotection Through Nrf2 Signaling. **Circulation Research**, v. 105, n. 4, p. 365–374, 14 ago. 2009.

- CANFIELD, D. E.; KRISTENSEN, E.; THAMDRUP, B. The Sulfur Cycle. **Advances in Marine Biology**, 2005.
- CHANDEL, N. S. Mitochondria as signaling organelles. **BMC Biology**, v. 12, n. 1, p. 34, 27 dez. 2014.
- CHATZIANASTASIOU, A. et al. Cardioprotection by H₂S Donors: Nitric Oxide-Dependent and -Independent Mechanisms. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 358, n. 3, p. 431–440, 2016.
- CHENG, Y. et al. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 5, p. H2316–H2323, 2004.
- CIRINO, G.; VELLECCO, V.; BUCCI, M. Nitric oxide and hydrogen sulfide: the gasotransmitter paradigm of the vascular system. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 22, p. 4021–4031, 2017.
- COLETTA, C. et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 23, p. 9161–9166, 2012.
- COLETTA, C. et al. Regulation of Vascular Tone, Angiogenesis and Cellular Bioenergetics by the 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase/H₂S Pathway: Functional Impairment by Hyperglycemia and Restoration by dl- α -Lipoic Acid. **Molecular Medicine**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 18 jan. 2015.
- DING, H.; KUBES, P.; TRIGGLE, C. Potassium- and acetylcholine-induced vasorelaxation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. **British journal of pharmacology**, v. 129, n. 6, p. 1194–1200, mar. 2000.
- DONGÓ, E. et al. The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. **Nitric Oxide**, v. 81, p. 75–87, dez. 2018.
- DORA, K. A. et al. An indirect influence of phenylephrine on the release of endothelium-derived vasodilators in rat small mesenteric artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 2, p. 381–387, jan. 2000.
- ESECHIE, A. et al. Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. **Clinical Science**, v. 115, n. 3, p. 91–97, 2008.
- FENG, S. et al. H₂S inhibits pulmonary arterial endothelial cell inflammation in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 3, p. 268–278, 12 mar. 2017.
- FIORUCCI, S. et al. Inhibition of Hydrogen Sulfide Generation Contributes to Gastric Injury Caused by Anti-Inflammatory Nonsteroidal Drugs. **Gastroenterology**, v. 129, n. 4, p. 1210–1224, out. 2005.

FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 923–939, 2010.

FU, M. et al. Hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in mitochondria and its regulatory role in energy production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 8, p. 2943–2948, 21 fev. 2012.

FUJIWARA, H. et al. Endothelium-Derived Relaxing Factor–Mediated Vasodilation in Mouse Mesenteric Vascular Beds. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 118, n. 3, p. 373–381, 2012.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 1980.

GAN, X. B. et al. Hydrogen Sulfide in Paraventricular Nucleus Enhances Sympathetic Activity and Cardiac Sympathetic Afferent Reflex in Chronic Heart Failure Rats. **PLoS ONE**, 2012.

GERÓ, D. et al. The novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide (H₂S) donors AP123 and AP39 protect against hyperglycemic injury in microvascular endothelial cells in vitro. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 186–198, 2016.

GHEIBI, S. et al. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. **Biochemical Pharmacology**, v. 149, n. 24, p. 42–59, 2018.

GOUBERN, M. et al. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 8, p. 1699–1706, jun. 2007.

GRIESHABER, M. K.; VÖLKEL, S. Animal Adaptations for Tolerance and Exploitation of Poisonous Sulfide. **Annual Review of Physiology**, v. 60, n. 1, p. 33–53, 1998.

GUO, W. et al. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

HADADHA, M.; VAKILI, A.; BANDEGI, A. R. Effect of the Inhibition of Hydrogen Sulfide Synthesis on Ischemic Injury and Oxidative Stress Biomarkers in a Transient Model of Focal Cerebral Ischemia in Rats. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 24, n. 12, p. 2676–2684, 1 dez. 2015.

