

LEONARDO ANDRÉ DA COSTA MARQUES

**Caracterização Farmacológica de Doadores de Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S) 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

## RESUMO

MARQUES, LAC. Caracterização Farmacológica de Doadores de Sulfeto de Hidrogênio (H<sub>2</sub>S) 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 (H<sub>2</sub>S) na fisiopatologia é cada vez mais explorada, incluindo os efeitos benéficos de doadores de H<sub>2</sub>S no sistema cardiovascular e na inflamação. Novos compostos com especificidade mitocondrial, como o AP39, fornecem H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S, 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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S (com AOAA), bloqueio inespecífico dos canais de potássio (com TEA), dos canais de potássio sensíveis a ATP (K<sub>ATP</sub>; com glibenclamida) ou dos canais de potássio ativados por cálcio (com apamina). Valores de resposta máxima (E<sub>max</sub>) e potência (pA<sub>2</sub>; -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 H<sub>2</sub>S (CSE, CBS e 3MPST) foram analisadas por RT-PCR e *Western blotting*, respectivamente e a produção de H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S pelo AOAA aboliu a produção endógena de H<sub>2</sub>S, 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 H<sub>2</sub>S testados mostraram-se dependentes da presença do endotélio e especificamente dependentes da sinalização do NO e abertura de canais de potássio. Entretanto, o H<sub>2</sub>S endógeno mostrou-se participante do mecanismo de ação do AP39 e a inibição de K<sub>ATP</sub> não atenuou o vasorelaxamento do AP39, contrastando ao NaHS. No presente estudo evidenciou-se o vasorelaxamento induzido pelos diferentes doadores de H<sub>2</sub>S. Notou-se diferenças nos mecanismos de ação, provavelmente associadas às diferenças de mecanismos de liberação e localização do H<sub>2</sub>S. Ainda, a maior potência na ordem de dez vezes do AP39 em comparação ao NaHS confere uma vantagem aos doadores mitocondriais de H<sub>2</sub>S. Considerando os achados do presente estudo, bem como seus efeitos anteriormente descritos, os doadores mitocondriais de H<sub>2</sub>S 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 (H<sub>2</sub>S) 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 (H<sub>2</sub>S) is growing, including those describing the beneficial effects of H<sub>2</sub>S-donors on the cardiovascular system and inflammation. Among the H<sub>2</sub>S-donors, newly developed mitochondria-targeted compounds, such as AP39, supply H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S-donors, the spontaneous H<sub>2</sub>S-donor sodium hydrosulfide (NaHS) and the mitochondria targeted H<sub>2</sub>S-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 H<sub>2</sub>S-donor moiety of AP39) and NaHS were analyzed on resting vessels and under 1.7 μM phenylephrine-induced pre-contraction. In addition, the H<sub>2</sub>S-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 H<sub>2</sub>S-producing enzymes (by AOAA), non-selective inhibition of K<sup>+</sup> channels (by TEA), selective inhibition of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels (by glibenclamide) or Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (by apamin). Maximal response (E<sub>max</sub>) and potency (pA<sub>2</sub>; as -log of the agonist concentration necessary to achieve 50% of E<sub>max</sub>) values were obtained from concentration-response curves. Protein and gene expressions of the H<sub>2</sub>S-producing enzymes (CBS, CSE and 3MPST) were analyzed by Western blot and

RT-PCR, respectively. The *in vitro* production of H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S-producing enzymes by AOAA abolished H<sub>2</sub>S 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<sup>+</sup> channels opening. However, endogenous H<sub>2</sub>S participates in the mechanism of action of AP39, but not of NaHS. Moreover, K<sub>ATP</sub> blockade did not attenuate AP39 vasorelaxation. In the present study it is demonstrated the vasorelaxant activities of different classes of H<sub>2</sub>S-donors, and their differences are likely associated to the mechanisms of H<sub>2</sub>S release as well as the sites where H<sub>2</sub>S becomes available. Furthermore, the higher potency of AP39 in comparison with NaHS (approximately ten-fold) confers advantages to mitochondrial H<sub>2</sub>S-donors. Considering the results of the present study and the previously demonstrated effects, mitochondria-targeted H<sub>2</sub>S-donors may offer a good perspective in cardiovascular disease therapeutics.

