

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 30/08/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
CAMPUS DE BOTUCATU

MICHELLY CRISTINA MONTENOTE

**EFEITOS DA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AIA) SOBRE AS
RESPOSTAS DE VEIAS À NORADRENALINA E ANGIOTENSINA II**

Botucatu - SP
2021

MICHELLY CRISTINA MONTENOTE

**EFEITOS DA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AIA) SOBRE AS
RESPOSTAS DE VEIAS À NORADRENALINA E ANGIOTENSINA II**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como
requisito para obtenção do título de Doutora em
Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Spadella

Botucatu - SP
2021

M777e Montenote, Michelly Cristina
Efeitos da artrite induzida por adjuvante (AIA) sobre as respostas
de veias à noradrenalina e angiotensina II / Michelly Cristina
Montenote. -- Botucatu, 2021
79 f.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Agnaldo Bruno Chies
Coorientadora: Maria Angélica Spadella

1. Sistema cardiovascular. 2. Artrite. 3. Endotélio. 4. Vasos
sanguíneos. 5. Vasoconstritores. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Michelly Cristina Montenote

**EFEITOS DA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AIA) SOBRE AS
RESPOSTAS DE VEIAS À NORADRENALINA E ANGIOTENSINA II**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Spadella

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies – Presidente

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

Profa. Dra. Gabriela Palma Zochio

Prof. Dra Liliam Fernandes

Prof. Dra. Maria Aparecida de Oliveira

Data da aprovação: 30 de agosto de 2021.

Dedico este trabalho com todo o amor do mundo aos meus avós (in memoriam), que não estão mais entre nós, mas continuam sendo minha maior força na vida. E aos meus pais e minha irmã que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus, me impulsionando nos momentos mais conturbados dessa trajetória. Sem vocês, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies pela disponibilidade e acompanhamento exercido durante a execução do trabalho e ainda por acreditar no meu potencial. Agradeço por todos os ensinamentos compartilhados que me fizeram não somente conquistar um sonho, mas que também ser a pessoa que sou hoje.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Maria Angélica Spadella, por seu acolhimento em todos os momentos dispensados, pelas contribuições importantes, conhecimentos repassados, gentileza e dedicação na realização deste e de outros trabalhos.

Ao Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva e ao doutorando Alexandre pela valiosa colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e por abrir as portas de seu laboratório permitindo que parte dos experimentos deste estudo pudessem ser realizados. Meu muito obrigado pela saudosa parceria.

Aos colegas e parceiros desse trabalho que tenho orgulho em poder chamá-los de amigos, em especial à Letícia, Priscilla, Júlia, Rosa, Alisson e Thaís. Obrigada por nunca pouparem esforços para me ajudar com toda dedicação e auxílio nos experimentos e por tornarem todo esse processo mais leve. Sentirei muita falta do nosso convívio diário. Vocês foram essenciais, os levarei para vida!

Ao Prof. Dr. Eduardo Federighi Baisi Chagas pelo auxílio e contribuição prestados na pesquisa, através do tratamento estatístico dos dados.

À Faculdade de Medicina de Marília, por acolher a realização dessa pesquisa em suas dependências e, em especial, aos funcionários Milton, Célia e Dona Cida, pela paciência e assistência e a todos os professores do Núcleo de Cadeiras Básicas pelos momentos compartilhados e encontros pelos corredores.

A todos os professores da Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências, pelas disciplinas ministradas e pelos valiosos conhecimentos que me foram transmitidos.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, em especial ao Davi, pela dedicação, gentileza e prontidão no atendimento aos alunos.

Aos membros da banca examinadora que, gentilmente, se dispuseram a contribuir para a análise, discussão e conclusão deste trabalho.

A todos os amigos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos meus amados Fer, Gabi, Mari, Kadu, Thi e Rafa entre outros queridos e admiráveis amigos que não se faz necessário nome. Cada um de vocês sabe o quão importante foram durante a minha caminhada. Deixo aqui expresso o meu sincero reconhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de Financiamento 001, a qual agradecemos.

“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’. Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’ ”.

(George Bernard Shaw)

RESUMO

MONTENOTE, M. C. **Efeitos da artrite induzida por adjuvante (AIA) sobre as respostas de veias à noradrenalina e angiotensina II.** 2021. 79 f. Tese (Doutorado em Farmacologia e Biotecnologia) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

Na artrite reumatoide (AR) mediadores inflamatórios derivados das articulações inflamadas podem causar manifestações extra-articulares. Manifestações da AR que acometem o sistema cardiovascular podem ter impacto na expectativa de vida dos pacientes. Os efeitos vasculares induzidos pela AR são mais conhecidos em artérias, embora não se descarte que alterações no leito venoso poderiam resultar em alterações na complacência venosa e, por consequência, na dinâmica circulatória. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da artrite induzida por adjuvante (AIA) em diferentes respostas das veias cava, femoral, mesentérica e porta à noradrenalina (NOR) e angiotensina II (Ang II), com foco no funcionamento dos mecanismos endoteliais relacionados ao óxido nítrico (NO) e aos prostanoídes. Portanto, fez-se a indução da AIA em ratos Wistar machos através da administração de uma emulsão contendo *Mycobacterium tuberculosis* (3,8 mg/ml), por via intradérmica, na planta da pata traseira direita. Esses animais foram mortos 4, 15 e 40 dias após a indução da AIA e suas veias cava, femoral, mesentérica e porta foram desafiadas em banho de órgãos com NOR e Ang II, na ausência ou na presença L-NAME, indometacina e/ou 1400W. Os resultados mostram que a AIA reduz as respostas nessas veias no 4º e 15º dias após a indução da AIA, mas não na fase tardia. Em relação à NOR, essa redução ocorre apenas na veia femoral, enquanto para Ang II, essa redução foi observada nas veias cava, mesentérica e porta. Essas reduções de resposta tanto à NOR quanto à Ang II foram suprimidas na presença de L-NAME, mas não na presença da indometacina, o que sugere o envolvimento do NO nesse fenômeno. O 1400W suprimiu a redução das respostas da veia femoral à NOR, assim como das veias cava e mesentéricas à Ang II, causadas pela AIA no 15º dia pós-indução. Isso sugere que, nessas preparações, o aumento da produção local de NO causado pela AIA ocorre através da estimulação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). No 4º dia pós-indução, as respostas das veias cava, mesentérica e porta permanecem reduzidas nos animais AIA, mesmo em preparações tratadas simultaneamente com L-NAME e indometacina. Este dado sugere a participação de um mecanismo ainda

desconhecido, não relacionado ao NO ou prostanoídes, nessa redução de resposta causada pela AIA na fase mais precoce do modelo.

Palavras-chave: Artrite; Endotélio; Sistema cardiovascular; Vasoconstritores; Vasos sanguíneos.

ABSTRACT

MONTENOTE, M. C. **Effects of adjuvant-induced arthritis (AIA) on vein responses to noradrenaline and angiotensin II** 2021. 79 p. Thesis (Doctorate in Pharmacology and Biotechnology) - Botucatu Institute of Biosciences, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2021.