HAN, J.; CHEN, Z. W.; HE, G. W. Acetylcholine- and sodium hydrosulfide-induced endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in cerebral vessels of global cerebral ischemia-reperfusion rat. **Journal of Pharmacological Sciences**, 2013.

- HEDEGAARD, E. R. et al. Involvement of Potassium Channels and Calcium-Independent Mechanisms in Hydrogen Sulfide-Induced Relaxation of Rat Mesenteric Small Arteries. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 356, n. 1, p. 53–63, 25 nov. 2015.
- HEITZER, T. et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. **Diabetologia**, 2000.
- HIGASHI, Y. et al. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. **Circulation Journal**, v. 73, n. 3, p. 411–418, 2009.
- HILDEBRANDT, T. M.; GRIESHABER, M. K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. **FEBS Journal**, v. 275, n. 13, p. 3352–3361, jul. 2008.
- HILL, B. C. et al. Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. **Biochemical Journal**, v. 224, n. 2, p. 591–600, 1984.
- HINE, C. et al. Endogenous Hydrogen Sulfide Production Is Essential for Dietary Restriction Benefits. **Cell**, v. 160, n. 1–2, p. 132–144, 2015.
- HOLWERDA, K. M.; KARUMANCHI, S. A.; LELY, A. T. Hydrogen sulfide. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 24, n. 2, p. 170–176, mar. 2015.
- HUANG, C. et al. Cardioprotective Effects of a Novel Hydrogen Sulfide Agent–Controlled Release Formulation of S-Propargyl-Cysteine on Heart Failure Rats and Molecular Mechanisms. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69205, 9 jul. 2013.
- INCALZA, M. A. et al. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, jan. 2018.
- JACKSON-WEAVER, O. et al. Hydrogen sulfide dilates rat mesenteric arteries by activating endothelial large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels and smooth muscle Ca^{2+} sparks. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, n. 11, p. H1446–H1454, 2013.
- KABIL, O. et al. The Quantitative Significance of the Transsulfuration Enzymes for H_2S Production in Murine Tissues. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 2, p. 363–372, 2011.
- KANAGY, N. L.; SZABO, C.; PAPAPETROPOULOS, A. Vascular biology of hydrogen sulfide. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 312, n. 5, p. C537–C549, 2017.
- KARBACH, S. et al. eNOS Uncoupling in Cardiovascular Diseases - the Role of Oxidative Stress and Inflammation. **Current Pharmaceutical Design**, 2014.

KARWI, Q. G. et al. AP39, a mitochondria-targeting hydrogen sulfide (H₂S) donor, protects against myocardial reperfusion injury independently of salvage kinase signalling. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 4, p. 287–301, 2017.

KATAKAM, P. V. G. et al. Depolarization of Mitochondria in Endothelial Cells Promotes Cerebral Artery Vasodilation by Activation of Nitric Oxide Synthase. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 4, p. 752–759, abr. 2013.

KATSIARI, C. G.; BOGDANOS, D. P.; SAKKAS, L. I. Inflammation and cardiovascular disease. **World Journal of Translational Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 31 jan. 2019.

KATSOUDA, A. et al. Regulation and role of endogenously produced hydrogen sulfide in angiogenesis. **Pharmacological Research**, v. 113, n. 3, p. 175–185, nov. 2016.

KHAN, S. A.; MATHEWS, W. R.; MEISHERI, K. D. Role of calcium-activated K⁺ channels in vasodilation induced by nitroglycerine, acetylcholine and nitric oxide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 267, n. 3, p. 1327–1335, 1993.

KIMURA, H. Hydrogen Sulfide and Polysulfides as Biological Mediators. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16146–16157, 2014.

KIMURA, Y. et al. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces potential redox regulators cysteine- and glutathione-persulfide (Cys-SSH and GSSH) together with signaling molecules H₂S₂, H₂S₃ and H₂S. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10459, 2017.

