

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

GABRIELA PALMA ZOCHIO TOZZATO

**EFEITOS DA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AIA) SOBRE AS  
RESPOSTAS DA AORTA À ANGIOTENSINA II EM RATOS SUBMETIDOS OU  
NÃO À CASTRAÇÃO CIRÚRGICA**

BOTUCATU – SP  
2018

GABRIELA PALMA ZOCHIO TOZZATO

**EFEITOS DA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (AIA) SOBRE AS  
RESPOSTAS DA AORTA À ANGIOTENSINA II EM RATOS SUBMETIDOS OU  
NÃO À CASTRAÇÃO CIRÚRGICA**

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  
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Renato de Assis

BOTUCATU – SP  
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Tozzato, Gabriela Palma Zochio.

Efeitos da artrite induzida por adjuvante (AIA) sobre o balanço redox sistêmico, a função endotelial e as respostas da aorta de rato à Angiotensina II em ratos submetidos ou não à castração cirúrgica / Gabriela Palma Zochio Tozzato. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Agnaldo Bruno Chies  
Coorientador: Marcos Renato de Assis  
Capes: 21001006

1. Angiotensina II. 2. Artrite experimental. 3. Endotélio.  
4. Eicosanoides. 5. Testosterona.

Palavras-chave: Angiotensina II; Artrite experimental; EDHF; Eicosanoides; Testosterona.

Gabriela Palma Zochio Tozzato

Efeitos da artrite induzida por adjuvante (AIA) sobre as respostas da aorta à angiotensina II em ratos submetidos ou não à castração cirúrgica

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

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies - Presidente

---

Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Junior

---

Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Antoniali Silva

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Liliam Fernandes

Data da aprovação: 02/03/2018

Dedico este trabalho aos meus pais, **Márcia** e **Gilberto**, minha irmã **Cristine**, meu marido **Thiago**, meu anjo de quatro patas **Matilda** e à minha “segunda mãe” **Silmara**.

## AGRADECIMENTOS

À **CAPES**, pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de Doutorado para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu Orientador, **Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies**, pelo apoio, confiança e criteriosa orientação demonstrados ao longo destes seis anos de convivência (Mestrado e Doutorado) que foram determinantes na minha formação científica.

Ao meu Coorientador, **Prof. Dr. Marcos Renato de Assis**, pela visão e brilhantismo depositados. Obrigada por acreditar em nossa proposta, seus questionamentos e reflexões foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Angélica Spadella**, que sempre esteve disposta a me ajudar.

Aos funcionários dos Departamentos de Farmacologia e Embriologia da FAMEMA, **Priscilla, Alisson e Rosa**, pelo auxílio na execução dos experimentos e técnicas, na manutenção dos animais, assim como, pela amizade e por tornarem meus dias sempre mais felizes.

Às funcionárias do Núcleo de Atenção e Saúde em Cadeiras Básicas da FAMEMA, **Célia e D. Cida** pelo auxílio em minhas tarefas diárias e, acima de tudo, pela amizade.

Aos **Professores da Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências**, pelas disciplinas ministradas, que tanto contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho como para a minha formação nesta instituição.

Aos **funcionários da Secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, Davi e Garlane**, pela disponibilidade, prontidão e compreensão para resolução de questões burocráticas ao longo desses quatro anos.

Aos grandes amigos de Botucatu: **José Sérgio (Zé), Rodrigo, Mayara, Jéssica, Katiussia e Regina**, que sempre me ajudaram em tudo que precisei, me oferecendo desde moradia até o ombro amigo. Pessoas maravilhosas que tive a honra de conhecer e conviver,

obrigada por tornarem as minhas idas à Botucatu muito mais divertidas.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ciomar Aparecida Bersani Amado**, do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá - UEM, pela disponibilidade, pelo carisma e pelos ensinamentos na padronização da técnica de indução de artrite por adjuvante em ratos Wistar.

À **todos aqueles que partiram e deixaram saudades**. Acredito que o reencontro é apenas uma questão de tempo.

À **todos aqueles que cruzaram a estrada da minha vida**, deixando suas marcas. Seus nomes talvez não estejam citados aqui, mas com certeza estão gravados no meu coração.

“Conhecimento sem transformação não é sabedoria”.

(Paulo Coelho)

## RESUMO

A expectativa de vida diminui com artrite reumatoide (AR) devido ao aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares. Isto se deve, possivelmente, à disfunção endotelial resultante da intensa atividade inflamatória relacionada à AR. Evidências tem apontado para um possível envolvimento do sistema renina-angiotensina (SRA) nos danos cardiovasculares inerentes à AR. Acredita-se que a participação do SRA agrave o comprometimento endotelial decorrente de inflamações sistêmicas através da ativação do receptor de angiotensina II tipo 1 (AT<sub>1</sub>) pela angiotensina II (Ang II). Por outro lado, a literatura também reporta a influência dos hormônios andrógenos, principalmente da testosterona, nas ações da Ang II sobre os tecidos vasculares. Assim, o objetivo do presente estudo é investigar os efeitos da artrite induzida por adjuvante (AIA) sobre o equilíbrio redox, a função endotelial e as respostas da aorta de ratos à Ang II, bem como, verificar se esses efeitos podem ser influenciados pela redução dos níveis circulantes de testosterona. Para isto, ratos Wistar machos adultos foram submetidos à falsa-castração e falsa-imunização (Controles), castração seguida de falsa-imunização (ORX), falsa-castração seguida de imunização (ORX) e castração seguida de imunização (ORX+AIA). Ao final do experimento, segmentos de aorta torácica foram desafiadas em cubas de órgãos isolados com acetilcolina (ACh), Ang II, KCl e nitroprussiato de sódio e, das curvas concentração resposta obtidas, calculou-se o pEC<sub>50</sub> e efeito máximo (E<sub>max</sub>). Determinou-se também a expressão proteica dos receptores de Ang II AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> em aortas, assim como a capacidade antioxidante do plasma (FRAP), o consumo de peróxido por Xylenol Orange (FOX), o nitrito/nitrato por Griess e ácido úrico no plasma. Os resultados mostraram que tanto a AIA quanto a ORX não alteraram o perfil das curvas concentração-respostas para ACh na ausência ou presença do L-NAME (10<sup>-4</sup>M), Apocinina (10<sup>-4</sup>M) ou Tiron (10<sup>-4</sup>M). AIA ou ORX também não alteraram as respostas à Ang II na ausência ou presença de Indometacina (10<sup>-5</sup>M), KCl 60 mm/L, 1400W (10<sup>-6</sup>M) Tiron (10<sup>-4</sup>M) ou PD123,319 (10<sup>-6</sup>M). Contudo, na presença do L-NAME (10<sup>-4</sup>M), observou-se um aumento do E<sub>max</sub> da Ang II nos animais Controle e ORX em comparação aos animais submetidos à AIA. Este aumento de E<sub>max</sub>, por sua vez, desapareceu quando esse desafio foi feito em cubas contendo solução nutritiva despolarizante (KCl 60 mm/L) ou quando o BQ123 (10<sup>-6</sup>M) ou BQ788 (10<sup>-6</sup>M) foram acrescentados na incubação, junto com o L-NAME (10<sup>-4</sup>M). Observou-se também um aumento do E<sub>max</sub> da Ang II nos animais ORX, em comparação aos animais AIA e ORX+AIA, quando o desafio foi realizado na presença da Apocinina (10<sup>-4</sup>M). Além disso, AIA e/ou ORX diminuíram a expressão proteica dos receptores AT<sub>1</sub>, sem modificar os receptores AT<sub>2</sub>. Valores de FRAP, nitrito/nitrato e ácido úrico não apresentaram maiores alterações entre os grupos estudados, mas os valores de FOX diminuíram no grupo AIA. Esses dados sugerem que a AIA ou a ORX não modificam substancialmente o balanço redox sistêmico, a função endotelial, bem como as respostas da aorta à Ang II, se todos os mecanismos moduladores endoteliais estiverem presentes. Todavia, a AIA parece mobilizar mecanismos endoteliais para atuar no lugar do NO, sempre que a síntese deste é inibida. Possivelmente, tais mecanismos são ativados via receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e envolvem tanto prostanoídes vasodilatadores quanto mecanismos indutores de hiperpolarização das células da musculatura lisa vascular presentes na aorta. A testosterona, por sua vez, não parece ter um papel determinante para a mobilização desses mecanismos locais que cooperam com o NO.