In rheumatoid arthritis (RA) inflammatory mediators derived from inflamed joints can cause extra-articular manifestations. Manifestations of RA that affect the cardiovascular system can have an impact on patients' life expectancy. RA-induced vascular effects are best known in arteries, although it is not ruled out that changes in the venous bed could result in changes in venous compliance and, consequently, in circulatory dynamics. Thus, the present study aimed to investigate the effects of adjuvant-induced arthritis (AIA) on different responses of the vena cava, femoral, mesenteric and portal veins to noradrenaline (NOR) and angiotensin II (Ang II), focusing on the functioning of the mechanisms endothelial cells related to nitric oxide (NO) and prostanoids. Therefore, AIA was induced in male Wistar rats through the intradermal administration of an emulsion containing *Mycobacterium tuberculosis* (3.8 mg/mL) in the sole of the right hind paw. These animals were killed 4, 15 and 40 days after AIA induction and their vena cava, femoral, mesenteric and portal veins were challenged in an organ bath with NOR and Ang II, in the absence or presence of L-NAME, indomethacin and/or 1400W. The results show that AIA reduces responses in these veins on the 4th and 15th days after AIA induction, but not in the late phase. In relation to NOR, this reduction occurs only in the femoral vein, while for Ang II, this reduction was observed in the vena cava, mesenteric and portal veins. These response reductions to both NOR and Ang II were suppressed in the presence of L-NAME, but not in the presence of indomethacin, which suggests the involvement of NO in this phenomenon. The 1400W suppressed the reduction in the responses of the femoral vein to NOR, as well as the vena cava and mesenteric veins to Ang II, caused by AIA on the 15th day post-induction. This suggests that, in these preparations, the increase in local NO production caused by AIA occurs through stimulation of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme. On the 4th day post-induction, vena cava, mesenteric and portal responses remain reduced in AIA animals, even in preparations treated simultaneously with L-NAME and indomethacin. This data suggests the participation of a still unknown mechanism, unrelated to NO or prostanoids, in this reduction of response caused by AIA at the earliest stage of the model.

Keywords: Arthritis; Endothelium; Cardiovascular system; Vasoconstrictors; Blood vessels.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Patas posteriores de ratos da linhagem Wistar apresentando manifestações articulares do modelo experimental de artrite induzida por adjuvante	18
Figura 2 – Massa corporal (A), diâmetro (B) e volume (C) da pata posterior esquerda dos animais CTRL (□) e AIA; (■) obtida nos diferentes dias pós indução	30
Figura 3 – Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias cava, femoral, mesentérica e porta, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (o) e artrite (●) nos diferentes tempos pós-indução..	32
Figura 4 – Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações isoladas de veias cava, mesentérica e porta, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (o) e artrite (●) nos diferentes tempos pós-indução..	35
Figura 5 – Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias cava, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (□) e artrite (■) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10-4 M e indometacina 10-5 M	38
Figura 6 – Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias femoral, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (□) e artrite (■) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10-4 M e indometacina 10-5 M	41
Figura 7 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias mesentérica, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (□) e artrite (■) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10-4 M e indometacina 10-5 M	44
Figura 8 – Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias porta, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (□) e artrite (■) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10-4 M e indometacina 10-5 M.....	47
Figura 9 – Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações isoladas de veias cava, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (□) e artrite (■) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10-4 M e indometacina 10-5 M	50
Figura 10 – Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações isoladas de veias mesentérica, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (□) e artrite (■) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10-4 M e indometacina 10-5 M.....	53

Figura 11 – Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações isoladas de veias porta, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (□) e artrite (■) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10^{-4} M e indometacina 10^{-5} M.....	55
Figura 12 – Curvas concentração-resposta para angiotensina II e noradrenalina obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (□) e artrite (■) aos 15 dias pós-indução, na presença de 1400W.....	57
Figura 13 – Interação óxido nítrico e prostanoídes em resposta à angiotensina II.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores semi-quantitativos de PCR	31
Tabela 2 – Resposta máxima e valores de pEC_{50} para as curvas de noradrenalina obtidas das preparações de veias cava, femoral, mesentérica e porta dos grupos CTRL e AIA nos tempos 4, 15 e 40 dias	33
Tabela 3 – Resposta máxima das curvas de angiotensina II obtidas das preparações de veias cava, mesentérica e porta dos grupos CTRL e AIA nos tempos 4, 15 e 40 dias	36
Tabela 4 – Resposta máxima e valores de pEC_{50} de preparações obtidas da veia cava para as curvas de noradrenalina dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores	39
Tabela 5 – Resposta máxima e valores de pEC_{50} de preparações obtidas da veia femoral para as curvas de noradrenalina dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores.....	42
Tabela 6 – Resposta máxima e valores de pEC_{50} de preparações obtidas da veia mesentérica para as curvas de noradrenalina dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores	45
Tabela 7 – Resposta máxima e valores de pEC_{50} de preparações obtidas da veia porta para as curvas de noradrenalina dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores	48
Tabela 8 – Resposta máxima de preparações obtidas da veia cava para as curvas de angiotensina II dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores	51
Tabela 9 – Resposta máxima de preparações obtidas da veia mesentérica para as curvas de angiotensina II dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores	54
Tabela 10 – Resposta máxima de preparações obtidas da veia porta para as curvas de angiotensina II dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores	56
Tabela 11 – Resposta máxima e pEC_{50} de preparações obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (CTRL) e artrite (AIA) aos 15 dias para curvas de angiotensina II e noradrenalina na presença de 1400W.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina
AIA – artrite induzida por adjuvante
Ang II – angiotensina II
AR – artrite reumatoide
AT1 – receptor de angiotensina II tipo 1
BH4 – tetrahidrobiopterina
CIA – artrite induzida por colágeno
COX-1 – ciclooxigenase 1
COX-2 – ciclooxigenase 2
CTRL – controle
ECA – enzima conversora de angiotensina
EDHF – fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial
FAD - dinucleótido de flavina e adenina
FMN - mononucleótido de flavina
GCs - guanilato ciclase solúvel
GMPc - monofosfato cíclico de guanosina
IL-1 β – interleucina 1 β
IL-6 – interleucina 6
iNOS – óxido nítrico sintase endotelial
MMP-9 – metaloproteinase 9
NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO – óxido nítrico
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
NOR – noradrenalina
O₂⁻ - ânion superóxido
ONOO⁻ - peroxinitrito
PCR – proteína C reativa
PGE-2 – prostaglandina E2
SRA – sistema renina-angiotensina
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Artrite reumatoide	17
1.2 Manifestações cardiovasculares da artrite	18
1.3 Territorialidade das manifestações cardiovasculares da artrite	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Grupos experimentais e diagrama experimental	26
3.2 Artrite Induzida Por Adjuvante (AIA)	27
3.3 Avaliação das manifestações articulares das patas	27
3.4 Coleta do material	27
3.5 Reatividade vascular	28
3.6 Determinação da proteína c-reativa (PCR)	29
3.7 Análise dos resultados	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Massa corporal e dimensões das patas	30
4.2 Proteína c-reativa	30
4.3 Reatividade vascular	31
4.3.1 Influência da AIA sobre as respostas à NOR nos diferentes tempos pós-indução.....	31
4.3.2 Influência da AIA sobre as respostas à angiotensina II nos diferentes tempos pós-indução	34
4.3.3 Participação do NO e prostanoídes nas modificações das respostas das veias à noradrenalina induzidas pela AIA	36
4.3.3.1 Veia cava	36
4.3.3.2 Veia femoral	39
4.3.3.3 Veia mesentérica	42
4.3.3.4 Veia porta	45
4.3.4 Participação do NO e prostanoídes nas modificações das respostas das veias à angiotensina II induzidas pela AIA	49
4.3.4.1 Veia cava	49
4.3.4.2 Veia mesentérica	52