KIMURA, Y.; GOTO, Y.-I.; KIMURA, H. Hydrogen Sulfide Increases Glutathione Production and Suppresses Oxidative Stress in Mitochondria. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 1, p. 1–13, jan. 2010.

KIMURA, Y.; KIMURA, H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 10, p. 1165–1167, 2004.

KING, A. L. et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 8, p. 3182–3187, 2014.

KLOESCH, B. et al. Hydrogen sulfide inhibits endothelial nitric oxide formation and receptor ligand-mediated Ca²⁺ release in endothelial and smooth muscle cells. **Pharmacological Reports**, v. 68, n. 1, p. 37–43, 2016.

KNOLL, A. H. et al. Paleophysiology and end-Permian mass extinction. **Earth and Planetary Science Letters**, 2007.

KOLLURU, G. K.; SHEN, X.; KEVIL, C. G. A tale of two gases: NO and H₂S,

foes or friends for life? **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 313–318, 2013.

KONDO, K. et al. H₂S Protects Against Pressure Overload–Induced Heart Failure via Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Circulation**, v. 127, n. 10, p. 1116–1127, 2013.

KRÖLLER-SCHÖN, S. et al. Molecular Mechanisms of the Crosstalk Between Mitochondria and NADPH Oxidase Through Reactive Oxygen Species—Studies in White Blood Cells and in Animal Models. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 2, p. 247–266, 10 jan. 2014.

KUBO, S. et al. Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: Contribution to dual modulation of vascular tension. **Toxicology**, v. 232, n. 1–2, p. 138–146, 2007.

KUKSIS, M.; SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. Hydrogen Sulfide Regulates Cardiovascular Function by Influencing the Excitability of Subfornical Organ Neurons. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105772, 21 ago. 2014.

KUO, M. M. et al. MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 310, n. 1, p. H71-9, 2016.

KWAK, M.-K. et al. Modulation of Gene Expression by Cancer Chemopreventive Dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 Pathway: Identification of novel gene clusters for cell survival. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8135–8145, 7 mar. 2003.

LACZA, Z. et al. Investigation of the subunit composition and the pharmacology of the mitochondrial ATP-dependent K⁺ channel in the brain. **Brain Research**, v. 994, n. 1, p. 27–36, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680, 1970.

LAGGNER, H. et al. Hydrogen sulphide: A novel physiological inhibitor of LDL atherogenic modification by HOCl. **Free Radical Research**, v. 41, n. 7, p. 741–747, 7 jan. 2007.

LAGOUTTE, E. et al. Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1797, n. 8, p. 1500–1511, 2010.

LATINI, A. et al. Tetrahydrobiopterin improves hippocampal nitric oxide-linked long-term memory. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 125, n. 1–2, p. 104–111, 2018.

LATORRE, E. et al. Mitochondria-targeted hydrogen sulfide attenuates endothelial senescence by selective induction of splicing factors *HNRNPD* and *SRSF2*. **Ageing**, v. 10, n. 7, p. 1666–1681, 19 jul. 2018.