**Palavras-chave:** Angiotensina II; Artrite experimental, EDHF; Endotelina-1; Eicosanóides; Testosterona

## ABSTRACT

Life expectancy of patients with rheumatoid arthritis (RA) is lower due to increased mortality in consequence of cardiovascular diseases. Presumably, this occurs due to endothelial dysfunction resulting from severe inflammatory activity related to RA. Evidence has demonstrated a possible involvement of the renin-angiotensin system (RAS) in the cardiovascular injury inherent to RA. The RAS involvement is considered to worsen the endothelial impairment due to systemic inflammation through angiotensin II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>) activation of Ang II. (Ang II). Additionally, previous studies also observed that androgen hormones, mainly the testosterone, modulate the Ang II actions in cardiovascular tissues. Thus, the aim of the present study is to investigate the effects of adjuvant-induced arthritis (AIA) on systemic redox balance, endothelial function and rat aorta responses to Ang II, as well as, whether these effects may be influenced by the reduction of circulating levels of testosterone. For this, adult male Wistar rats were submitted to false-castration and false-immunization (Controls), castration followed by false-immunization (ORX), false-castration followed by immunization (ORX) and castration followed by immunization (ORX + AIA) . At the end of the experiment, thoracic aorta segments were challenged in isolated organ bath with acetylcholine (ACh), Ang II, KCl and sodium nitroprusside and, from the concentration-response curves obtained were calculated pEC<sub>50</sub> and maximal effect (E<sub>max</sub>). The protein expression of Ang II type 1 and 2 receptor (AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>, respectively) were also determined, as well as, plasma antioxidant capacity (FRAP), peroxide consumption by Xylenol Orange (FOX), nitrite/nitrate by Griess and uric acid in plasma. The results showed that both AIA and ORX did not change the concentration-response curves profile for ACh in the absence or presence of L-NAME (10<sup>-4</sup>M), Apocynin (10<sup>-4</sup>M) or Tiron (10<sup>-4</sup>M). AIA or ORX also did not change Ang II responses in the absence or presence of Indomethacin (10<sup>-5</sup>M), KCl 60mm/L, 1400W (10<sup>-6</sup>M) Tiron (10<sup>-4</sup>M) or PD123,319 (10<sup>-6</sup>M). However, in the presence of L-NAME (10<sup>-4</sup>M), was observed an increase of the Ang II E<sub>max</sub> in Control and ORX animals in comparison to the animals submitted to AIA. This increase in E<sub>max</sub>, in turn, disappeared when this challenge was realized in organ bath containing depolarizing nutrient solution (KCl 60 mm/L) or when BQ123 (10<sup>-6</sup>M) or BQ788 (10<sup>-6</sup>M) were added in the incubation together with L-NAME (10<sup>-4</sup>M). It was also observed an increase of the Ang II E<sub>max</sub> in the ORX animals compared to the AIA and ORX+AIA animals, when the challenge was performed in the presence of Apocynin (10<sup>-4</sup>M). In addition, AIA and/or ORX decreased the protein expression of AT<sub>1</sub> receptors without modifying AT<sub>2</sub> receptors. The values of FRAP, nitrite/nitrate and uric acid did not show differences between the studied groups, but FOX values decreased in the AIA group. These data suggest that AIA or ORX does not substantially modify systemic redox balance, endothelial function, as well as aortic and Ang II responses, if all endothelial modulatory mechanisms are present. However, AIA seems to mobilize endothelial mechanisms to act as NO backup, whenever the synthesis of this gas is inhibited. Possibly, such mechanisms are activated via ET<sub>A</sub> and ET<sub>B</sub> receptors and involve both vasodilatory prostanoids and mechanisms that induce hyperpolarization of vascular smooth muscle cells present in the aorta. Testosterone, on the other hand, does not seem to play a decisive role in the mobilization of these local mechanisms that cooperate with NO.

**Keywords:** Angiotensin II; Experimental arthritis, EDHF ;, Endothelin-1; Eicosanoids; Testosterone

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Concentrações plasmáticas de testosterona expressas em ng/dL, de animais dos grupos Controle e AIA. Valores expressos em mediana  $\pm$  intervalo interquartil (p25-p75). Entre parênteses, o número de amostras..... 34
- Figura 2 - Curvas concentração-resposta (relaxamento expresso como % da pré-contracção induzida por fenilefrina) para ACh determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (o), ORX ( $\square$ ), AIA ( $\bullet$ ) e ORX+AIA ( $\blacksquare$ ), na ausência (A) ou presença de L-NAME  $10^{-4}$ M (B), Apocinina  $10^{-4}$ M (C) ou Tiron  $10^{-4}$ M (D). Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras. .... 40
- Figura 3 - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (o), ORX ( $\square$ ), AIA ( $\bullet$ ) e ORX+AIA ( $\blacksquare$ ), na ausência (A) ou presença de Indometacina  $10^{-5}$ M (B), solução nutritiva de Krebs-Henseleit hiperpolarizante (KCl 60 mM; C) ou L-NAME  $10^{-4}$ M (D), Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras..... 43
- Figura 4 - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (o), ORX ( $\square$ ), AIA ( $\bullet$ ) e ORX+AIA ( $\blacksquare$ ), na presença concomitante de L-NAME  $10^{-4}$ M e BQ123  $10^{-6}$ M (A), BQ788  $10^{-6}$ M (B) ou Indometacina  $10^{-5}$ M (C), bem como, na presença do L-NAME  $10^{-4}$ M em cuba contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit hiperpolarizante (KCl 60 mM; D). Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras. .... 46
- Figura 5 - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (o), ORX ( $\square$ ), AIA ( $\bullet$ ) e ORX+AIA ( $\blacksquare$ ), na presença de Apocinina  $10^{-4}$ M. Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras. .... 48
- Figura 6 - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (o), ORX ( $\square$ ), AIA ( $\bullet$ ) e ORX+AIA ( $\blacksquare$ ), na presença de Tiron  $10^{-4}$ M. Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras. .... 49

- Figure 7 – Expressão proteica dos receptores de Ang II subtipos AT<sub>1</sub> (a) e AT<sub>2</sub> (b), em relação à GAPDH, determinadas em aortas torácicas isoladas (parte superior) de animais pertencentes aos grupos Controle, ORX, AIA e ORX+AIA e quantificação densiométrica das bandas correspondentes (parte inferior). Valores expressos em mediana ± intervalo interquartil (p25-p75). \*P <0,05 em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis seguida por pós-teste de Dunn). ..... 50
- Figura 8 - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (o), ORX (□), AIA (•) e ORX+AIA (■), na presença de PD123,319 10<sup>-6</sup>M. Pontos representam média ± E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras. .... 51
- Figura 9 - Curvas concentração-resposta para Ang II (A) e KCl (B), determinadas em preparações de aorta torácica deendotelizadas, e para, nitroprussiato de sódio (C) determinadas em preparações intactas (C) e deendotelizadas (A e B) de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (o), ORX (□), AIA (•) e ORX+AIA (■). Pontos representam média ± E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras. .... 52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa corporal (g) dos animais determinada no dia da imunização e ao final do protocolo.....	34
Tabela 2 - Massa úmida (g) dos órgãos sexuais internos e glândulas acessórias.....	35
Tabela 3 - Massa úmida (g) das patas.....	36
Tabela 4 - Diâmetro (mm) das patas determinados antes e após imunização/falsa-imunização.....	38
Tabela 5 - Massa úmida (g) do coração e do rim direito. ....	38
Tabela 6 – Valores de FRAP, FOX, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ e ácido úrico. ....	37
Tabela 7 - Valores $E_{\text{max}}$ e $\text{pEC}_{50}$ para ACh determinados na ausência ou na presença de L-NAME ( $10^{-4}\text{M}$ ), Apocinina ( $10^{-4}\text{M}$ ) ou Tiron ( $10^{-4}\text{M}$ ). ....	41
Tabela 8 - Valores $E_{\text{max}}$ e $\text{pEC}_{50}$ para Ang II determinados em preparações estudadas na ausência ou na presença de Indometacina $10^{-5}\text{M}$ , solução nutritiva despolarizante - KCl 60 mM ou L-NAME $10^{-4}\text{M}$ . ....	44
Tabela 9 - Valores $E_{\text{max}}$ e $\text{pEC}_{50}$ para Ang II determinados na presença de L-NAME $10^{-4}\text{M}$ associado ao BQ123 $10^{-6}\text{M}$ , BQ788 $10^{-6}\text{M}$ , Indometacina $10^{-5}\text{M}$ ou solução nutritiva despolarizante – KCl 60 mM. ....	47
Tabela 10 - Valores $\text{pEC}_{50}$ para KCL e nitroprussiato de sódio. ....	53