4.3.4.3 Veia porta.....	54
4.3.5 Participação da iNOS nas modificações das respostas induzidas pela AIA nas veias cava, mesentérica e porta à angiotensina II e na veia femoral à noradrenalina.....	56
5 DISCUSSÃO	58
6 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO A - Carta de aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Marília/CEUA-FAMEMA	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória multissistêmica crônica cuja sua etiologia exata ainda não está totalmente estabelecida (MATEEN *et al.*, 2016). Classicamente, a AR é caracterizada pela sinovite bilateral e erosiva que geralmente acomete articulações periféricas, cujas principais alterações ocorrem em estruturas articulares e tendinosas. Cabe ressaltar que as manifestações articulares da AR são variáveis, podendo ocasionar desde danos articulares mínimos e de curta duração até manifestações mais graves, com deformidades articulares progressivas chegando à incapacidade funcional (SANGHA, 2000; MULLER-LADNE, 2006). Sua prevalência em todo o mundo é cerca de 0,5–1,0%, podendo ocorrer em qualquer idade, mas com predomínio entre os 35-50 anos. Além disso, a incidência em mulheres é maior do que em homens, na razão de 3:1 (CHUNG *et al.*, 2016).

A forte interação de fatores genéticos e mecanismos epigenéticos, dificulta a compreensão da etiologia da AR. Têm sido propostos que fatores ambientais como exposição ao tabaco, podem contribuir para o desencadeamento da AR em indivíduos geneticamente predispostos, sobretudo do sexo feminino. Além disso, uma desregulação da resposta imune inata e adaptativa somada a interação de diferentes mediadores e componentes celulares, bem como autoimunidade local ou sistêmica mediada por autoanticorpos podem desempenhar um papel importante na patogênese da doença. Todos esses fatores estão envolvidos em diferentes estágios da doença, desde as primeiras manifestações clínicas (DEANE, et al, 2017; CROIA et al, 2019).

O estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na AR pressupõe alguns desafios metodológicos, logo, esse conhecimento está ainda em construção. Os modelos experimentais de AR são vastamente utilizados para estudar a progressão e patogênese da artrite. Esses modelos compartilham diversas semelhanças com a doença desenvolvida por seres humanos e, dessa forma, são fundamentais para a exploração dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da inflamação relacionada à AR. Nesse sentido, são muito utilizados pela indústria farmacêutica na identificação de potenciais alvos terapêuticos e no desenvolvimento de fármacos para o tratamento da AR. Isso porque permitem abordagens metodológicas que não poderiam ser realizados em seres humanos (BENDELE, 2001; GENG *et al.*, 2020). No entanto, apesar de uma variedade de modelos desenvolvidos em diferentes espécies animais, não existe um modelo experimental de artrite que reproduza

exatamente os mecanismos fisiopatológicos da AR. Com isso, a extrapolação de dados obtidos em modelos experimentais para o ser humano deve ser feita com parcimônia.

Entre os diversos modelos experimentais de AR já estabelecidos, temos a artrite induzida por adjuvante (AIA), caracterizado por um início rápido e progressão à uma inflamação poliarticular, que resulta numa inflamação aguda sistêmica mediada por imunocomplexos, seguida de resposta imune mediada por células T. Os animais submetidos à AIA manifestam sintomas como inchaço das articulações, infiltração de linfócitos e degradação da cartilagem. Esses sinais surgem por volta de 15 dias após a indução e, com o decorrer desse processo inflamatório, evoluem para malformações articulares permanentes, incluindo anquilose. (ASQUITH *et al.*, 2009; CHOUDHARY, 2018).

Figura 1 – Patas posteriores de ratos da linhagem Wistar apresentando manifestações articulares do modelo experimental de artrite induzida por adjuvante (à direita) em comparação ao controle (esquerda).



Fonte: Material elaborado pela própria autora.

1.2 Manifestações cardiovasculares da artrite

Além do acometimento poliarticular, o processo inflamatório relacionado à AR pode tornar-se sistêmico e, dessa forma, promover manifestações extra-articulares em qualquer período durante o curso da doença. Estas manifestações extra-articulares são influenciadas pela intensidade e duração do processo inflamatório, assim como pela ação de fármacos anti-reumáticos (GALARRAGA *et al.*, 2010; PRETE *et al.*, 2011). Entre as manifestações extra-articulares já descritas, destacam-se as manifestações oculares (xerofthalmia, episclerite, esclerite e queratite ulcerosa); cutâneas (nódulos reumatóides,

manifestações neurológicas); cardíacas (miocardites); hematológicas (anemia), vasculares (vasculites) e pulmonares (ITTY, 2008; ZIEMER, 2016; CHANDRASHEKARA, 2017). Apesar destas manifestações extra-articulares já terem sido muito estudadas, ainda não existe um consenso quanto à definição e à classificação das mesmas (PRETE *et al.*, 2011).

Embora a etiologia da AR ainda permaneça desconhecida, diversos estudos demonstram que os portadores dessa doença apresentam risco de mortalidade prematura aumentado em 50%, com redução da expectativa de vida em média de 3 a 10 anos, quando comparados com a população em geral (SCHILLINGER *et al.*, 2005; MYASOEDOVA *et al.*, 2010;). Neste contexto, as manifestações extra-articulares da AR, especialmente as que acometem o sistema cardiovascular, possuem grande impacto na morbimortalidade destes pacientes (YOUNG *et al.*, 2007; SHERINE, 2008; KAPLAN, 2010; MASOOLEH *et al.*, 2016). A prevalência de doenças cardiovasculares na AR foi descrita como comparável ao do diabetes mellitus tipo II (VAN HALM, 2009; KHAN *et al.*, 2010; GUALTIEROTTI, 2016).

No estudo das manifestações cardiovasculares da AR, um tecido em especial chama a atenção: o endotélio vascular. Esse tecido tem um papel importante na fisiologia cardiovascular, assim como nos processos fisiopatológicos que se desenvolvem nesse sistema. O endotélio vascular desempenha suas funções através da liberação de diferentes mediadores, dentre os quais, o óxido nítrico (NO) e os prostanoídes.

O NO pode ser sintetizado por três diferentes isoformas de óxido nítrico sintase (NOS): neuronal (nNOS ou NOS I), encontrada principalmente em células neuronais centrais e periféricas; induzível (iNOS ou NOS II), encontrada em macrófagos, mas também pode ser induzida em diversos tecidos; endotelial (eNOS ou NOS III), que se expressa principalmente em células endoteliais. As eNOS e nNOS são consideradas constitutivas, enquanto a iNOS é considerada induzível, ou seja, tem sua expressão induzida por mediadores inflamatórios e, uma vez expressa, permanece constantemente ativa das concentrações intracelulares de cálcio. Todas as isoformas utilizam L-arginina como substrato e oxigênio molecular e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como co-substratos. Também utilizam como cofatores o dinucleótido de flavina e adenina (FAD), o mononucleótido de flavina (FMN) e a tetrahydrobiopterina (BH₄) (FÖRSTERMANN *et al.*, 2012; SHU *et al.* 2015).