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

## 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 H<sub>2</sub>S em mamíferos

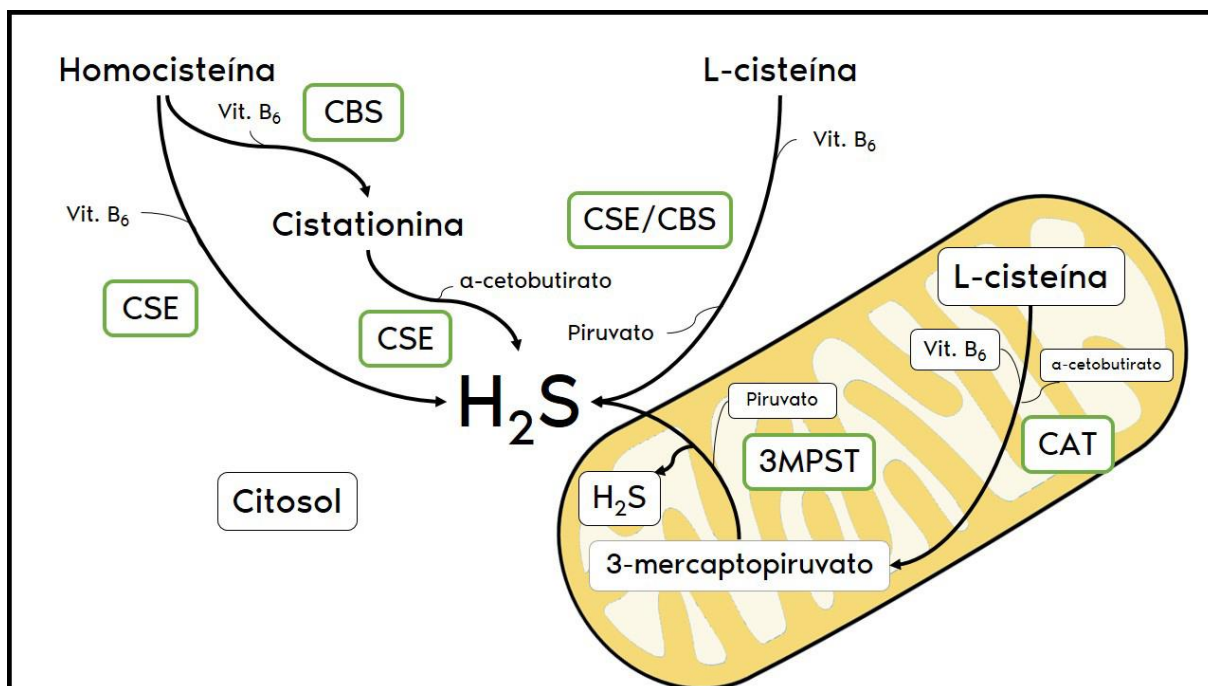
O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é classificado como um gasotransmissor, junto ao óxido nítrico (NO) e o monóxido de carbono (CO). Os gasotransmissores se difundem facilmente por membranas celulares, propriedade que lhes permitem atingir diferentes compartimentos celulares ou células adjacentes (WANG, 2014). Em mamíferos, a elucidação da importância fisiológica do H<sub>2</sub>S foi o objetivo de diversos estudos, sendo principalmente descrita nos sistemas nervoso, cardiovascular e imunológico (HOLWERDA; KARUMANCHI; LELY, 2015).