- LEE, S. W. et al. Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 4, p. 1142–1147, jul. 2007.
- LI, X.-H. et al. H₂S regulates endothelial nitric oxide synthase protein stability by promoting microRNA-455-3p expression. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44807, 21 abr. 2017.
- LIU, Z. et al. The hydrogen sulfide donor, GYY-4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E ^{-/-} mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 8, p. 1795–1809, 2013.
- LOWES, D. A. et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ protects against organ damage in a lipopolysaccharide–peptidoglycan model of sepsis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 11, p. 1559–1565, 2008.
- LU, C. et al. S-sulfhydration/desulfhydration and S-nitrosylation/denitrosylation: A common paradigm for gasotransmitter signaling by H₂S and NO. **Methods**, v. 62, n. 2, p. 177–181, ago. 2013.
- LUETJENS, C. M. et al. Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: Cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. **Journal of Neuroscience**, 2000.
- MANI, S. et al. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis. **Circulation**, v. 127, n. 25, p. 2523–2534, 2013.
- MARSHALL, T. et al. Provisional Advisory Levels (PALs) for hydrogen sulfide (H₂S). **Inhalation Toxicology**, v. 21, n. sup3, p. 56–72, 14 dez. 2009.
- MARTELLI, A. et al. Hydrogen Sulphide : Biopharmacological Roles in the Cardiovascular System and Pharmaceutical Perspectives. n. 0, p. 3325–3336, 2012.
- MATERAZZI, S. et al. Vasodilator activity of hydrogen sulfide (H₂S) in human mesenteric arteries. **Microvascular Research**, v. 109, p. 38–44, 2017.
- MAZZA, R. et al. Akt/eNOS signaling and PLN S-sulfhydration are involved in H₂S-dependent cardiac effects in frog and rat. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 4, p. R443–R451, 2013.
- MENDIOLA, P. et al. Acetylcholine Activates Cystathionine γ-Lyase Production of H₂S in Aortic Endothelial Cells. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 1_supplement, p. 837.17-837.17, 2017.
- MENG, G. et al. Protein S-sulfhydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 8, p. 1146–1156, 2018.
- METHNER, C. et al. Mitochondria selective S-nitrosation by mitochondria-

targeted S-nitrosothiol protects against post-infarct heart failure in mouse hearts. **European journal of heart failure**, v. 16, n. 7, p. 712–717, jul. 2014.

MIKAMI, Y. et al. Thioredoxin and dihydrolipoic acid are required for 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase to produce hydrogen sulfide. **Biochemical Journal**, v. 439, n. 3, p. 479–485, 1 nov. 2011.

MOAT, S. J. et al. Folic acid reverses endothelial dysfunction induced by inhibition of tetrahydrobiopterin biosynthesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 530, n. 3, p. 250–258, 2006.

MÓDIS, K. et al. Hydrogen sulfide-mediated stimulation of mitochondrial electron transport involves inhibition of the mitochondrial phosphodiesterase 2A, elevation of cAMP and activation of protein kinase A. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 9, p. 1311–1319, 2013.

MÓDIS, K.; WOLANSKA, K.; VOZDEK, R. Hydrogen sulfide in cell signaling, signal transduction, cellular bioenergetics and physiology in *C. elegans*. **General physiology and biophysics**, v. 32, n. 01, p. 1–22, 2013.

MOHAMMED, R. et al. Vasomotor effects of hydrogen sulfide in human umbilical vessels. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 737–747, 2017.

MULVANY, M. J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation research**, v. 41, n. 1, p. 19–26, 1977.

MUNDAY, R. Induction of phase II enzymes by 3H-1,2-dithiole-3-thione: dose-response study in rats. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 9, p. 1721–1725, 1 abr. 2004.

MUNDAY, R. et al. Structure–activity relationships in the induction of Phase II enzymes by derivatives of 3H-1,2-dithiole-3-thione in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, n. 2, p. 115–122, mar. 2006.

MURPHY, M. P. Targeting lipophilic cations to mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1777, n. 7–8, p. 1028–1031, 2008.

MUSTAFA, A. K. et al. Hydrogen Sulfide as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Sulfhydrates Potassium Channels. **Circulation Research**, v. 109, n. 11, p. 1259–1268, 11 nov. 2011.

NAGAHARA, N. Regulation of Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Activity Via Intrasubunit and Intersubunit Redox-Sensing Switches. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 15, p. 1792–1802, 20 nov. 2013.

NAGY, P. et al. Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 2, p. 876–891, 2014.

NASEEM, K. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. **Oxidative Stress: Clinical and Biomedical Implications**, v. 26, p. 245–258, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Cardiovascular diseases (CVDs)**. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))>. Acesso em: 25 fev. 2019.