O NO derivado do endotélio, produzido sobretudo por eNOS, desempenha funções biológicas importantes na regulação do fluxo sanguíneo e do tônus vascular, atuando como vasodilatador, mediador anti-inflamatório e supressor da proliferação, da migração das

células musculares lisas e da interação dos leucócitos com o endotélio (SHU *et al.*, 2015). Além disso, sabe-se que o NO liberado pelas células endoteliais promove vasodilatação em todos os tipos de vasos sanguíneos, por meio do estímulo da guanilato ciclase solúvel (GCs), que leva ao aumento do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) nas células musculares lisas. Com isso, o NO é considerado um importante sistema endógeno que contrabalança a vasoconstrição produzida pelo sistema nervoso simpático e pelo sistema renina-angiotensina (FÖRSTERMANN *et al.*, 1986; LI *et al.*, 2000)

A inflamação sistêmica é relatada como maior preditor de mortalidade em pacientes com AR, sobretudo quando são levadas em consideração as comorbidades cardiovasculares (YOUNG, 2007; MOURA, 2012). Citocinas circulantes, sobretudo as interleucinas-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), todos provenientes do processo inflamatório articular, atuam sobre o endotélio promovendo a inflamação deste tecido (GONZALEZ-GAY, 2005). Nesse sentido, as células endoteliais são os primeiros componentes do sistema vascular a sofrer as consequências dos produtos oriundos do processo inflamatório relacionado a AR. Com isso, pode haver prejuízo nas importantes funções que o endotélio exerce, por meio da produção desequilibrada de diversos mediadores, sobre a regulação do tônus vascular, da adesão leucocitária à parede vascular, além da atividade plaquetária e antitrombótica (BAHIA *et al.*, 2006).

O prejuízo da atividade do endotélio vascular, denominado genericamente por disfunção endotelial, aparentemente precede o aparecimento das doenças cardiovasculares induzidas pela AR. Isto porque, para que ocorram as lesões cardiovasculares, o endotélio passa a expressar moléculas de adesão que permitem a ativação e a aderência de leucócitos à sua superfície vascular, propiciando assim eventos pró-inflamatórios e proliferativos, bem como eventos pró-trombóticos (BAHIA *et al.*, 2006; VERSARI *et al.*, 2009). Pode-se afirmar, com base nisso, que o comprometimento da função endotelial é condição permissiva para as lesões vasculares.

Os mecanismos fisiopatológicos que levam a disfunção endotelial relacionada à AR ainda não estão totalmente compreendidos. Todavia, esse processo parece ser o resultado da ação prolongada das citocinas inflamatórias sobre o endotélio vascular, agravada pela predisposição genética e fatores de risco cardiovasculares clássicos (GONZALEZ-GAY, 2005; GONZALEZ-GAY, 2012). A ação destas citocinas sobre o endotélio leva a um estado inflamatório acompanhado de uma produção de radicais livres que excede as capacidades antioxidantes desses tecidos, condição essa denominada de estresse oxidativo. Por sua vez, o aumento na produção destes radicais no endotélio vascular ocorre por diversos

mecanismos, entre os quais, o aumento da expressão/atividade de NADPH oxidases e outras enzimas que sintetizam o ânion superóxido (O_2^-) (BERGHOLM, 2002). Radicais livres também podem ser produzidos no endotélio quando existe indução maciça da isoforma induzível da enzima iNOS, como consequência da ação de citocinas inflamatórias. Quando em atividade, essa grande quantidade de enzimas promove uma depleção local da BH_4 , levando a eNOS a atuar de forma desacoplada, produzindo assim o O_2^- ao invés do NO (SAKUTA *et al.*, 2010). Por fim, o O_2^- produzido em excesso no endotélio vascular reage com o NO, dando origem ao peroxinitrito ($ONOO^-$), outro radical livre contra o qual não existem defesas antioxidantes naturais (BARBOSA, 2010). Nesse sentido, o estresse oxidativo resulta na diminuição da biodisponibilidade do NO e, por consequência, na disfunção endotelial.

A disfunção endotelial é observada em pacientes portadores da AR, assim como em diversos modelos experimentais de artrite, inclusive na AIA. Esse processo fisiopatológico é facilmente caracterizado por modificações das respostas vasculares a agonistas vasoconstritores ou vasodilatadores. Nesse contexto, já foi demonstrado que aortas de animais submetidos a modelos experimentais de artrite apresentam redução das respostas vasodilatadores da acetilcolina (ACh), o que sugere fortemente um prejuízo da função endotelial mediada pelo NO. No caso de animais AIA, sugere-se que essa disfunção endotelial seja resultado de um aumento da produção local de espécies reativas de oxigênio causado tanto pelo aumento da expressão da enzima NADPH oxidase quanto pela atuação de eNOS desacopladas (HARUNA *et al.* 2006, 2007). Outros autores sugerem ainda que o aumento do estresse oxidativo e a consequente disfunção endotelial que ocorre neste modelo de artrite, envolve ativação do sistema renina-angiotensina (SRA). De fato, observou-se um aumento na expressão de receptores AT_1 , assim como na atividade enzimática da enzima conversora de angiotensina (ECA) em aorta de animais acometidos pela AIA. Além disso, foi demonstrado que o bloqueio dos receptores AT_1 é capaz de reverter a disfunção endotelial nestes animais (SAKUTA *et al.*, 2010).

Paralelamente, foi verificado que a disfunção vascular no modelo AIA também envolve mecanismos relacionados aos prostanoídes, além de componentes da musculatura lisa vascular (EGAN *et al.*, 2004). Cabe ressaltar que os prostanoídes pertencem à superfamília dos eicosanóides, que são compostos lipídicos bioativos constituídos por cadeias de 20 carbonos. Esses compostos são sintetizados pela fosfolipase A2 a partir do ácido araquidônico, que é derivado de fosfolípidos de membrana celular, em resposta a

estímulos fisiológicos, patológicos ou farmacológicos. O ácido araquidônico livre é então convertido a prostanoídes intermediários pela ação das ciclooxigenases (COX). As COX podem ser constitutivas, denominadas ciclooxigenases 1 (COX-1), que exerce funções fisiológicas importantes como agregação plaquetária. Por outro lado, existe a ciclooxigenases 2 (COX-2), uma enzima que pode ser induzida na maioria dos tecidos por agentes pró-inflamatórios como as citocinas sendo, portanto, atribuída como responsável pela maior parte da produção de prostanoídes durante a inflamação. Todavia a COX-2 pode ser expressa constitutivamente em alguns tecidos como o endotélio vascular (APPLEBY *et al.*, 1994; BOS *et al.*, 2004; YAGAMI *et al.*, 2016).

Em condições fisiológicas, existe um delicado equilíbrio entre os prostanoídes vasodilatadores e vasoconstritores. Contudo, a liberação de prostanoídes vasoconstritores derivados do endotélio pode neutralizar o efeito vasodilatador do NO, podendo resultar em um quadro de disfunção endotelial devido ao desequilíbrio desses mediadores que regulam o tônus vascular. Inclusive, esse envolvimento tanto dos prostanoídes quanto do NO na regulação do tônus de vasos de resistência já foi demonstrado em porcos em condições de repouso e exercício. (MERKUS *et al.*, 2006; FÉLÉTOU *et al.*, 2010).