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACh - acetilcolina  
AIA – artrite induzida por adjuvante  
Ang II – angiotensina II  
AR – artrite reumatoide  
AT<sub>1</sub> – receptor de angiotensina II tipo 1  
AT<sub>2</sub> – receptor de angiotensina II tipo 2  
BH<sub>4</sub> - tetrahidrobiopterina  
CIA – *collagen induced arthritis*  
ECA – enzima conversora de angiotensina  
EDHF – *endothelium-derived hyperpolarizing factors*  
eNOS – óxido nítrico sintase endotelial  
ET - endotelina  
ET<sub>A</sub> – receptor de endotelina tipo A  
ET<sub>B</sub> – receptor de endotelina tipo B  
FOX – *ferrous oxidation – xylenol Orange*  
FRAP – *ferric reducing activity of plasma*  
IAM – infarto agudo do miocárdio  
ICC – insuficiência cardíaca congestiva  
IL-1 – interleucina 1  
IL-6 – interleucina 6  
IL-7 $\alpha$  – interleucina 7 alfa  
INF-c – interferon c  
iNOS – óxido nítrico sintase endotelial  
MPP-9 – metaloproteinase 9  
MPO - mieloperoxidase  
NO – óxido nítrico  
ORX – castração bilateral cirúrgica  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
SRA – sistema renina-angiotensina  
TNF-  $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	15
1.1 Artrite Reumatoide.....	15
1.2 Artrite e danos cardiovasculares.....	16
1.3 Busca por modelos experimentais que reproduzam de forma fidedigna os danos cardiovasculares relacionados à AR.....	18
1.4 Envolvimento do sistema renina-angiotensina nos danos cardiovasculares inerentes à artrite.....	19
1.5 Influência da testosterona nas ações cardiovasculares induzidas pela Ang II.....	21
1.6 Lacunas remanescentes.....	22
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
3.1 Animais.....	24
3.2 Delineamento experimental.....	25
3.3 Castração cirúrgica bilateral - ORX.....	25
3.4 Artrite induzida por adjuvante – AIA.....	26
3.5 Ectoscopia dos animais AIA, com foco nas patas.....	27
3.6 Pesagens.....	27
3.7 Protocolo de coleta do plasma.....	27
3.8 <i>Ferric Reducing Activity of Plasma</i> - FRAP.....	28
3.9 Quantificação da peroxidação lipídica.....	28
3.10 Avaliação das concentrações de nitrito e nitrato por método de Griess.....	29
3.11 Determinação do ácido úrico.....	29
3.12 Determinação de testosterona plasmática.....	29
3.13 Isolamento e montagem das preparações de aorta torácica para estudo funcional de reatividade vascular.....	30
3.14 Curvas concentração-resposta.....	30
3.15 Análise de parâmetros farmacológicos.....	31
3.16 Avaliação da expressão proteica - Western Blotting.....	31
3.17 Diagrama experimental.....	33
3.18 Análise Estatística.....	33

<b>4. RESULTADOS</b> .....	33
<b>4.1 Massa Corporal</b> .....	33
<b>4.2 Dosagem de testosterona plasmática</b> .....	34
<b>4.3 Massa úmida dos órgãos sexuais internos e glândulas acessórias</b> .....	35
<b>4.4 Massa úmida e diâmetro das patas</b> .....	35
<b>4.5 Massas úmidas do coração e rim</b> .....	37
<b>4.6 Balanço redox do plasma</b> .....	38
<b>4.7 Estudo das respostas da aorta à ACh</b> .....	39
<b>4.8 Estudo das respostas da aorta à Ang II</b> .....	41
<b>4.8.1 Influência do NO, prostanoídes e mecanismos hiperpolarizantes</b> .....	42
<b>4.8.2 Interação do NO com endotelina, prostanoídes e mecanismos hiperpolarizantes</b> ..	44
<b>4.8.3 Influência de espécies reativas nas respostas da aorta à Ang II</b> .....	48
<b>4.9 Estudo da expressão proteica para os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> de Ang II em aortas</b> ...	49
<b>4.10 Participação dos receptores AT<sub>2</sub> nas respostas da aorta à Ang II</b> .....	50
<b>4.11 Estudo das respostas à Ang II e ao KCl em aortas deendotelizadas, e ao nitroprussiato de sódio em aortas intactas</b> .....	51
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69

# 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

## 1.1 Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença reumática relativamente frequente. Trata-se de uma condição que acomete até 1% da população mundial adulta (SKARE, 2007; SATO, 2010; GOELDNER et al., 2011; MOTA et al., 2011). Sua ocorrência é observada em todos os grupos étnicos, dispersos entre as diferentes regiões do mundo, com predomínio no sexo feminino, sobretudo na faixa etária de 30-50 anos, embora haja registro em todas as idades (SKARE, 2007; CARVALHO; LANNA; BERTOLO, 2008; SATO, 2010; MOTA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). No Brasil, uma análise retrospectiva dos pacientes com AR em acompanhamento ambulatorial no Estado de São Paulo, entre 2002 e 2005, delineou o seguinte perfil epidemiológico: mulher (86%), faixa etária 40-59 anos (55%), caucasóide (71%) e história de início de doença há menos de dez anos (71%). Esta visão, mesmo que parcial, se assemelha às características relatadas em populações de outros países (LOUZADA JR, 2007).

Trata-se de uma doença autoimune, crônica, multissistêmica e de etiologia desconhecida, cujas principais alterações ocorrem ao nível das estruturas articulares, periarticulares e tendinosas. Caracteriza-se por um intenso processo inflamatório na sinóvia, deposição de fibrina, hiperplasia de células sinoviais, infiltrados mononucleares, formação de tecido celular invasivo (*pannus*), e, eventual anquilose em uma ou mais articulações periféricas, onde mãos e pés são preferencialmente acometidos. Vale ressaltar que a gravidade e o tempo de doença estão diretamente relacionados com as alterações ocasionadas pela inflamação e hipertrofia do tecido sinovial, onde a desorganização biomecânica das estruturas articulares provoca além da dor local, instabilidade articular, deformidades e perda de função (MOREIRA; CARVALHO, 1996; SKARE, 2007; CARVALHO; LANNA; BERTOLO, 2008; LEVY; PACHECO, 2009; KUMAR et al., 2010; PEREIRA et al., 2012).

Embora sua etiologia ainda permaneça obscura, muitos avanços têm ocorrido no estudo de sua patogênese. Admite-se que o desenvolvimento da doença se deva à interação de diversos fatores como: patrimônio genético do hospedeiro (antígenos HLA-DR4 e HLA-DR1), fatores comportamentais, agentes ambientais, desequilíbrio imunológico e alterações endócrinas (SKARE, 2007; CARVALHO; LANNA; BERTOLO, 2008; SATO, 2010). Neste sentido, a evolução da AR ocorre a partir da manutenção da reação autoimune, com ativação das células T *helper* CD4+ e outros linfócitos, desregulação da produção de citocinas pró-

inflamatórias e transformação da sinóvia em *pannus*, levando à destruição da articulação (SKARE, 2007; CARVALHO; LANNA; BERTOLO, 2008; KUMAR et al, 2010; SATO, 2010).

## **1.2 Artrite e danos cardiovasculares**

As manifestações da AR vão além da dor e invalidez resultantes do comprometimento articular, visto que a sobrevida de um paciente com AR é menor quando comparada com a sobrevida da população geral (TORIGOE; LAURINDO, 2006; GABRIEL, 2008; LIMA; MASSABKI, 2009; KHAN; GALARRAGA; BELCH, 2010; GOELDNER et al., 2011). Isso se deve ao fato destes indivíduos apresentarem maior predisposição a infecções, complicações sistêmicas da doença e complicações secundárias ao tratamento (CARVALHO; LANNA; BERTOLO, 2008). As principais manifestações extra-articulares incluem quadros cutâneos (nódulos reumatóides), oculares (episclerite, esclerite e ceratoconjuntivite *sicca*), pleuropulmonares, cardíacos (pericardite e miocardite), hematológicos (anemia hipocrômica e microcítica, eosinofilia e síndrome de Felty), neurológicos (neuropatia periférica e mononeurite múltipla), osteometabólicos, e, manifestações como vasculites, linfadenopatias e amiloidoses (SKARE, 2007; CARVALHO; LANNA; BERTOLO, 2008; SATO, 2010; MOTA et al., 2011).

É também bastante clara a associação entre a AR e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Segundo Gabriel (2008), pacientes artríticos apresentam um aumento significativo no risco de morte geral, atribuído principalmente a eventos cardiovasculares. Dentre estes eventos, destacam-se infarto agudo do miocárdio (IAM) e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (TORIGOE; LAURINDO, 2006). Ademais, estudos observaram a presença de aterosclerose subclínica, bem como um aumento na frequência deste fenômeno em pacientes artríticos. Quando submetidos à ultrassonografia de carótidas, estes indivíduos apresentaram um aumento significativo da espessura da camada íntima-medial da carótida comum, um indicador de aterosclerose generalizada (HEISS et al., 1991; BOTS et al., 1996; KUMEDA et al., 2002; PARK et al., 2002; ALKAABI et al., 2003).

Para se compreender melhor as repercussões da artrite sobre o sistema cardiovascular, é necessário compreender em profundidade o endotélio vascular. O endotélio vascular é uma monocamada celular que recobre o interior de todos os vasos que integram o sistema cardiovascular. A princípio, caracterizado apenas como uma barreira física que recobre a luz dos vasos, a partir do estudo de Furchgott e Zawadzki (1980) passou a ser considerado um

importante “sensor biológico” e um tecido secretor, fundamental para o controle da homeostase vascular. Uma das principais funções da célula endotelial é a liberação de substâncias vasoativas, relaxantes ou constritoras, em resposta a estímulos humorais, neurais e mecânicos (STORCH et al., 2017). Dentre as substâncias vasoativas mais relevantes liberadas pelo endotélio, destaca-se o óxido nítrico (NO). O NO é um gás de meia vida extremamente curta, mediador dos importantes processos fisiológicas e fisiopatológicas, cuja síntese se dá através de uma família de enzimas denominada óxido nítrico sintases. Em situações fisiológicas, a tensão de cisalhamento (*shear stress*) exercida pelo fluxo sanguíneo sobre as células endoteliais libera NO mantendo o vaso sanguíneo num constante estado de relaxamento (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

A liberação do NO pelas células endoteliais também pode ocorrer em consequência da estimulação de receptores farmacológicos, como os receptores muscarínicos (MONCADA et al., 1991), receptores  $\alpha_2$  e  $\beta_2$ , receptor de bradicinina, etc (VANHOUTTE et al., 2016). Por outro lado, numa condição de estresse oxidativo que resulte em acúmulo de radicais livres no tecidos vasculares, pode ocorrer redução na biodisponibilidade de substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio, em especial o NO, paralela a um aumento na liberação de substâncias vasoconstritoras. Esse processo pode levar a um prejuízo da função endotelial, referido na literatura como disfunção endotelial (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; VANHOUTTE et al., 2016; STORCH et al., 2017).