PAN, L. L. et al. Role of Cystathionine γ -Lyase/Hydrogen Sulfide Pathway in Cardiovascular Disease: A Novel Therapeutic Strategy? . **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, n. 1, p. 106–118, 2011.

PAN, L. L. et al. The role of hydrogen sulfide on cardiovascular homeostasis: An overview with update on immunomodulation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. SEP, p. 1–13, 2017.

PAQUISSI, F. The role of inflammation in cardiovascular diseases: the predictive value of neutrophil-lymphocyte ratio as a marker in peripheral arterial disease. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 12, p. 851, maio 2016.

PATEL, H. H. et al. Sarcolemmal K_{ATP} channel triggers delayed ischemic preconditioning in rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 288, n. 1, p. H445–H447, 2005.

POLHEMUS, D. J. et al. Hydrogen Sulfide Attenuates Cardiac Dysfunction After Heart Failure Via Induction of Angiogenesis. **Circulation: Heart Failure**, v. 6, n. 5, p. 1077–1086, 19 set. 2013.

POLHEMUS, D. J. et al. Emergence of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Gaseous Signaling Molecule in Cardiovascular Disease. **Circulation Research**, v. 114, n. 4, p. 730–737, 14 fev. 2014.

PREDMORE, B. L.; LEFER, D. J. Hydrogen sulfide-mediated myocardial pre- and post-conditioning. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 83–96, 10 jan. 2011.

PRIAULT, M. et al. Investigation of bax-induced release of cytochrome c from yeast mitochondria. Permeability of mitochondrial membranes, role of VDAC and ATP requirement. **European Journal of Biochemistry**, 1999.

PRIME, T. A. et al. A mitochondria-targeted S-nitrosothiol modulates respiration, nitrosates thiols, and protects against ischemia-reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 26, p. 10764–10769, 30 jun. 2009.

QIAO, W. et al. Endogenous hydrogen sulfide is involved in the pathogenesis of atherosclerosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 396, n. 2, p. 182–186, 2010.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. The mitochondrial permeability transition pore and

its involvement in cell death and in disease pathogenesis. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 815–833, 6 maio 2007.

REIFFENSTEIN, R. Toxicology Of Hydrogen Sulfide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 109–134, 1 jan. 1992.

ROSSONI, L. V et al. Alterations in phenylephrine-induced contractions and the vascular expression of Na⁺, K⁺-ATPase in ouabain-induced hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, n. 3, p. 771–781, fev. 2002.

SAHA, S. et al. Cystathionine β-synthase regulates endothelial function via protein S-sulfhydration. **FASEB Journal**, v. 30, n. 1, p. 441–456, 2016.

SANTILLO, M. et al. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. JUL, p. 1–8, 7 jul. 2015.

SANTOS, S. S. et al. NO production and potassium channels activation induced by *Crotalus durissus cascavella* underlie mesenteric artery relaxation. **Toxicon**, v. 133, p. 10–17, 2017.

SASAKI, N. et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. **Circulation**, v. 101, n. 4, p. 439–445, 2000.

SCHINDER, A. F. et al. Mitochondrial Dysfunction Is a Primary Event in Glutamate Neurotoxicity. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 19, p. 6125–6133, 1 out. 1996.

SHIBUYA, N. et al. Vascular Endothelium Expresses 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase and Produces Hydrogen Sulfide. **The Journal of Biochemistry**, v. 146, n. 5, p. 623–626, 2009a.

SHIBUYA, N. et al. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 4, p. 703–714, 2009b.

SHINOHARA, H. et al. Degassing activity from Iwodake rhyolitic cone, Satsuma-Iwojima volcano, Japan: Formation of a new degassing vent, 1990–1999. **Earth, Planets and Space**, v. 54, n. 3, p. 175–185, 24 mar. 2002.

SIVARAJAH, A. et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. **Shock**, 2009.