A quantificação das concentrações de H<sub>2</sub>S em amostras biológicas ainda é assunto de grande debate na literatura. No entanto, existe um consenso que os efeitos fisiológicos do H<sub>2</sub>S são relacionados a concentrações muito baixas, de 1 nM a ordem de 1 μM (SZABO; PAPAPETROPOULOS, 2017). A produção endógena de H<sub>2</sub>S 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 B<sub>6</sub> (5' fosfato pirodoxal) e são catalisadoras da produção do H<sub>2</sub>S a partir de aminoácidos dos L-cisteína, L-homocisteína e L-cistationina (SZABO, 2018). Existem vias da síntese de H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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<sub>2</sub>S em mamíferos. Embora o H<sub>2</sub>S tenha a propriedade de fluir livremente através das membranas celulares, respeitando o equilíbrio cinético de cada compartimento celular, a produção endógena de H<sub>2</sub>S pode ser didaticamente dividida entre citosólica e mitocondrial. Na via citosólica, cita-se principalmente que a produção do H<sub>2</sub>S 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<sub>2</sub>S 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<sub>2</sub>S a partir do complexo persulfeto contido na molécula de 3-mercaptopiruvato. É importante notar que a vitamina B<sub>6</sub>, 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<sub>2</sub>S 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<sub>2</sub>S

Os primeiros efeitos fisiológicos relacionados a sinalização do H<sub>2</sub>S 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<sub>2</sub>S (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 quando 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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S, na área postrema (associada ao NTS) diminuiu a pressão arterial de ratos anestesiados (SMITH; WANG; FERGUSON, 2017). Assim, os efeitos do H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S. (GHEIBI et al., 2018; KING et al., 2014; POLHEMUS et al., 2014). H<sub>2</sub>S e NO compartilham efeitos vasculares, como vasorelaxamento, angiogênese, atenuação de apoptose celular e efeitos antioxidantes. O mecanismo de sinalização do H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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<sup>+</sup> sensíveis a ATP (K<sub>ATP</sub>; ZHAO, 2001) presentes principalmente nas células do músculo liso vascular. Ainda, a capacidade de abertura dos canais K<sub>ATP</sub> pelo NO também representa uma parcela do mecanismo de interação entre NO e H<sub>2</sub>S (SASAKI et al., 2000; ZHAO; NDISANG; WANG, 2003; ZHAO; WANG, 2003). Além de K<sub>ATP</sub>, a capacidade de ativação de outros canais de potássio também é associada aos efeitos vasculares do H<sub>2</sub>S, como canais de potássio ativados por cálcio (K<sub>Ca</sub>) e canais de potássio dependentes de voltagem (K<sub>v</sub>; HEDEGAARD et al., 2015; JACKSON-WEAVER et al., 2013; MATERAZZI et al., 2017). Ainda, o H<sub>2</sub>S é capaz de interagir com outros canais iônicos no sistema cardiovascular como inibir o canal de Ca<sup>2+</sup>-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<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 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<sub>2</sub>S, 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<sub>2</sub>S (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<sub>2</sub>S

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<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S envolve o sequestro *per se* de espécies oxidantes, como o peroxinitrito (WHITEMAN et al., 2004), embora as concentrações de H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S (ZHANG et al., 2018). A atividade antioxidante do H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S relaciona-se a ativação do NRF<sub>2</sub> – “*nuclear fator erythroid 2-related factor*” ou fator de transcrição eritróide-2. NRF<sub>2</sub> é responsável pela regulação da expressão de

diversos genes relacionados a atividade antioxidante celular. NRF<sub>2</sub> é encontrado no citoplasma em forma em complexo inativo denominado KEAP<sub>1</sub> – “*Kelch-like ECH-associated protein 1*” (BEAUCHAMP et al., 1984). Quando ativado, KEAP<sub>1</sub> é ubiquitinizado e transloca NRF<sub>2</sub> ao núcleo celular, induzindo a expressão de elementos de resposta antioxidante como tioredoxina (TRX<sub>1</sub>), glutationa redutase e ativadores de tioredoxina.