Assim, tem sido proposto que a liberação sistêmica de inúmeras citocinas pró-inflamatórias decorrente da inflamação crônica inerente à AR comprometa a função endotelial (YKI-JÄRVINEN; BERGHOLM; LEIRISALO-REPO, 2003; MÄKI-PETÄJÄ et al., 2008). Com efeito, este mecanismo fisiopatológico somado ou não à fatores de risco clássicos é frequentemente proposto para justificar a grande correlação entre a AR e o aumento da morbimortalidade cardiovascular, observada na maioria dos estudos epidemiológicos (TORIGOE; LAURINDO, 2006; GABRIEL, 2008; LIMA; MASSABKI, 2009). Com base nestas informações, Bergholm et al. (2002) compreendem que tanto o controle quanto a supressão precoce da inflamação sistêmica na AR, não apenas diminuem a atividade da doença como também podem melhorar ou prevenir a perda da função endotelial.

O mecanismo que leva a esta disfunção endotelial ainda é pouco entendido, contudo, parece envolver um excedente local de radicais livres. Em aortas provenientes de ratos com artrite induzidos por adjuvante (AIA), foi observada uma redução significativa da função endotelial, associada a um aumento do estresse oxidativo decorrente do aumento da expressão do complexo enzimático NAD(P)H oxidase e do desacoplamento da óxido nítrico sintase

endotelial (eNOS) (HARUNA et al., 2006, 2007). Neste sentido, inferiu-se que a atenuação do aumento do fluxo sanguíneo induzido pela acetilcolina (ACh) em antebraço de pacientes com AR, indicativo de disfunção endotelial, está associada a um aumento da atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ao aumento dos níveis circulantes de mieloperoxidase (MPO) (MÄKI-PETÄJÄ et al., 2008).

### **1.3 Busca por modelos experimentais que reproduzam de forma fidedigna os danos cardiovasculares relacionados à AR**

Os estudos que visam compreender os mecanismos fisiopatológicos que determinam a AR, bem como aqueles que visam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, dependem de bons modelos experimentais. Entende-se por bons modelos experimentais, aqueles capazes de reproduzir de forma fidedigna os principais mecanismos fisiopatológicos da AR. Isto se aplica, inclusive, no que diz respeito ao estudo dos danos cardiovasculares relacionados à AR. Contudo, é válido ressaltar que embora apresentem semelhanças fisiopatológicas importantes com a AR, estes modelos experimentais não devem ser confundidos com a doença que se desenvolve nos seres humanos (OLIVER; BRAHN, 1996; BENDELE et al., 1999; BENDELE, 2001; HEGEN et al., 2008). Com efeito, qualquer extrapolação para seres humanos de resultados de pesquisa obtidos nestes modelos experimentais deve ser feita com muita cautela. Neste sentido, para que extrapolações possam ser feitas de forma racional e segura, é desejável que um mesmo mecanismo fisiopatológico seja testado no maior número possível de modelos experimentais (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Inúmeros modelos de artrite estão descritos na literatura, todos com semelhanças e diferenças com relação à AR (HEGEN et al., 2008). O modelo AIA foi um dos primeiros modelos experimentais de artrite descritos na literatura e, desde então, tem sido amplamente utilizado para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos, bem como na busca de alternativas terapêuticas para esta doença. Com rápida evolução de grande reprodutibilidade, este modelo apresenta características semelhantes à AR como eritema e edema de extremidades, inflamação poliarticular, infiltração celular (polimorfonuclear), reabsorção óssea seguida de proliferação óssea periosteal, formação de *pannus*, destruição óssea e cartilaginosa e conseqüentemente perda de função. Ademais, observou-se o envolvimento de células T *helper* e citocinas pró-inflamatórias, além da presença de altos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon c (INF-c), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6)

e interleucina 7 alfa (IL-7 $\alpha$ ) em linfonodos e/ou articulações afetadas. Contudo, trata-se de um modelo célula T dependente, mas, sistema complemento independente. Além disso, pouco se sabe sobre o papel células B neste modelo experimental (BENDELE et al., 1999; BENDELE, 2001; HEGEN et al., 2008).

A escolha do modelo AIA no presente estudo de pesquisa baseou-se em estudos prévios que constataram disfunção endotelial neste modelo experimental (FANG et al, 1991; HARUNA et al., 2006; HARUNA et al., 2007; NOZAKI et al., 2007; SAKUTA et al., 2010; PRATI et al., 2011). Por sua vez, estudos realizados em modelo de artrite induzida por colágeno tipo II (*collagen induced arthritis* – CIA), considerado mais próximo à AR, falharam em mostrar disfunção endotelial (REYNOLDS et al., 2012). A falha do modelo CIA em promover disfunção endotelial em aorta também foi constatada por nós durante o mestrado (PALMA ZOCHIO TOZZATO et al., 2016).

#### **1.4 Envolvimento do sistema renina-angiotensina nos danos cardiovasculares inerentes à artrite**

O sistema renina-angiotensina (SRA) atua na regulação da pressão arterial e homeostase hídrica e eletrolítica principalmente através de seu mediador, a angiotensina II (Ang II) (PACURARI et al., 2014). As ações da Ang II ocorrem, primordialmente, através da ativação de dois diferentes receptores, o receptor de angiotensina II subtipo 1 (AT<sub>1</sub>) ou o receptor de angiotensina II subtipo 2 (AT<sub>2</sub>) (MATSUBARA, 1998; DE GASPARO et al., 2000). Tem sido proposto que a Ang II, por meio da ativação do receptor AT<sub>1</sub>, promova vasoconstrição, proliferação celular, fibrose e outras ações potencialmente deletérias ao sistema cardiovascular. Em paralelo, a ativação do receptor AT<sub>2</sub>, pela Ang II pode desencadear ações opostas como vasodilatação através da liberação de óxido nítrico (NO), inibição do crescimento e da proliferação celular etc. Desta forma, existe um consenso na literatura de que as ações cardiovasculares da Ang II mediadas por receptores AT<sub>2</sub> equilibram aquelas mediadas por receptores AT<sub>1</sub> (TIMMERMANS et al., 1993; GRIENGLING; LASSEGUE; ALEXANDER, 1996; BROWN et al., 2017).

Já foi observado também que a Ang II induz à liberação de endotelina (ET) em aortas de ratos que, por sua vez, passa a modular as respostas contráteis deste leito à Ang II (ORIJ, KEISER, 1997). Além disso, estudos apontam o receptor AT<sub>1</sub> como responsável pela liberação de ET induzida por Ang II (KOHAN et al., 2011). A ET liberada atua em receptores de endotelina subtipo A (ET<sub>A</sub>) e subtipo B (ET<sub>B</sub>). Os receptores ET<sub>A</sub> estão

predominantemente localizados em células do músculo liso, onde promovem vasoconstrição, proliferação e fibrose. Os receptores  $ET_B$ , por outro lado, estão localizados em células endoteliais, onde promovem vasodilatação através da produção de NO e prostaglandinas ( $ET_{B1}$ ), como também em células do músculo liso, onde promove vasoconstrição ( $ET_{B2}$ ). (KOHAN et al., 2011; MAZZUCA; KHALIL, 2012; VALDEZ, 2013). Assim, ao liberar substâncias vasodilatadoras via receptores  $ET_{B1}$ , a ET é capaz de modular seus próprios efeitos vasoconstritores mediados tanto via receptores  $ET_A$  quanto receptores  $ET_{B2}$  (KOHAN et al., 2011; MAZZUCA; KHALIL, 2012). Também existem relatos de liberação de prostaciclina através da estimulação de receptores  $ET_A$  em pulmões de rato perfundidos (D'ÓRLEANS et al., 1992) e em leito arterial do rim de coelhos (TÉLÉMAQUE et al., 1993).

Entre os mecanismos fisiopatológicos desencadeados pela ativação dos receptores  $AT_1$ , além da vasoconstrição, destaca-se o aumento da atividade e/ou expressão local do complexo NAD(P)H oxidase, que leva ao aumento da formação local de ânion superóxido (GRIENGLING et al., 1994). Por conta disto, é possível que a ativação dos receptores  $AT_1$  pela Ang II exerça um papel importante nas alterações endoteliais decorrentes da AR ou nos processos inflamatórios articulares que caracterizam os modelos animais que simulam a AR. Neste sentido, Haruna et al. (2006, 2007) observaram um aumento da expressão das subunidades  $p22^{phox}$  e  $gp91^{phox}$  da NAD(P)H oxidase em ratos AIA. Em aortas de ratos AIA infundidos com Ang II observou-se também um aumento da expressão dos receptores  $AT_1$  e da enzima conversora de angiotensina (ECA) (SAKUTA et al., 2010). Estes autores mostram ainda que a função endotelial, demonstrada pelas respostas relaxantes induzidas pela ACh nas aortas destes mesmos animais, já prejudicada em animais AIA, passa a ser ainda mais comprometida pela infusão de Ang II.