SMITH, P. M.; WANG, S. J.; FERGUSON, A. V. Hydrogen sulfide decreases blood pressure by influencing the excitability of area postrema neurons. **FASEB Journal**, v. 31, n. 1, 2017.

SMITH, R. A. J. et al. Selective targeting of an antioxidant to mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, v. 263, n. 3, p. 709–716, ago. 1999.

SMITH, R. A. J.; HARTLEY, R. C.; MURPHY, M. P. Mitochondria-Targeted Small Molecule Therapeutics and Probes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 12, p. 3021–3038, 2011.

STAVROVSKAYA, I. G.; KRISTAL, B. S. The powerhouse takes control of the cell: Is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 6, p. 687–697, mar. 2005.

STIPANUK, M. H.; BECK, P. W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. **The Biochemical journal**, v. 206, n. 2, p. 267–277, ago. 1982.

STITHAM, J. et al. Prostacyclin: an inflammatory paradox. **Frontiers in pharmacology**, v. 2, p. 24, 2011.

STREETER, E. et al. Hydrogen Sulfide in the RVLM and PVN has No Effect on Cardiovascular Regulation. **Frontiers in Physiology**, v. 2, 2011.

SUGAMURA, K.; KEANEY, J. F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 978–992, set. 2011.

SUN, Y.-G. et al. Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. **Cardiovascular Research**, v. 79, n. 4, p. 632–641, 2008.

SZABO, C. et al. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 8, p. 2099–2122, 2014.

SZABO, C. A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: From environmental toxin to biological mediator. **Biochemical Pharmacology**, v. 149, p. 5–19, 2018.

SZABO, C.; PAPAPETROPOULOS, A. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 4, p. 497–564, 4 out. 2017.

SZCZESNY, B. et al. AP39 [10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl) triphenylphosphonium bromide], a mitochondrially targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondria. **Nitric oxide**, v. 41, p. 120–130, set. 2014.

TEAGUE, B.; ASIEDU, S.; MOORE, P. K. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. **British journal of pharmacology**, v. 137, n. 2, p. 139–145, set. 2002.

TINKER, J. H.; MICHENFELDER, J. D. Sodium nitroprusside: pharmacology, toxicology and therapeutics. **Anesthesiology**, v. 45, n. 3, p. 340–54, 1976.

TOMASOVA, L. et al. Effects of AP39, a novel triphenylphosphonium derivatised anethole dithiolethione hydrogen sulfide donor, on rat haemodynamic parameters and chloride and calcium Cav₃ and RyR₂ channels. **Nitric Oxide**, v. 46, p. 131–144, 2015.

TORREGROSSA, R. et al. Evaluation of a Novel Mitochondria-targeted Peptide-based H₂S Donor Compound (RTP-10) in Hyperglycaemia-induced Microvascular Endothelial Cell Dysfunction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 112, p. 157, 2017.

TRNKA, J.; ELKALAF, M.; ANDĚL, M. Lipophilic Triphenylphosphonium Cations Inhibit Mitochondrial Electron Transport Chain and Induce Mitochondrial Proton Leak. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0121837, 30 abr. 2015.

TYAGI, N. et al. H₂S protects against methionine-induced oxidative stress in brain endothelial cells. **Antioxidants and Redox Signaling**, 2009.

VOZDEK, R. et al. Novel structural arrangement of nematode cystathionine β-synthases: characterization of *Caenorhabditis elegans* CBS-1. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 2, p. 535–547, 15 abr. 2012.

WALEWSKA, A.; SZEWCZYK, A.; KOPROWSKI, P. Gas Signaling Molecules and Mitochondrial Potassium Channels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3227, 18 out. 2018.

WALLACE, J. L. et al. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 6, p. 1236–1246, mar. 2010.

WALLACE, J. L.; FERRAZ, J. G. P.; MUSCARA, M. N. Hydrogen Sulfide: An Endogenous Mediator of Resolution of Inflammation and Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, n. 1, p. 58–67, 2012.