O H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S com o complexo KEAP<sub>1</sub>, a partir da S-sulfidração do resíduo cisteína-151, altera a conformação de KEAP<sub>1</sub>, liberando NRF<sub>2</sub> e desencadeando sua sinalização nuclear, ativando vias antioxidantes citadas anteriormente. Este mecanismo é responsável pelas propriedades cardioprotetoras da sinalização do H<sub>2</sub>S, 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 tetrahidrobiopterinas (BH<sub>4</sub>), 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 H<sub>2</sub>S em inibir a atividade da NOX em osteoblastos expostos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S

Além dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, o H<sub>2</sub>S também possui propriedades bioenergéticas. Em altas concentrações (superiores a 10 μM), o H<sub>2</sub>S é tóxico ao metabolismo mitocondrial ao competir com o O<sub>2</sub> na associação ao complexo IV (citocromo C oxidase). A interação entre o O<sub>2</sub> e o complexo IV é essencial a produção de ATP (HILL et al., 1984). Embora relacionado anteriormente ao metabolismo de microrganismos que oxidam H<sub>2</sub>S (GRIESHABER; VÖLKEL, 1998), estudos mais recentes demonstram a capacidade de suplementação para a produção de ATP pelo H<sub>2</sub>S em mamíferos ao doar elétrons à cadeia respiratória de maneira análoga as funções de

nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina-adenina dinucleótido (FADH<sub>2</sub>; LAGOUTTE et al., 2010).

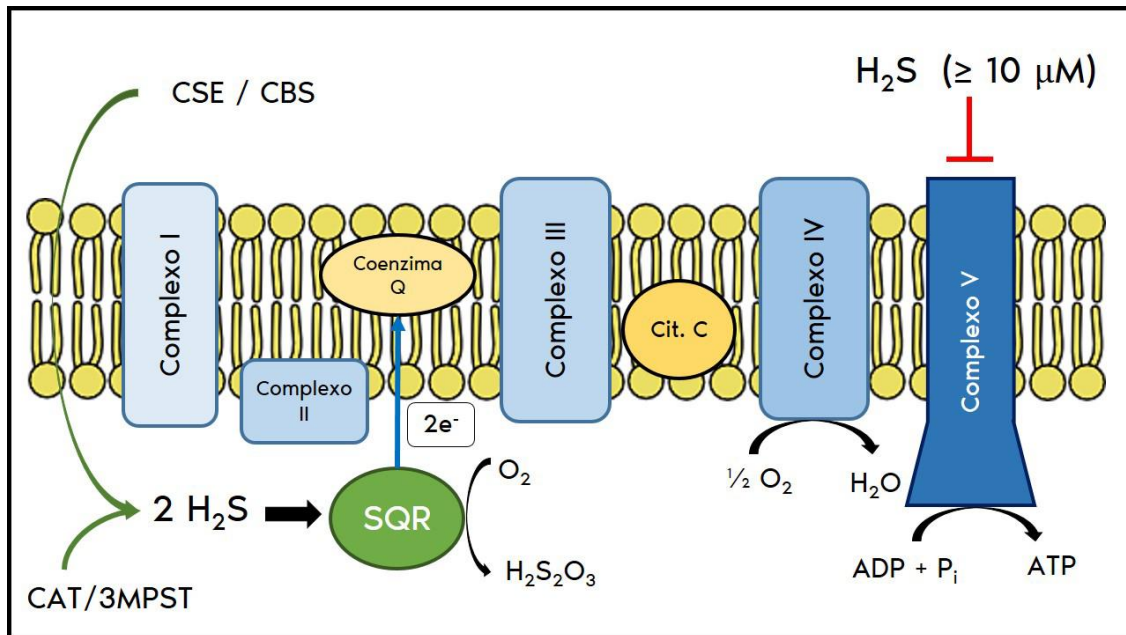
O complexo enzimático sulfeto quinona redutase (SQR) é responsável por parte do processo de oxidação do H<sub>2</sub>S. A inibição do complexo III ou do complexo IV com antimicina e cianeto, respectivamente, impedem a oxidação do H<sub>2</sub>S, ao passo que a inibição do complexo I com rotenona não afeta a oxidação do H<sub>2</sub>S (GOUBERN et al., 2007). Desta forma, indica-se que os elétrons disponibilizados à cadeia respiratória pela oxidação do H<sub>2</sub>S ingressam-na a partir da coenzima Q. SQR é capaz de injetar dois elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, reduzindo a coenzima Q dependentemente de O<sub>2</sub> e libera como produto da oxidação o tiosulfato (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; HILDEBRANDT; GRIESHABER, 2008). Apesar da oxidação do H<sub>2</sub>S ser considerada mais onerosa à célula (com demanda até três vezes maior de O<sub>2</sub>), o H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S, considera-se a 3MPST como a enzima mais abundante, predominantemente localizada no interior mitocondrial (SHIBUYA et al., 2009b). A produção mitocondrial endógena de H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S, mobilizado por 3MPST. Ainda, a liberação de H<sub>2</sub>S deste complexo persulfeto depende do equilíbrio redox promovido por agentes redutores, como as enzimas tioredoxina e glutatona (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 H<sub>2</sub>S oriundo de outras enzimas produtoras de H<sub>2</sub>S, CSE e CBS, tem sido discutida. Mesmo que predominantemente citosólicas, o H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S especialmente em condições limitantes específicas (FU et al., 2012). Os mecanismos bioenergéticos do H<sub>2</sub>S em células de mamíferos foram resumidos na figura 2.