Alguns estudos utilizaram inibidores da ECA ou antagonistas dos receptores  $AT_1$  com a finalidade de prevenir e ou reverter possíveis danos cardiovasculares promovidos pela AR ou demais modelos inflamatórios sistêmicos. Sakuta et al. (2010) descrevem que o prejuízo nas respostas relaxantes induzidas por ACh em aortas de ratos AIA infundidos com Ang II é nitidamente atenuado pelo tratamento com losartan ou irbesartan (ambos antagonistas  $AT_1$ ). Tem sido observado também redução do estresse oxidativo em ratos AIA tratados com ramipril, um antagonista da ECA (SHI et al., 2012). Paralelamente, foi constatado que o bloqueio dos receptores  $AT_1$  por losartan corrige o prejuízo do relaxamento da aorta de ratos AIA mediadas pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (MACKENZIE et al., 2013). O tratamento com ramipril também aumentou o fluxo sanguíneo induzido pela ACh, indicativo da função endotelial, em antebraço de pacientes com AR (FLAMMER et al.,

2014). Neste estudo também foi observado uma correlação inversa entre o aumento do fluxo sanguíneo induzido por ACh e os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ .

Por fim, é importante salientar que a relação entre a disfunção endotelial e as ações da Ang II nestes tecidos parece ser uma via de mão dupla. Se por um lado a infusão de Ang II aparentemente agrava a disfunção endotelial associada à AIA, por outro a AIA aumenta a expressão do AT<sub>1</sub> e da enzima conversora de angiotensina (ECA) na aorta destes animais (SAKUTA et al., 2010). Esta observação sugere que a AIA amplifica o funcionamento do SRA no organismo destes animais, possivelmente fazendo com que este sistema passe a desempenhar um papel fisiopatológico muito maior.

### **1.5 Influência da testosterona nas ações cardiovasculares induzidas pela Ang II**

A participação da testosterona nas ações vasomotoras da Ang II é ainda muito controversa, embora bastante investigada. Alguns pesquisadores sugerem que este hormônio exerce ações protetoras sobre o sistema cardiovascular. De fato, a incidência de hipertensão e outras doenças cardiovasculares é maior no envelhecimento, fase da vida em que os níveis plasmáticos de testosterona encontram-se em declínio constante (LIU et al., 2003). Também dá suporte a esta teoria o fato de que alguns estudos observaram a presença de lesões ateroscleróticas em indivíduos com baixos níveis circulantes de testosterona (HAK et al., 2002, MULLER et al., 2004; ROSANO et al., 2007). Neste contexto, sugere-se que estas ações "vasoprotetoras" da testosterona possam estar relacionadas a uma ação anti-inflamatória sistêmica deste hormônio.

Por outro lado, muitos estudos sugerem que a testosterona promova danos cardiovasculares (XU et al., 2013; ZIEMENS et al., 2013). Esta hipótese é reforçada pelo fato de doenças cardiovasculares como hipertensão e aterosclerose serem mais prevalentes em homens. Neste sentido, vale mencionar que a relação "receptores AT<sub>2</sub>/receptores AT<sub>1</sub>" é menor em amostras de rins, aortas e leito arterial mesentérico obtidos de ratos com hipertensão espontânea - SHR machos ou fêmeas castradas, enquanto o oposto foi observado em fêmeas ou fêmeas castradas submetidas à reposição com estrógeno (SILVA-ANTONIALI et al., 2004). Segundo estes autores, uma ação pró-hipertensiva da Ang II pode ser maior nestes animais (machos ou fêmeas castradas) em virtude de uma estimulação sobre receptores AT<sub>1</sub> evidenciada em detrimento da estimulação de receptores AT<sub>2</sub>. Além disso, nas artérias mesentéricas de ratas grávidas submetidas à testosterona foi observado um

aumento significativo na expressão de receptores AT<sub>1</sub>, além de um aumento nas respostas contráteis à Ang II (CHINNATHAMBI, et al., 2014).

Estudos tem discutido cada vez mais esta complexa interação entre hormônios esteroides e o SRA na fisiopatologia de doenças cardiovasculares (MARIC-BILKAN; MANIGRASSO, 2012). O estudo de Song et al. (2006a) demonstrou que a castração atenuou a hipertensão, a pressão arterial média, e as respostas vasculares à Ang II em ratos geneticamente hipertensos, e que a terapia de reposição hormonal com testosterona reverteu todos esses fenômenos. Estes resultados sugerem que a testosterona desempenha um papel importante no desenvolvimento de hipertensão espontânea destes animais, possivelmente através de efeitos sobre a resistência vascular renal e a sensibilidade renal à Ang II. Foi relatado também que o bloqueio dos receptores AT<sub>1</sub> promove uma redução menos acentuada da pressão arterial em coelhos hipertensos castrados em comparação aos falso-castrados ou aos castrados submetidos à reposição com testosterona (SONG et al., 2006b). Segundo estes autores, estas modificações de resposta vascular à Ang II impostas pela castração não se deve à uma diminuição da expressão de receptores AT<sub>1</sub> no sistema cardiovascular, mas à uma modificação na via de transdução intracelular mediada pela proteína quinase C (PKC-CPI-17) (SONG et al., 2010).

Por fim, foi sugerido também que a testosterona potencializa a ação hipertensora da Ang II em ratos machos adultos que sofreram restrição de crescimento intrauterino em decorrência de restrição do fluxo sanguíneo placentário (OJEDA et al., 2010). Segundo estes autores, este aumento de resposta do sistema cardiovascular à Ang II pode ser um mecanismo subjacente à hipertensão programada que ocorre na vida adulta destes animais.

## **1.6 Lacunas remanescentes**

Com base no que foi apresentado, podemos afirmar que as doenças inflamatórias articulares podem levar a importantes alterações fisiopatológicas no sistema cardiovascular. Além disso, essas informações nos permitem sugerir que estes processos inflamatórios articulares podem levar a modificações nos mecanismos que regulam as respostas dos vasos à Ang II, um peptídeo endógeno que exerce papel de destaque tanto no controle do tônus vasomotor quanto em diversos mecanismos fisiopatológicos relacionados à disfunção endotelial e ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Com efeito, estas modificações de respostas à Ang II podem ter uma relação direta com os acometimentos vasculares relacionados à artrite. A este respeito, foram apresentadas evidências de que a AIA

potencializa as ações pressóricas da Ang II e aumenta a expressão dos receptores AT<sub>1</sub> em aortas de ratos. Estas evidências são fortalecidas pelo fato dos inibidores dos receptores AT<sub>1</sub> reverterem a disfunção endotelial decorrente da AIA. Contudo, não temos informações acerca da influência da AIA sobre as ações vasomotoras da Ang II diretamente nas aortas destes animais.

Mas esta complexa interação entre inflamação articular-SRA-sistema cardiovascular pode envolver outro elemento: a testosterona. Isto porque, conforme colocado, as respostas dos tecidos vasculares à Ang II pode ser modulada pela testosterona. E o que torna este assunto mais intrigante é o fato de ainda não ter sido definido se a testosterona acentua ou abranda as ações cardiovasculares da Ang II. Evidentemente, estudos em humanos portadores de AR ou em modelos animais que buscam correlacionar os níveis circulantes de testosterona com a artrite não são raros. Estes estudos, certamente, são motivados pela observação de que a incidência da AR é maior em mulheres em comparação aos homens (MARQUES NETO et al., 1993; LOUZADA JR, 2007) ou pelo fato de homens portadores de AR e ratos AIA apresentarem níveis plasmáticos reduzidos de testosterona (GORDON et al., 1984; BARBIER; BRELIERE; RONCUCCI, 1985; BRUOT; CLEMENS, 1987; CLEMENS; BRUOT, 1989). Contudo, o foco destes estudos é sempre a manifestação articular da doença e nunca as repercussões desta doença sobre o sistema cardiovascular. Nesta linha de investigação, evidências demonstram que a castração de ratos AIA aumenta a gravidade das manifestações articulares da artrite e que, por sua vez, a terapia de reposição hormonal aparentemente impede o estabelecimento destas manifestações (HARBUZ et al., 1995).

Portanto, o presente estudo, ao mesmo tempo que é o primeiro a propor uma investigação detalhada acerca dos efeitos da artrite sobre as respostas da aorta torácica à Ang II, avança também na medida em que se propõe a compreender o papel da testosterona sobre eventuais modificações de resposta da aorta à Ang II induzidas pela.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar os efeitos da AIA sobre as respostas da aorta de ratos à Ang II, bem como, verificar se esses efeitos podem ser influenciados pela redução dos níveis circulantes de testosterona.