Os prostanoídes inflamatórios derivados da COX estão cada vez mais sendo reconhecidos como reguladores críticos para imunidade e doenças imunológicas (HARIZI, 2015). Cabe ressaltar que na AR, além da disfunção endotelial oriunda da redução da biodisponibilidade do NO, pode ocorrer também um agravamento das manifestações vasculares da doença por um aumento da síntese de prostanoídes. De fato, tem sido observado que citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de COX-2 na microcirculação cerebral de ratos (LACROIX e RIVEST, 1998), assim como em cultura de células endoteliais humanas (TSAI *et al.*, 2018)

1.3 Territorialidade das manifestações cardiovasculares da artrite

Por questões de facilidade metodológica, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas manifestações cardiovasculares da artrite têm sido explorados de forma mais detalhada em artérias de condutância. Cabe ressaltar, todavia, a necessidade de ampliar esse olhar para outros leitos vasculares, com outras características morfofuncionais e distintos papéis fisiológicos (HILL *et al.*, 2001). Alguns autores descrevem que essas alterações vasculares que ocorre em pacientes com AR é generalizada, detectável até mesmo ao nível da microcirculação cutânea e coronariana (DATTA *et al.*, 2007; FACINNI *et al.*, 2016).

Corroborar esse cuidado o fato de já ter sido observado que os impactos da AR na função endotelial podem ocorrer de forma distinta entre os leitos micro e macrovasculares de pacientes com AR (SANDOO *et al.*, 2011). De fato, o tratamento com bloqueadores do TNF- α preservou a função do endotélio microvascular, mas não a função do endotélio macrovascular (SANDOO, 2012). Por conta disso, estes mesmos autores reforçaram a necessidade da investigação dos acometimentos endoteliais tanto em território micro quanto macrovascular.

Também em modelos animais estas diferenças regionais mostram-se pertinentes. Recentemente foi sugerido que a disfunção endotelial em leitos microvasculares antecede a que ocorre no leito macrovascular (TOTOSON *et al.*, 2015). Com isso, estes autores apontam que a avaliação da função endotelial nos diferentes leitos microvasculares pode ter valor no diagnóstico precoce das doenças cardiovasculares associadas à artrite. Em nosso grupo de pesquisa observou recentemente um expressivo aumento da presença de iNOS, contudo, isso ocorreu tanto na aorta quanto na microcirculação renal e cardíaca de camundongos submetidos ao modelo de artrite induzida por colágeno (TOZZATO *et al.*, 2016).

Um leito particularmente negligenciado nos estudos que avaliam as repercussões vasculares da artrite é o venoso. De fato, os estudos que avaliam as manifestações vasculares tanto da AR quanto da artrite experimental desenvolvidos até o momento enfocam exclusivamente os leitos arteriais. Todavia, essa visão centrada em artérias é reducionista e não permite uma compreensão plena do sistema cardiovascular. Com efeito, entendemos que a artrite pode ter repercussões sobre o leito venoso, podendo resultar em modificações no padrão de respostas das grandes veias centrais à diversos agonistas vasoconstritores. Além disso, AIA também pode levar a modificações no padrão de relaxamento das grandes veias centrais à ACh, contudo, o estudo de respostas de relaxamento em veias é particularmente difícil. A esse respeito, nosso grupo de pesquisa tem encontrado dificuldade para estabelecer uma contração basal sustentável em veias, que permita uma clara evidência de respostas induzidas por fármacos vasodilatadores.

Entendemos que a exploração desta vertente preenche uma importante lacuna de conhecimento, além de permitir o aprofundamento do entendimento acerca da participação do leito venoso nas modificações circulatórias causadas pela artrite. Neste contexto, é cabível salientar que modificações endoteliais e/ou subendoteliais desencadeadas pela artrite no leito venoso podem alterar a complacência desses vasos e, por conseguinte, modificar a dinâmica circulatória. Além disso, alguns mecanismos endoteliais envolvidos na regulação

do tônus vascular podem, ao mesmo tempo, regular a coagulação sanguínea (BEINSBERGER, 2014; KIM, 2013). Dessa forma, modificações nas ações de agonistas vasoconstritores podem, por sua vez, indicar modificações em outros processos fisiopatológicos endoteliais com importantes implicações circulatórias.

A exploração das manifestações da artrite no leito venoso implica também em desafios. O primeiro deles refere-se à escolha do modelo experimental. Optamos pelo modelo AIA pois este pode ser desenvolvido em ratos, um animal de tamanho adequado para a obtenção de veias a serem montadas em banho de órgãos. Essa questão metodológica influenciou na escolha do modelo, contudo, o fato da literatura trazer muitas evidências de manifestações da AIA em aortas de ratos (ÇINAR *et al.*, 1998; CAN *et al.*, 2001; HARUNA *et al.*, 2006, 2007; SAKUTA *et al.*, 2010; MACKENZIE *et al.*, 2013; TOZZATO *et al.*, 2016) forneceu maior embasamento a essa escolha. Outro desafio foi estabelecer o momento, ao longo da evolução do modelo, em que os animais deveriam ser estudados. O modelo AIA é conhecidamente autolimitada, ou seja, regride espontaneamente a partir do 30º dia pós-indução (MOSSIAT *et al.*, 2015). Com isso, a escolha do momento correto para realizar as análises é crucial para o sucesso do estudo. Essa preocupação tem embasamento em nossos estudos anteriores que mostram a evolução temporal de diversas manifestações extra-articulares da AIA. Optamos então por estudar os animais em dois momentos distintos: no 15º dia pós indução, quando o processo inflamatório está mais exacerbado, e no 40º dia pós indução, momento em que a maioria dos estudos em aorta foram realizados e que o processo inflamatório já mostra sinais de auto resolução (PITA *et al.*, 2020).

Foi necessário também escolher o leito venoso a ser avaliado. Na falta de referências oferecidas pela literatura, nos fundamentamos em estudos próprios feitos com exercício físico. Nosso grupo de pesquisa tem relatado que as modificações de respostas de veias a diversos agonistas vasoconstritores causadas pelo exercício físico variam muito a depender do leito estudado (CHIES *et al.*, 2010). Na verdade, não podemos considerar os diferentes territórios que integram o leito venoso como iguais, posto que exercem funções circulatórias distintas. Como exemplo, veias femorais e cava drenam o sangue proveniente da circulação musculocutânea presente nos membros posteriores dos animais. Esse sangue é mobilizado principalmente pela contração muscular e uma constrição exagerada desses vasos poderia impor uma resistência inadequada ao fluxo sanguíneo, prejudicando o retorno venoso (ROWELL, 1993). Por outro lado, as veias mesentéricas e porta drenam sangue da circulação esplâncnica, um compartimento de capacitância que durante situações como de luta ou fuga disponibiliza sangue ao coração mediante, em parte, à venoconstrição

(HAINSWORTH; DRINKHILL, 2006; ROTHE, 2006). Nesse sentido, optamos por estudar veias presentes nesses dois territórios venosos, que exercem papéis distintos no retorno venoso, buscando uma visão mais ampla das eventuais modificações de resposta nesse leito vascular.