Outros estudos *in vivo* demonstraram que o H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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.



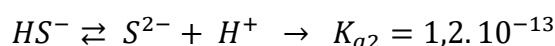
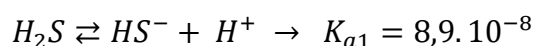


**Figura 2** – Os efeitos bioenergéticos do H<sub>2</sub>S em mamíferos. Os efeitos bioenergéticos do H<sub>2</sub>S não se limitam ao metabolismo bacteriano anaeróbico, sendo descrito também em mamíferos. Em concentrações superiores a 10 µM, o H<sub>2</sub>S sobretudo inibe a atividade do complexo V, reduzindo drasticamente a produção de ATP. Assim, para os efeitos bioenergéticos sugere-se concentrações menores, na ordem de 10 nM a 1 µM. O H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S são oxidadas a partir da atividade da enzima quinona sulfeto oxidoreductase (SQR), a partir do aporte de O<sub>2</sub> e liberando como produto o tiosulfato (H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). 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 H<sub>2</sub>S

Considerando os efeitos cardiovasculares, antioxidantes, anti-inflamatórios e bioenergéticos do H<sub>2</sub>S, a suplementação de H<sub>2</sub>S tem sido amplamente utilizada no combate e prevenção das doenças cardiovasculares (XU; LIU; LIU, 2014). A literatura tem utilizado amplamente doadores espontâneos de H<sub>2</sub>S, classificados de acordo com a rápida e intensa liberação do H<sub>2</sub>S quando administrados.

Dentre os doadores de H<sub>2</sub>S mais utilizados experimentalmente, destacam-se os sais de sulfeto NaHS (hidrossulfeto de sódio) e Na<sub>2</sub>S (sulfeto de sódio). Estes compostos aumentam a concentração de H<sub>2</sub>S 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 Na<sub>2</sub>S sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos *in vivo*. A infusão dos doadores NaHS ou Na<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S 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