## **2.2 Objetivos específicos**

- 2.2.1 Verificar se a AIA promove disfunção endotelial, com repercussões sobre as respostas da aorta à Ach, nos animais estudados e, caso promova, identificar o papel da testosterona neste fenômeno.
- 2.2.2 Estudar os efeitos da AIA sobre as respostas das aortas de ratos à Ang II, observando a participação do NO, prostanoídes, mecanismos hiperpolarizantes, ET e do complexo enzimático NAD(P)H oxidase nestes efeitos.
- 2.2.3 Identificar o papel da testosterona em eventuais modificações de resposta da aorta à Ang II induzidas pela AIA.
- 2.2.4 Verificar se o balanço redox está modificado no plasma dos animais AIA e, caso esteja, identificar o papel da testosterona neste fenômeno.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (12 semanas  $\pm$  2 semanas), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Marília - FAMEMA. Durante a semana que antecede o início do protocolo experimental os animais permaneceram no biotério de apoio ligado aos laboratórios das disciplinas básicas da Instituição. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas contendo até cinco animais, em condições controladas de iluminação (fotoperíodo: 12 horas) e temperatura (20°C a 25°C), dieta e água *ad libitum*. Para garantir a homogeneidade dos grupos estudados, estes foram constituídos por animais com idade e pesos semelhantes conforme descrito a seguir. A realização do presente trabalho foi aprovada em Reunião Ordinária pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, no dia 24 de outubro de 2014, cuja documentação está registrada sob o nº 1026/14.

### 3.2 Delineamento experimental

Primeiramente, os animais foram submetidos à castração/falsa-castração (ver item 3.3). Vinte dias após este procedimento cirúrgico, estes animais foram então submetidos à imunização/falsa-imunização, para indução da AIA (ver item 3.4). Vale ressaltar que esta etapa do protocolo experimental demanda um período de espera de 15 a 20 dias, referente ao período de estabilização da AIA. Uma vez estabelecida a AIA, estes animais aguardaram mais 21 dias para, finalmente, serem estudados. Deste modo, os animais aqui utilizados foram divididos em quatro grupos experimentais: **Controle** (falso-castrados e falso-imunizados), **ORX** (castrados e falso-imunizados), **AIA** (falso-castrados e imunizados) e **ORX+AIA** (castrados e imunizados).

### 3.3 Castração cirúrgica bilateral - ORX

Os animais foram castrados ao completar 12 semanas de idade, pois os níveis plasmáticos de testosterona estabilizam-se por volta desta idade (WHITE et al., 2000). Para tanto, foram anestesiados com tribromoetanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA - 250 mg/kg, via intraperitoneal) e colocados em decúbito dorsal sobre campo cirúrgico. Com o animal nesta posição, foi realizada uma incisão longitudinal na região mediana do escroto, exteriorizando-se um dos testículos. O fluxo sanguíneo oriundo do pedículo vascular foi interrompido e o testículo foi então extirpado. O mesmo procedimento foi repetido para a remoção do testículo contralateral. Extirpadas as gônadas, as estruturas remanescentes foram recolocadas na bolsa escrotal e a ferida operatória foi suturada (VALLE et al., 1982). Ao final da cirurgia, os animais receberam injeção profilática de 200 µL de solução injetável de oxitetraciclina - Terramicina® para profilaxia de infecções e 200 µL de dipirona para analgesia ambas por via intramuscular. Os animais falso-castrados foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém a extirpação das gônadas não foi realizada. Dessa forma garantiu-se que estes animais falso-castrados fossem submetidos às mesmas condições experimentais dos animais castrados. No período de três a cinco dias após a realização das cirurgias, os animais foram devidamente identificados e mantidos em gaiolas individuais. Este cuidado visou evitar o contato entre animais operados, garantindo assim uma melhor recuperação pós-cirúrgica (GONZALES, KRAUSE, DUCKLES, 2004). Logo após o período de recuperação, os animais foram reagrupados em gaiolas coletivas.

A efetividade da castração foi avaliada pela pesagem dos órgãos sexuais (VALLE et al., 1982) e pela dosagem plasmática de testosterona conforme técnicas descritas a seguir. Considerou-se efetiva a castração quando foi constatada a redução de massa úmida dos órgãos sexuais bem como, uma drástica diminuição das concentrações séricas de testosterona.

### **3.4 Artrite induzida por adjuvante – AIA**

Passados 20 dias da castração/falsa-castração, os animais foram submetidos ao protocolo de indução da AIA descrito por (CAPARROZ-ASSEF et al., 2001) com algumas modificações. Para isto, os animais foram novamente anestesiados com tribromoetanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA - 250 mg/kg, via intraperitoneal) e posicionados em decúbito ventral sobre campo cirúrgico para a realização da imunização. Nesta posição, cada animal (AIA ou ORX+AIA) recebeu 100µL de uma emulsão à base de óleo mineral e água destilada, contendo 50 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* dessecadas - H37RV (Difco, Detroit, MI, USA), por via intradérmica, na planta da pata traseira direita. Os animais falso-imunizados foram submetidos ao mesmo procedimento, contudo, ao invés da emulsão à base de óleo mineral e água destilada, contendo 50 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* receberam apenas 100µL de óleo mineral na planta da pata traseira direita destes animais. Deste modo, garantiu-se que estes animais foram submetidos às mesmas condições experimentais dos animais imunizados.

O acometimento das articulações geralmente deu-se em um período de 15 a 20 dias após a imunização. Os sinais destes acometimentos foram detalhadamente mencionados no próximo item (3.5) desta seção. Uma vez constatado o acometimento articular decorrente da artrite, aguardou-se um período de 21 dias para a realização dos experimentos de reatividade vascular e coleta de material para as análises a seguir. Cabe ressaltar, no entanto, que os animais que não desenvolveram o processo inflamatório articular até 20 dias pós-imunização, foram excluídos do estudo.

A efetividade da AIA foi avaliada pela pesagem, bem como, pela mensura do diâmetro das patas detalhadamente descritas na sequência. Considerou-se efetiva a imunização quando foi constatado um aumento na massa úmida e na circunferência das patas dos animais estudados.

### **3.5 Ectoscopia dos animais AIA, com foco nas patas.**

Após a imunização, o animal foi observado diariamente até o surgimento dos primeiros sinais inflamatórios articulares clássicos – eritema e edema. Como mencionado anteriormente, a imunização foi realizada na planta da pata traseira direita. Assim, quando a pata contralateral, ou seja, pata traseira esquerda também apresentou eritema e edema (dentro do período de até 20 dias pré-estabelecido), admitiu-se que o processo inflamatório progrediu satisfatoriamente, alcançando o nível sistêmico neste animal. Neste momento, iniciou-se a contagem de 21 dias para a realização da coleta de amostras para as análises propostas.

Vale ressaltar que, para avaliação do edema das articulações destes animais, registrou-se a variação do diâmetro articular, no dia da imunização e no dia da realização da coleta de amostras, com o auxílio de um paquímetro analógico (precisão 0,05 mm).

### **3.6 Pesagens**

Os animais foram pesados em balança (modelo 9094c/5, Toledo, Brasil) em três momentos: no início do protocolo experimental, ou seja, no dia da castração/falsa-castração, no dia da imunização/falsa-imunização e no dia da coleta de amostras – imediatamente antes da morte destes animais.

No momento da morte dos animais, coletou-se coração, rins, órgãos sexuais internos (epidídimos e ductos deferentes) e glândulas acessórias (glândula seminal e próstata) e patas. Estas amostras foram pesadas em balança analítica (modelo AB204, Toledo, Brasil) e suas respectivas massas (g) foram normalizadas pela massa corporal total do animal (Kg). A pesagem dos órgãos sexuais foi realizada para se constatar a efetividade da castração cirúrgica bilateral (VALLE et al., 1982). Por sua vez, a pesagem das patas também forneceu indícios do processo inflamatório articular decorrente da artrite experimental.

### **3.7 Protocolo de coleta do plasma**

Amostras de sangue foram obtidas com o auxílio de seringas secas, pela punção da veia cava (no momento da morte dos animais) e imediatamente transferidas para tubos de coleta de sangue à vácuo contendo o anticoagulante EDTA. Estas amostras de sangue foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante (plasma) foi recuperado,

fracionado e estocado à -80°C para posteriores análises bioquímicas (detalhadamente descritas na sequência).

### **3.8 Ferric Reducing Activity of Plasma - FRAP**

Para determinação da capacidade antioxidante do plasma foram transferidos para um tubo de ensaio 80µl de plasma homogeneizado de cada animal, adicionado a 0,250 µL de água destilada e 2,4 ml do reagente FRAP (solução-tampão acetato a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L: 2,7 g de acetato de sódio anidro + 16 ml de ácido acético glacial para 1 litro de água destilada, pH=3,6; ferritripiridiltriazina (TPTZ) a  $10^{-3}$  mol/L em HCl  $4 \times 10^{-3}$  mol/L e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   $2 \times 10^{-3}$  mol/L na proporção 10:1:1). Esta composição foi então incubada a 37° C durante 15 minutos. A absorbância do complexo (TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com  $\text{Fe}^{3+}$ ) de coloração azul é lido em comparação ao reagente branco (reagente de FRAP) a 593 nm. Para tanto, a leitura da absorbância foi realizada pela leitora de microplaca, onde são transferidos 200 µL da reação em cada poço. Soluções padrão de  $\text{Fe}^{2+}$  na faixa de 0 a  $2 \times 10^{-5}$  mol/L foram preparadas a partir de sulfatos ferrosos ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em água destilada. Os dados são expressos em µmol íons férricos reduzidos a íons ferrosos por litro (BENZIE; STRAIN, 1996).