Optamos, por fim, por estudar o impacto da AIA sobre as ações tanto da noradrenalina (NOR) quanto da angiotensina II (Ang II) nessas veias. Em experimentos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa observamos que as adaptações impostas pelo exercício físico sobre os mecanismos locais que modulam as respostas de veias femorais, jugulares e mesentéricas influenciavam as ações da Ang II, mas não da NOR (dados não publicados). Entendemos que modificações agonista-específicas também poderiam ocorrer nesses animais submetidos à AIA.

6 CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados podemos concluir que a AIA tem repercussões no leito venoso, uma vez que reduz as respostas contráteis das veias cava, femoral, mesentérica e porta. Essas modificações de resposta contrátil assumem características bastante particulares a depender do agonista. Na verdade, as modificações causadas pela AIA sobre as respostas à Ang II ocorrem de forma semelhante nas diversas veias estudadas, ao passo que as modificações de resposta à NOR restringiram-se à veia femoral. Com isso podemos afirmar que essas modificações de resposta causadas pela AIA são tanto agonista-específicas quanto território-específicas. Os dados apresentados, nos permitem concluir também que essas modificações de resposta causadas pela AIA são transitórias, ou seja, ocorrem na fase mais precoce do modelo, quando o processo inflamatório é mais intenso, e tendem a desaparecer nas fases mais tardias. Essa transitoriedade não diminui a importância desse fenômeno uma vez que a AR é uma doença crônica com recorrentes episódios de exacerbação inflamatória articular. Assim, algo semelhante ao que foi observado no presente estudo pode ocorrer de forma intermitente nos portadores de AR. Os dados também nos permitem afirmar que as reduções de resposta observadas tanto frente à NOR quanto à Ang II decoram de um aumento da produção local de NO, sendo que nas veias cava, femoral e mesentérica, isso se dá por meio do aumento da expressão de iNOS. Por fim, sobretudo na fase mais precoce do modelo AIA, um mecanismo relaxante ainda não identificado pode contribuir com o NO na redução das respostas das veias estudadas à Ang II, mas não à NOR. Esse dado reforça mais uma vez que a disfunção contrátil observada apresenta particularidades a depender do território estudado.

REFERÊNCIAS

1. Abe C, Fujita K, Kikuchi E, Hirano S, Kuboki H, Yamashita A, Hashimoto H, Mori S, Okada M. Effects of alpha-linked galactooligosaccharide on adjuvant-induced arthritis in Wistar rats and type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Int J Tissue React* 2004; 26(3-4): 65-73.
- 2.
3. Akishita M, Horiuchi M, Yamada H, Zhang L, Shirakami G, Tamura K, Ouchi Y, Dzau VJ. Inflammation influences vascular remodeling through AT2 receptor expression and signaling. *Physiol Genomics* 2000; 24; 2(1): 13-20.
4. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357(3): 593-615.
5. An HJ, Tizaoui K, Terrazzino S, Cargnin S, Lee KH, Nam SW, Kim JS, Yang JW, Lee JY, Smith L, Koyanagi A, Jacob L, Li H, Shin JI, Kronbichler A. Sarcopenia in Autoimmune and Rheumatic Diseases: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci* 2020; 21(16):5678.
6. Appleby SB, Ristimäki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J*. 1994; 302(3): 723-727.
7. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol* 2009; 39: 2040-2044.
8. Badavi M, Khoshbaten A, Hajizadeh S. Decreased response of rat knee joint blood vessels to phenylephrine in chronic inflammation: involvement of nitric oxide. *Exp Physiol* 2000; 85(1): 49-55.
9. Bahia L, Aguiar LGK, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. O Endotélio na Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50(2): 291-303.
10. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr* 2010; 23(4):629-643.
11. Beinsberger J, Heemskerk JW, Cosemans JM. Chronic arthritis and cardiovascular disease: altered blood parameters give rise to a prothrombotic propensity. *Semin Arthritis Rheum*. 2014 Dec;44(3):345-52.
12. Bendele AM. Models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskel Neuron Interact* 2001; 1(4): 377-385.
13. Bergholm R, Leirisalo-Repo M, Vehkavaara S, Mäkimattila S, Taskinen MR, Yki-Järvinen H.. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1637–41.
14. Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(7): 1187-205.

15. Can, C.; Cinar, M.G.; Kosay, S.; Evinç, A. Vascular endothelial dysfunction associated with elevated serum homocysteine levels in rat adjuvant arthritis: effects of vitamin E administration. *Life. Sci* 2002; 71(4): 401-410.
16. Chandrashekara S, Shobha V, Dharmanand BG, Jois R, Kumar S, Mahendranath KM, Haridas V, Prasad S, Singh Y, Daware MA, Swamy A, Subramanian R, Somashekar SA, Shanthappa AM, Anupama KR. Reduced incidence of extra-articular manifestations of RA through effective disease control: Karnataka Rheumatoid Arthritis Comorbidity (KRAC) study. *Int J Rheum Dis* 2017; 20(11): 1694-1703
17. Cheng ZJ, H. Vapaatalo E. Mervaala. Angiotensina II e inflamação vascular. *Med. Sci. Monit* 2005; 11(6): RA194-RA205.
18. Chies AB, De Oliveira PB, Rossignoli PS, Baptista RF, de Lábio RW, Payão SLM. Prostanoids counterbalance the synergism between endothelin-1 and angiotensin II in mesenteric veins of trained rats. *Peptides* 2017; 88: 67-73.
19. Chies AB, De Souza Rossignoli P, Daniel EF. Exercise increases the angiotensin II effects in isolated portal vein of trained rats. *Peptides* 2010; 31(5): 883-888.
20. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2018; 40(3): 193-200.
21. Chung IM, Ketharnathan S, Thiruvengadam M, Rajakumar G. Rheumatoid arthritis: the stride from research to clinical practice. *Int J Mol Sci* 2016; 17: E900.
22. Çinar MG, Can C, Ulker S, Gök S, Coker C, Soykan N, et al. Effect of vitamin E on vascular responses of thoracic aorta in rat experimental arthritis. *Gen Pharmacol* 1998; 31(1):149-53.
23. Croia C, Bursi R, Sutera D, Petrelli F, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2019, 37(3): 347-357.
24. Dattaa D, Ferrella WR, Sturrocka RD, Jadhavb ST, Sattar N. Inflammatory suppression rapidly attenuates microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis* 2007;192(2): 391–395.
25. Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2017; 31(1):3-18.
26. Egan CG, Lockhart JC, Ferrell WR. Pathophysiology of vascular dysfunction in a rat model of chronic joint inflammation. *Physiol* 2004; 557(2): 635–643.
27. Faccini A, Kaski JK, Camici PG. Coronary microvascular dysfunction in chronic inflammatory rheumatoid diseases. *Euro Heart Jour* 2016; 37, 1799–1806.
28. Félétou M, Verbeuren TJ, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br J Pharmacol.* 2009; 156(4): 563-574.

29. Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Vasoconstrictor prostanoids. *Pflügers Arch* 2010; 459(6): 941-50.
30. Förstermann U, Mülsch A, Böhme E, Busse R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res* 1986; 58: 531– 538.
31. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; 33(7): 829-837d.
32. Galarraga B, Khan F, Kumar P, Pullar T, Belch JJ. C-reactive protein: the underlying cause of microvascular dysfunction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2008; 47(12): 1780-84
33. Galarraga B, Belch JJ, Pullar T, Ogston S, Khan F. Clinical improvement in RA is associated with healthier microvascular function in patients who respond to anti-rheumatic therapy. *J Rheumatol* 2010; 37: 521–8.
34. Geng D, Wang L, Liu NQ, Qin J. Rheumatoid pain models in rodents and the application of dynamic weight-bearing test. *Digit Med* 2020; 6:13-9
35. Gómez-SanMiguel AB, Gomez-Moreira C, Nieto-Bona MP, Fernández-Galaz C, Villanúa M, Martín AI, et al. Formoterol decreases muscle wasting as well as inflammation in the rat model of rheumatoid arthritis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 310: E925-E937.
36. Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 2005;35: 8-17, 2005.
37. González-Gay MA, González-Juanatey C. Inflammation, endothelial function and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2012; 14:122.
38. Gualtierotti R. Understanding cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: Still a long way to GO. *Atherosclerosis* 2016; 256: (1-2).
39. Gunnnett CA, Lund DD, Mcdowell AK, Faraci FM. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(8): 1617-1622.
40. Hainsworth R, Drinkhill MJ. Counterpoint: active venoconstriction is not important in maintaining or raising end-diastolic volume and stroke volume during exercise and orthostasis. *J Appl Physiol* 2006; 101(4): 1264-1270.
41. Harizi H. Epigenetic regulations of inflammatory cyclooxygenase-derived prostanoids: molecular basis and pathophysiological consequences. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 841097.
42. Haruna Y, Morita Y, Komai N, Yada T, Sakuta T, Tomita N, et al. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: vascular superoxide production by NAD(P)H

oxidase and uncoupled endothelial nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 2006; 54(6): 1847-55.

43. Haruna Y, Morita Y, Yada T, Satoh M, Fox DA, Kashihara N. Fluvastatin reverses endothelial dysfunction and increased vascular oxidative stress in rat adjuvant induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56(6): 1827-35.

44. Hill CE, Phillips JK, Sandow SL: Heterogeneous control of blood flow amongst different vascular beds. *Med Res Rev* 2001; 21: 1-60.

45. Itty S, Pulido JS, Bakri SJ, Baratz KH, Matteson EL, Hodge DO. Anti-cyclic citrullinated peptide, rheumatoid factor, and ocular symptoms typical of rheumatoid arthritis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2008; 106:75–81.

46. Kaplan, MJ. Cardiovascular complications of Rheumatoid Arthritis - Assessment, prevention and treatment. *Rheum Dis Clin North Am* 2010; 36(2): 405–26.

47. Khan F, Galarraga B, Belch JJ. The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; (5): 253-61.

48. Kim CS, Schneeweiss S, Liu J, Solomon DH. The Risk of Venous Thromboembolism in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res* 2013; 65(10): 1600–07.

49. Kontny E, Rudnicka W, Kowalczewski J, Marcinkiewicz J, Maslinski W. Selective inhibition of cyclooxygenase 2–generated prostaglandin E2 synthesis in rheumatoid arthritis synoviocytes by taurine chloramine. *Arthritis Rheum* 2003, 48: 1551-1555.

50. Lacroix S and Rivest S. Effect of Acute Systemic Inflammatory Response and Cytokines on the Transcription of the Genes Encoding Cyclooxygenase Enzymes (COX-1 and COX-2) in the Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* 1998; 70: 452-466.

51. Lamb VL, Schwartz AJ, Rohn WR, Kaiser L. Cyclooxygenase inhibitors depress norepinephrine constriction of rat abdominal, but not thoracic, aorta. *Euro Jour of Pharmacol* 1994; 256(2): 221-226.

52. Lee DK, Kim HJ, Lee DH. Incidence of Deep Vein Thrombosis and Venous Thromboembolism following TKA in Rheumatoid Arthritis versus Osteoarthritis: A Meta-Analysis. *Plos One* 2016; 11(12): 1-10.

53. Li, H. and Förstermann, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol* 2000; 1 (190): 244-254.

54. Masooleh IS, Zayeni H, Haji-Abbasi A, Azarpira M, Hadian A, Hassankhani A, Ghavidel Parsa B. Cardiac involvement in rheumatoid arthritis: A cross-sectional study in Iran. *Indian Heart J* 2016; 68(3):332-5.

55. MacKenzie A, Dunning L, William R. Ferrell, John C. Lockhart. Angiotensin II Type 1 receptor blockade protects endothelium-derived hyperpolarising factor-mediated relaxation in a rat model of monoarthritis, *Life Sciences* 2013; 92(23): 1131-1137.

56. Maki-Petaja KM, Cheriyan J, Booth AD, Hall FC, Brown J, Wallace SML. Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction. *Int J Cardiol* 2008; 129(3): 399-405.
57. Martín AI, Castellero E, Granado M, López-Menduiña M, Villanúa MA, López-Calderón A. Adipose tissue loss in adjuvant arthritis is associated with a decrease in lipogenesis, but not with an increase in lipolysis. *J Endocrinol* 2008; 197(1):111-9.
58. Mateen S, Zafar A, Moina S, Khanc AQ, Zubaird S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 2016; 455: 161-71.
59. Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells *Trends Biochem Sci* 1997; 22(12): 477-481
60. McNeill E, Channon KM. The role of tetrahydrobiopterin in inflammation and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 2012; 108(5): 832-9.
61. Merkus D, Sorop O, Houweling B, Boomsma F, van den Meiracker AH, Duncker DJ. NO and prostanoids blunt endothelin-mediated coronary vasoconstrictor influence in exercising swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(5): H2075-81.
62. Moura MC, Zakszewski PTS, Silva MBG, Skare TL. Perfil dos pacientes com manifestações extra-articulares de artrite reumatoide de um serviço ambulatorial em Curitiba, Sul do Brasil. *Rev Bras Reumatol* 2012; 52(5), 686-94.
63. Mossiat, C., Laroche, D., Prati, C. et al. Association between arthritis score at the onset of the disease and long-term locomotor outcome in adjuvant-induced arthritis in rats. *Arthritis Res Ther* 2015; 17:184.
64. Muller-Ladne U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: The molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Prac Rheumatol* 2006; 1(2): 102-10.
65. Myasoedova E, Davis JM, Crowson CS, Gabriel SE. Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality. *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12: 379–85.
66. Pang L, Knox AJ. Effect of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma on the induction of cyclo-oxygenase-2 in cultured human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1997; 121(3): 579-587.
67. Peng A, Lu X, Huang J, He M, Xu J, Huang H, Chen Q. Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promote TREM-1 expression in monocytes via COX-2/PGE2 pathway. *Arthritis Res Ther* 2019; 21(1): 169.
68. Pita LM, Spadella MA, Montenote MC, Oliveira PB, Chies AB. Repercussions of adjuvant-induced arthritis on body composition, soleus muscle, and heart muscle of rats. *Braz J Med Biol Res* 2020; 53(3): e8969.