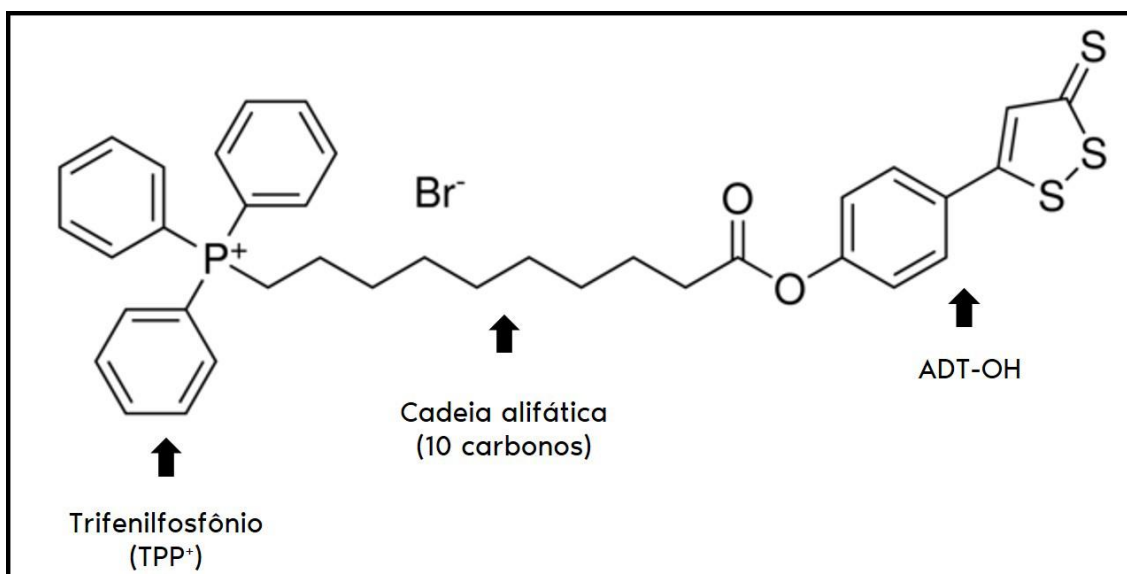
experimental. Desta forma, algumas estratégias foram adotadas para reproduzir melhor a taxa de liberação fisiológica, como o desenvolvimento de doadores de liberação lenta (ZHANG et al., 2018).

Um estudo com o composto GYY-4137 (*Morpholin-4-ium (4-methoxyphenyl)-morpholin-4-ylsulfanylidene-sulfido-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 H<sub>2</sub>S, destinam o H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S, os compostos AP39 e AP123 recebem destaque na literatura. A molécula do doador mitocondrial de H<sub>2</sub>S AP39 (*10-oxo-10-(4-(3-thioxo-3H-1,2-dithiol-5yl)phenoxy)decyl)triphenylphosphonium bromide*) é composta por um grupo trifenilfosfônio (TPP<sup>+</sup>), responsável pelo direcionamento ao ambiente mitocondrial. O TPP<sup>+</sup> 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 H<sub>2</sub>S do AP39, denominada ADT-OH (*5-(4-hydroxyphenyl)-3H-1,2-dithiole-3-thione*) é ligada ao TPP<sup>+</sup> por uma cadeia alifática de 10 carbonos, a qual também é responsável pela diminuição dos efeitos deletérios do TPP<sup>+</sup> 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 H<sub>2</sub>S AP39. O AP39 é um composto doador mitocondrial de H<sub>2</sub>S. 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<sup>+</sup>) 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>. A molécula ADT-OH (“5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiol-3-tiona”) é responsável pela liberação de H<sub>2</sub>S. A interação com a O H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>S ao ambiente mitocondrial foi capaz de aumentar a potência do H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 glutatona, 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  $Ca_v3$ , reduziu a atividade dos receptores de rianodina ( $RyR_2$ ) 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  $H_2S$  e especificamente ao AP39, a elucidação dos mecanismos de ação sobre o vasorelaxamento poderia complementar a combinação de efeitos moleculares e cardiovasculares do AP39.