WANG, R. The Gasotransmitter Role of Hydrogen Sulfide. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 5, n. 4, p. 493–501, 2003.

WANG, R. Gasotransmitters: Growing pains and joys. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 5, p. 227, 2014.

WANG, Y. et al. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein e knockout mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 2, p. 173–179, fev. 2009.

WHITE, B. J. O. O.; SMITH, P. A.; DUNN, W. R. Hydrogen sulfide-mediated vasodilatation involves the release of neurotransmitters from sensory nerves in pressurized mesenteric small arteries isolated from rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 4, p. 785–793, fev. 2013.

WHITE, R. M.; RIVERA, C. O.; DAVISON, C. B. Differential Contribution of Endothelial Function to Vascular Reactivity in Conduit and Resistance Arteries From Deoxycorticosterone-Salt Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 27, n. 6, p. 1245–1253, 1996.

WHITEMAN, M. et al. The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite “scavenger”? **Journal of Neurochemistry**, v. 90, n. 3, p. 765–768, ago. 2004.

WHITEMAN, M. et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 1, p. 303–310, abr. 2006.

WHITEMAN, M. et al. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. **Antioxidants and Redox Signaling**, 2010.

WONG, N. D. et al. Prevalence, Treatment, and Control of Combined Hypertension and Hypercholesterolemia in the United States. **American Journal of Cardiology**, v. 98, n. 2, p. 204–208, 2006.

XIAO, L. et al. Hydrogen Sulfide Improves Endothelial Dysfunction via Downregulating BMP4/COX-2 Pathway in Rats with Hypertension. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–10, 2016.

XIE, Z. Z.; LIU, Y.; BIAN, J. S. Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

XU, S.; LIU, Z.; LIU, P. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis. **International Journal of Cardiology**, v. 172, n. 2, p. 313–317, 2014.

XU, Z. S. et al. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis. **Free Radical Biology and Medicine**, 2011.

YAMASAKI, H.; COHEN, M. F. Biological consilience of hydrogen sulfide and nitric oxide in plants: Gases of primordial earth linking plant, microbial and animal physiologies. **Nitric oxide : biology and chemistry**, v. 55–56, p. 91–100, maio 2016.

YAN, H.; DU, J.; TANG, C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 313, n. 1, p. 22–27, jan. 2004.

YANG, G. et al. H₂S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine -Lyase. **Science**, v. 322, n. 5901, p. 587–590, 2008.

YANG, G.; WANG, R. **Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide**. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 230

YOO, D. et al. Analysis of cardiovascular responses to the H₂S donors Na₂S and NaHS in the rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 4, p. H605–H614, 15 ago. 2015.

ZANARDO, R. C. O. et al. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 12, p. 2118–2120, out. 2006.

ZHANG, D. et al. H₂S-Induced Sulfhydration: Biological Function and Detection Methodology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 608, 6 set. 2017.

ZHANG, L. et al. Hydrogen sulfide (H₂S)-releasing compounds: Therapeutic potential in cardiovascular diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. SEP, p. 1–17, 2018.

ZHAO, F. et al. AP39, a Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide Donor, Supports Cellular Bioenergetics and Protects against Alzheimer's Disease by Preserving Mitochondrial Function in APP/PS1 Mice and Neurons. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n. C, p. 1–19, 2016.

ZHAO, W. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 21, p. 6008–6016, 1 nov. 2001.

ZHAO, W.; NDISANG, J. F.; WANG, R. Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 81, n. 9, p. 848–853, set. 2003.

ZHAO, W.; WANG, R. H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 283, n. 2, p. H474–H480, 2002.

ZHONG, G. et al. The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. **Journal of Hypertension**, v. 21, n. 10, p. 1879–1885, out. 2003.

ZIELONKA, J. et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 15, p. 10043–10120, 9 ago. 2017.