69. Prati C, Berthelot A, Kantelip B, Wendling D, Demougeot C. Treatment with the arginase inhibitor Nw-hydroxy-nor-L-arginine restores endothelial function in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012; 16:R130.
70. Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmunity Rev* 2011; 11(2): 123–31.
71. Rapoport RM. Potentiation of norepinephrine-induced contraction by primary prostaglandin receptor activation in rat aorta, *Euro Jour of Pharmacol* 1993; 243(2): 207-210.
72. Reynolds SI, Williams AS, Williams H, Smale S, Stephenson HJ, Amos N, et al., Contractile, but not endothelial, dysfunction in early inflammatory arthritis: a possible role for matrix metalloproteinase-9. *Br J Pharmacol* 2012; 167 (3): 505-514.
73. Rocha OM, Batista AA, Maestá N, Burini RC, Laurindo IM. Sarcopenia da caquexia reumatoide: conceituação, mecanismos, consequências clínicas e tratamentos possíveis. *Rev. Bras. Reumatol* 2009; 49(3): 288-301.
74. Rothe CF. Point: active venoconstriction is/is not important in maintaining or raising end-diastolic volume and stroke volume during exercise and orthostasis. *J Appl Physiol* 1985 2006; 101(4): 1262-1270.
75. Rowell, L. B. Human cardiovascular control. *New York: Oxford University Press*, 1993.
76. Sakaguchi Y, Shirahase H, Ichikawa A, Kanda M, Nozaki Y, Uehara Y. Effects of selective iNOS inhibition on type II collagen-induced arthritis in mice. *Life Sci* 2004; 75(19): 2257-67.
77. Sakuta T, Morita Y, Satoh M, Fox DA, Kashihara N. Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis: effect of angiotensin receptor blockers. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 1319–1328.
- 78.
79. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K., Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(15): 7240-7244.
80. Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol* 1995; 114(6): 1171-1178.
81. Sandoo A, Carroll D, Metsios GS, Kitas GD, Veldhuijzen van Zanten JJCS. The association between microvascular and macrovascular endothelial function in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(3): R99.
82. Sandoo A, Kitas GD, Carroll D, Veldhuijzen van Zanten JJ. The role of inflammation and cardiovascular disease risk on microvascular and macrovascular endothelial function in

patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional and longitudinal study. *Arthritis Res Ther*, May 2012; 14(3): R117.

83. Sangha O. Epidemiology of the rheumatic diseases. *Rheumatology* 2000; 39(2).
84. Schillinger H, Exner H, Mlekusch W, et al. Inflammation and Carotid Artery Risk for Atherosclerosis Study (ICARAS). *Circulation* 2005; 111(17): 2203-2209.
85. Sherine GE. Cardiovascular Morbidity and Mortality in Rheumatoid Arthritis. *The Amer Jour of Medicine* 2008; 121(10): S9–S14.
86. Shu X, Keller TC, Begandt D, Butcher JT, Biwer L, Keller AS, Columbus L, Isakson, BE. Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *CMLS* 2015; 72(23): 4561-4575.
87. Totoson P, Maguin-Gat K, Nappey M, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Microvascular abnormalities in adjuvant-induced arthritis: relationship to macrovascular endothelial function and markers of endothelial activation. *Arthritis Rheum* 2015; 67(5):1203-1213.
88. Totoson P, Maguin-Gate K, Nappey M, Wendling D, Demougeot C. Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: Mechanistic Insights and Correlation with Circulating Markers of Systemic Inflammation. *Plos One* 2016;11(1): e0146744.
89. Tsai MH, Yang CM, Chang KT, Chuang CC, Lin WN, Jiang RS, Wu CH, Lee IT. Carbon monoxide ameliorates Staphylococcus aureus-elicited COX-2/IL-6/MMP-9-dependent human aortic endothelial cell migration and inflammatory responses. *Immunol Lett* 2018; 203:40-49.
90. Tozzato GPZ, Taiepeiro EF, Spadella MA, Marabini Filho P, de Assis MR, Carlos CP, Girol AP, Chies AB. Collagen-induced arthritis increases inducible nitric oxide synthase not only in aorta but also in the cardiac and renal microcirculation of mice. *Clin Experimen Immunolog* 2016; 183: 341-349.
91. Ulker S, Onal A, Hatip FB, Sürücü A, Alkanat M, Koşay S. Effect of nabumetone treatment on vascular responses of the thoracic aorta in rat experimental arthritis. *Pharmacol* 2000; 60(3): 136-142.
92. Van Halm VP, Peters MJ, Voskuyl AE, Boers M, Lems WF, Visser M, et al. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1395–400.
93. Versari D, Daghini E, Virdis A, Ghiadoni L. Endothelial Dysfunction as a Target for Prevention of Cardiovascular Disease. *Diabetes Care* 2009; 32(2): S314-21.
94. Yagami T, Koma H, Yamamoto Y. Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. *Mol Neurobiol* 2016; 53(7): 4754-71.
95. Young A. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Practice & Res Clin Rheumat* 2007; 21(5): 907–927.

96. Ziemer, M., Müller, A.-K., Hein, G., Oelzner, P. and Elsner, P. Incidence and classification of cutaneous manifestations in rheumatoid arthritis. *JDDG* 2016; 14: 1237-1246

ANEXOS

ANEXO A - Carta de aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Marília/CEUA-FAMEMA.

 SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO,
CIÊNCIA E TECNOLOGIA

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA
Comissão de Ética no Uso de Animais

Marília, 02 de Junho de 2017

Ilmo^(a) Sr.^(a)
Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies
Marília/SP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Marília/CEUA-FAMEMA, recebeu o Protocolo de Estudo nº 092/17, intitulado: "Efeitos da artrite induzida por adjuvante (AIA) sobre os mecanismos locais que participam do controle do tônus das veias e da coagulação sanguínea em ratos, na ausência ou na presença da galantamina", foi considerado **APROVADO "Ad Referendum"** após responder as pendências apontadas em Reunião Ordinária – 24/04/2017, de acordo com a Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008; Orientação Técnica Nº 8 de 18/03/2016 e suas Normativas que dispõem sobre a instalação e funcionamento das Comissões de Ética no Uso de Animais/CEUAS.

I - Título do Projeto:

- Efeitos da artrite induzida por adjuvante (AIA) sobre os mecanismos locais que participam do controle do tônus das veias e da coagulação sanguínea em ratos, na ausência ou na presença da galantamina

II - Número do Processo da CEUA referente à proposta de pesquisa ou de ensino avaliada e aprovada:

- 092/17

III - Nome do Pesquisador ou Professor Responsável pelo protocolo:

- Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies

IV - Finalidade da Proposta (ensino ou pesquisa científica):

- Pesquisa Científica

V - Vigência da Autorização:

- 02/06/17 à 03/2021

VI - Espécie/linhagem/raça:

- Ratos Wistar

VII - Número de Animais Autorizados:

- 320

VIII - Peso/idade:

- Aproximadamente 350g/12 semanas

IX - Sexo:

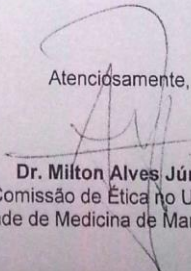
- Masculino

X - Origem do(s) animal (is), indicando informações sobre o fornecedor:

- Provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Marília/FAMEMA.

Sendo só para o momento, reiteramos protestos de consideração e apreço.

Atenciosamente,


Dr. Milton Alves Júnior
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Faculdade de Medicina de Marília/FAMEMA

Av. Monte Carmelo, 800 - Marília - S.P. - CEP: 17.519-030
Fone: (14) 3402 1744 - R. 1591 - Email: dirpos@famema.br