## 6 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou os efeitos e os primeiros mecanismos de ação propostos ao doador mitocondrial de H<sub>2</sub>S, AP39, para o vasorelaxamento de artérias mesentéricas *in vitro*. As concentrações de H<sub>2</sub>S 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 (H<sub>2</sub>S) 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.
- BEAUCHAMP, R. O. et al. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, 1984a.
- 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.
- BHATIA, M. Hydrogen sulfide as a vasodilator. **IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, v. 57, n. 9, p. 603–606, 1 set. 2005.
- BIBLI, S. I. et al. Cardioprotection by H<sub>2</sub>S engages a cGMP-dependent protein kinase G/phospholamban pathway. **Cardiovascular Research**, 2015.
- 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.
- CHATZIANASTASIOU, A. et al. Cardioprotection by H<sub>2</sub>S 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.

COLETTA, C. et al. Regulation of Vascular Tone, Angiogenesis and Cellular Bioenergetics by the 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase/H<sub>2</sub>S Pathway: Functional Impairment by Hyperglycemia and Restoration by dl- $\alpha$ -Lipoic Acid. **Molecular Medicine**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 18 jan. 2015.

FENG, S. et al. H<sub>2</sub>S 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 (H<sub>2</sub>S) 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.

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 (H<sub>2</sub>S) 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 H<sub>2</sub>S: 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.

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.
- 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.
- HUANG, C. W. et al. A novel slow-releasing hydrogen sulfide donor, FW1256, exerts anti-inflammatory effects in mouse macrophages and in vivo. **Pharmacological Research**, v. 113, p. 533–546, nov. 2016.
- 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<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels and smooth muscle Ca<sup>2+</sup> sparks. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 304, n. 11, p. H1446–H1454, 2013.
- 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 (H<sub>2</sub>S) donor, protects against myocardial reperfusion injury independently of salvage kinase signalling. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 4, p. 287–301, 2017.
- 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.
- 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 H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>S. **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.

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.

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

KONDO, K. et al. H<sub>2</sub>S 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.

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.

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.

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.

LIU, Z. et al. The hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E  $-/-$  mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 8, p. 1795–1809, 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 (H<sub>2</sub>S). **Inhalation Toxicology**, v. 21, n. sup3, p. 56–72, 14 dez. 2009.

MATERAZZI, S. et al. Vasodilator activity of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) in human mesenteric arteries. **Microvascular Research**, v. 109, p. 38–44, 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.

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

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.

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.

PAN, L. L. et al. Role of Cystathionine  $\gamma$ -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.

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.

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.

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.

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.
- 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.
- 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.
- STREETER, E. et al. Hydrogen Sulfide in the RVLM and PVN has No Effect on Cardiovascular Regulation. **Frontiers in Physiology**, v. 2, 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 (H<sub>2</sub>S) 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 H<sub>2</sub>S Levels: H<sub>2</sub>S Donors and H<sub>2</sub>S Biosynthesis Inhibitors. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 4, p. 497–564, 4 out. 2017.
- SZCZESNY, B. et al. AP39, a novel mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, stimulates cellular bioenergetics, exerts cytoprotective effects and protects against the loss of mitochondrial DNA integrity in oxidatively stressed endothelial cells in vitro. **Nitric Oxide**, v. 41, p. 120–130, 2014a.
- 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.
- 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 H<sub>2</sub>S 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. H<sub>2</sub>S 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 βsynthases: characterization of *Caenorhabditis elegans* CBS-1. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 2, p. 535–547, 15 abr. 2012.

WALLACE, J. L. et al. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphidereleasing 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.

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.

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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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. H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S donors Na<sub>2</sub>S 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, L. et al. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-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 H<sub>2</sub>S 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 H<sub>2</sub>S in rat tissues. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 81, n. 9, p. 848–853, set. 2003.

ZHAO, W.; WANG, R. H<sub>2</sub>S-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.