### **3.9 Quantificação da peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica, que indica o grau de estresse oxidativo do meio biológico, foi estimada pela análise do consumo de peróxido – Xylenol Orange (*ferrous oxidation-xylenol orange*, FOX), segundo a técnica descrita originalmente por Jiang et al. (1991) e adaptada para plasma e soro por Arab e Steghens (2004). Esta metodologia baseia-se na oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  na presença de hidroperóxidos lipídicos e formação de complexos de  $\text{Fe}^{3+}$  com o xilenol laranja, gerando uma cor característica, a qual pode ser medida espectrofotometricamente em 560 nm. O ensaio foi realizado em um reagente de trabalho (metanol absoluto 81%; xylenol orange 100 µmol;  $\text{H}_2\text{SO}_4$  25 mM; BHT 40 mM; sulfato ferroso 250 µmol), no qual foram determinados os hidroperóxidos em amostras de plasma. A quantificação dos níveis de peróxidos foi realizada a partir da comparação com uma curva padrão de peróxido de cumeno (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 e 0 µM).

### **3.10 Avaliação das concentrações de nitrito e nitrato por método de Griess**

Para essa análise, utilizou-se metodologia descrita por GRANGER et al. (1996), com algumas adaptações. Mais especificamente, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  de amostras de plasma foram transferidas em tubos tipo *ependorff* contendo 250  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 20 mM, 25  $\mu\text{L}$  de cofator NADPH 1,8  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{L}$  de enzima nitrato redutase 1 U/mL, seguida de incubação por 1:30 h à 37 °C. Após esse período, adicionou-se *Phenazine Methosulphate* 80  $\mu\text{M}$  e 120  $\mu\text{L}$  sulfato de zinco 0,5 M diluído em etanol 50 % e ainda  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,5 M para desproteíntização das amostras, seguida de uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas. Adicionou-se o reagente de Griess I (sulfanilamida 1 % diluído em HCL 3 N) e após 5 minutos adicionou-se o reagente de Griess II (Naftilenodiamina 0,1 % diluído em HCl 3N). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro à 540 nm. A concentração de nitrito foi calculada a partir da curva de calibração com concentrações conhecidas de  $\text{NaNO}_2$  (20 mM). A partir da curva de calibração foram calculados os coeficientes de regressão.

### **3.11 Determinação do ácido úrico**

Para esta análise do ácido úrico no plasma dos animais estudados, utilizou-se o kit comercial de reagentes Ácido Úrico Liquiform – Labtest<sup>®</sup>. O princípio deste kit fundamenta-se na oxidação do ácido úrico, pela uricase, a alantoína e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio recém-formado, na presença da peroxidase, reage com o DHBS e a 4 aminoantipirina, formando o cromogênio antipirilquinonimina, de cor vermelha, que pode ser lido em 490-540 nm.

### **3.12 Determinação de testosterona plasmática**

Amostras de plasma, devidamente armazenadas, foram submetidas à determinação dos níveis hormonais de testosterona por quimioluminescência (YILMAZ et al., 2006) realizada pelo Grupo São Camilo – Medicina Diagnóstica, Maringá/PR.

### **3.13 Isolamento e montagem das preparações de aorta torácica para estudo funcional de reatividade vascular**

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico - Thiopentax® (200µL/100g à uma concentração de 50mg/mL, via intraperitoneal) e exanguinados. Imediatamente após a morte dos animais, a aorta torácica foi dissecada e transferida para uma placa de Petri recoberta com parafina. Com o auxílio de uma lupa, estas aortas foram separadas dos tecidos adjacentes, seccionadas em anéis de 4 mm e fixadas entre 2 ganchos de metal (inseridos no lúmen). Em seguida, estes anéis foram montados em cubas para estudo de órgãos isolados, com capacidade para 2 mL. Neste ambiente, os anéis foram mantidos sob tensão de 1,5 gf e imersos em solução nutritiva de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 130,0; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub>1,6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2; MgSO<sub>4</sub> 1,2; NaHCO<sub>3</sub> 15,0 e glicose 11,1), com pH ajustado para 7,4, gaseificada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub>e 5% CO<sub>2</sub>) e aquecida a 37°C. Um dos ganchos de metal foi conectado a um suporte fixo ajustável e o outro, a um transdutor isométrico de força (modelo ML221, ADInstruments, Austrália). As modificações de tônus dessas preparações foram registradas através de sistema Powerlab 8/30 data-acquisition system (AD Instruments, Castle-Hill, NSW, Australia).

Antes da determinação das curvas concentração-resposta, as preparações foram mantidas em repouso por 60 minutos para se adaptarem a este ambiente artificial. Neste período, bem como durante todo o experimento, a solução nutritiva foi substituída a cada 20 minutos.

Para avaliação funcional da integridade endotelial, estas preparações foram pré-contraídas com noradrenalina (10<sup>-5</sup>M), e na sequência desafiadas com ACh (10<sup>-5</sup>M). Relaxamentos iguais ou superiores a 60% da pré-contração indicaram integridade endotelial. Em preparações cujo endotélio é removido mecanicamente (preparações deendotelizadas), relaxamentos induzidos por ACh (10<sup>-5</sup>M) ≤ 10%, indicaram efetividade da remoção endotelial.

### **3.14 Curvas concentração-resposta**

As preparações foram desafiadas com concentrações cumulativas de Ang II (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-6</sup> M), ACh (10<sup>-9</sup> a 10<sup>-4</sup> M), nitroprussiato de sódio (10<sup>-13</sup> a 10<sup>-7</sup> M) ou solução despolarizante (KCl 10<sup>-3</sup> mol/L a 12x10<sup>-3</sup> mol/L compensado pela redução do sódio em solução). Algumas preparações foram desafiadas em paralelo com Ang II e ACh na presença

do L-NAME ( $10^{-4}$  M), um inibidor não-seletivo de óxido nítrico sintase, Apocinina/Acetovanilona ( $10^{-4}$  M), um inibidor do complexo NAD(P)H oxidase, ou do Tiron ( $10^{-4}$  M), um *scavenger* de radicais livres. Paralelamente, outras preparações foram desafiadas com Ang II na presença do PD-123,319 ( $10^{-6}$  M), respectivo antagonista do receptor  $AT_2$ , da Indometacina ( $10^{-5}$  M), inibidor não-seletivo de cicloxigenases (COX), e em solução nutritiva de Krebs-Henseleit despolarizante formulada com KCl a 60 mM. Outras preparações foram desafiadas com Ang II na presença do L-NAME ( $10^{-4}$  M) acrescido de BQ-123 ( $10^{-6}$  M) e BQ-788 ( $10^{-6}$  M), respectivos antagonistas dos receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ , na presença do L-NAME ( $10^{-4}$  M) acrescido de Indometacina ( $10^{-5}$  M), ou na presença do L-NAME ( $10^{-4}$  M) em solução nutritiva de Krebs-Henseleit despolarizante formulada com KCl a 60 mM. Todos os antagonistas/inibidores empregados nessas incubações foram administrados diretamente ao banho de órgãos, 20 minutos antes do desafio das preparações.

As respostas vasomotoras induzidas por ACh, Ang II, KCl e nitroprussiato de sódio foram graficamente expressas como curvas concentração-resposta.

### 3.15 Análise de parâmetros farmacológicos

A partir destas curvas concentração-resposta foi obtido o  $pEC_{50}$ , que consiste no negativo do logaritmo, na base 10, da concentração molar do agonista responsável por 50% do efeito máximo ( $EC_{50}$ ). Este parâmetro foi calculado por regressão não linear através do *software* Prism 6.0® (GraphPad Software Corporation). Os efeitos contrátil/relaxante máximo desencadeado pelos desafios realizados sobre as preparações denominado  $E_{max}$ , também foram determinados. Este parâmetro corresponde ao efeito máximo que um agonista pode desencadear em um tecido sob determinadas condições experimentais.

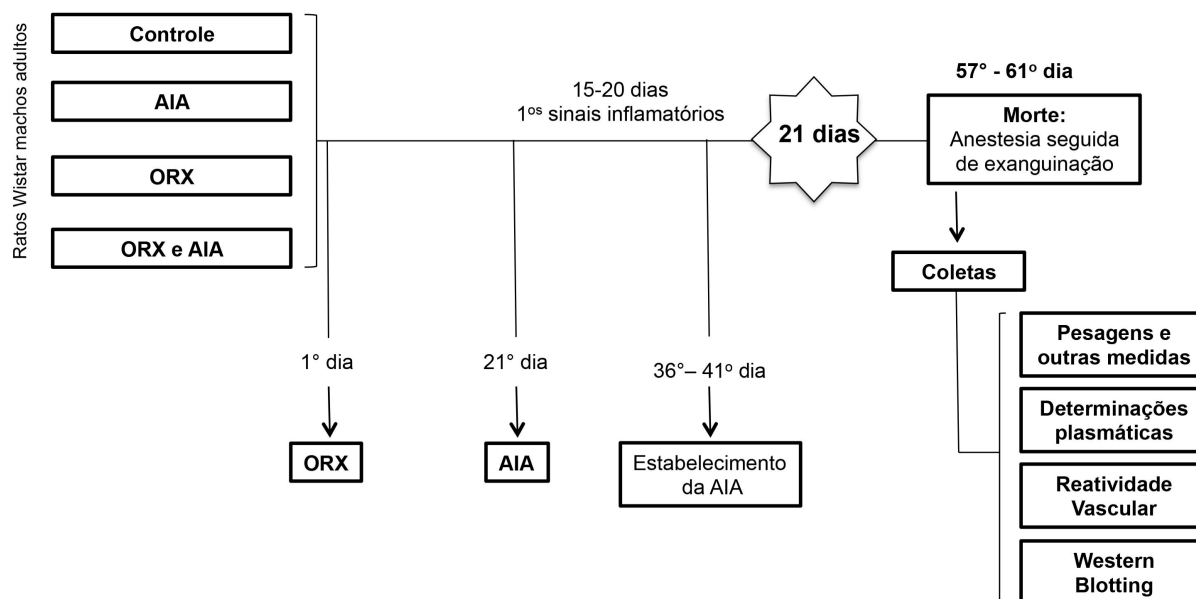
### 3.16 Avaliação da expressão proteica - Western Blotting

A técnica de Western Blotting foi utilizada para avaliar a expressão proteica de diferentes componentes do SRA - receptores  $AT_1$  e  $AT_2$  – em tecidos de aorta torácica dos diferentes grupos experimentais. Para essa técnica, amostras de aorta armazenadas em freezer  $-80$  °C foram homogeneizadas no Polytron em tampão apropriado (90 mM KCl, 10 mM Hepes, 3 mM  $MgCl_2$ , 5 mM EDTA, 1% glicerol, 1 mM DTT, 0,04% SDS; pH 7,4), juntamente com um mix de inibidores de proteases (20 mM aprotinina, 20 mM pepstatina, 20 mM leupeptatina, 40  $\mu$ M PMSF e 100 mM ortovanadato). O lisado proteico foi centrifugado a

10.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80 °C. A quantificação da concentração proteica das amostras foi obtida pelo Método de Bradford (Bradford, 1976) e calculada segundo a equação da reta obtida a partir da curva de concentração padrão com Albumina Sérica Bovina – BSA, sendo todas as amostras dosadas em duplicatas.

Para cada ensaio foram utilizados 50 µg de proteína, as quais foram separadas por eletroforese (140 volts por 1 hora e 30 minutos) mediante seu peso molecular em gel de 10% de SDS-Poliacrilamina (Sódio Dodecil Sulfato-Poliacrilamina) e, então transferidas (20 volts por 1 hora) para uma membrana de nitrocelulose (BioRad). Após o término da transferência, a membrana foi marcada com solução Ponceau para avaliar tanto a efetividade da transferência, como a existência da mesma quantidade de proteína nos diferentes poços. A membrana foi lavada com Tampão Salina Tris Tween-20 (TBST) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2% Tween-20; pH 7,5) por 10 minutos a temperatura ambiente para garantir a retirada por completo da solução Ponceau. As membranas foram incubadas a 4 °C, overnight, com anticorpo primário específico, anticorpo anti-AT1 (anti-rabbit, titulação 1:1000, Santa Cruz, código sc-1173), anticorpo anti-AT2 (anti-goat, titulação 1:1000, Santa Cruz, código sc-7420 ) e anti-GAPDH (anti-mouse, titulação 1:1000, Santa Cruz, código sc-32233). No dia seguinte, após lavagem com TBST 3 vezes por 10 minutos, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário ligado à peroxidase (anti-rabbit, titulação 1:10.000, Jackson, código 111-03-003; anti-goat, titulação 1:10.000, Jackson, código 705-03503) por 1 hora a temperatura ambiente e, lavadas novamente com TBST. A solução de ECL (Enhanced Chemiluminescence – Thermo Scientific®) foi adicionada e a membrana foi revelada mediante utilização do aparelho UVITEC Cambrigde. A banda correspondente as proteínas de interesse (receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>), bem como à da proteína de controle interno (GAPDH) foram quantificadas por meio do *Software* UVITEC (UVI-1D). Os resultados referentes à expressão das proteínas de interesse foram normalizados pelos valores da expressão da proteína de controle interno.

### 3.17 Diagrama experimental



### 3.18 Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos em mediana e intervalo interquartil (percentis de 25 e 75, respectivamente). A análise estatística dos resultados foi feita por testes não-paramétricos: teste de Mann-Whitney - para duas populações independentes (AIA e ORX), e teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn - para quatro populações independentes (Controle, AIA, ORX e ORX+AIA). Diferenças nos valores de  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Massa Corporal

Na pesagem dos animais realizada imediatamente antes da castração/falsa-castração, ou seja, antes que esses fossem distribuídos nos diferentes grupos experimentais, constatou-se massas corporais de  $359 \text{ g} \pm 7,51$ . No 21º dia do protocolo experimental, como já mencionado, os animais falso-castrados foram distribuídos entre os grupos controle e AIA, enquanto os castrados, entre os grupos ORX e ORX+AIA. Na pesagem dos animais realizada neste dia, imediatamente antes do procedimento de imunização/falsa-imunização, não foram

observadas diferenças significativas de massa corporal entre os grupos recém-constituídos (Tabela 1). Contudo, na pesagem realizada no 56º dia, antes dos animais serem mortos, o grupo ORX apresentou massas corporais menores em comparação aos animais controles. Massas corporais menores em relação ao grupo controle também foram observadas no grupo AIA. Por fim, observou-se também que o grupo ORX+AIA apresentou valores de massa corporal significativamente menores que os demais grupos. Caracterizando assim um efeito somatório entre AIA e castração sobre a massa corporal desses animais (Tabela 1).

**Tabela 1** - Massa corporal (g) dos animais determinada no dia da imunização e ao final do protocolo.

Dia	Grupos			
	Controle	ORX	AIA	ORX+AIA
21º	410 (360-430; 39)	375 (341-407; 35)	395 (370-442; 38)	375 (347-420; 33)
56º	445 (420-775; 37)	395* (360-432; 35)	360 ** (325-415; 38)	357,5 **, # (321-379; 36)

Valores expressos em medianas

Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

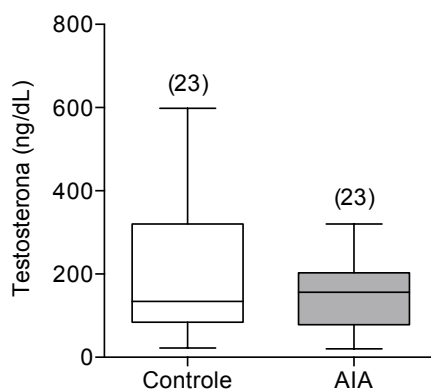
\* P<0,02; \*\*P<0,0001 em relação aos animais controle

# P<0,02 em relação aos animais ORX

Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn

## 4.2 Dosagem de testosterona plasmática

A AIA não promoveu uma redução significativa nos níveis plasmáticos de testosterona. Por outro lado, a ORX reduziu a testosterona plasmática a níveis desprezíveis, e, por este motivo não foi possível determinar seus valores nestes grupos experimentais. (Fig. 1).



**Figura 1** – Concentrações plasmáticas de testosterona expressas em ng/dL, de animais dos grupos Controle e AIA. Valores expressos em mediana ± intervalo interquartil (p25-p75). Entre parênteses, número de amostras.

### 4.3 Massa úmida dos órgãos sexuais internos e glândulas acessórias

Na Tabela 2 estão apresentadas as massas úmidas (g) dos órgãos sexuais internos e glândulas acessórias obtidas dos animais controle, ORX, AIA e ORX+AIA, normalizadas pela massa corporal total dos animais estudados. Esses dados mostram que a ORX reduziu a massa úmida dos epidídimos, ductos deferentes, glândulas seminais e próstata, evidenciando uma diferença significativa tanto em relação aos animais controle quanto em relação aos animais AIA. A AIA, por sua vez, não modificou significativamente a massa úmida dos órgãos sexuais internos e glândulas acessórias dos animais, independentemente da ORX (Tabela 2).

**Tabela 2** - Massa úmida (g) dos órgãos sexuais internos e glândulas acessórias.

	<b>Grupos</b>			
	<b>Controle</b>	<b>ORX</b>	<b>AIA</b>	<b>ORX+AIA</b>
<b>Epidídimos</b>	3,28 (2,97-3,72; 26)	0,33 <sup>*,#</sup> (0,22-0,57; 17)	3,66 (3,03-3,95; 27)	0,87 <sup>*,#</sup> (0,37-1,16; 12)
<b>Ductos Deferentes</b>	0,74 (0,62-0,84; 27)	0,22 <sup>*,#</sup> (0,17-0,27; 28)	0,76 (0,60-0,88; 27)	0,28 <sup>*,#</sup> (0,22-0,38; 28)
<b>Glândulas Seminais</b>	2,62 (2,19-3,48; 27)	0,33 <sup>*,#</sup> (0,25-0,40; 28)	2,20 (1,89-2,90; 27)	0,36 <sup>*,#</sup> (0,31-0,54; 27)
<b>Próstata</b>	1,24 (1,07-1,42; 27)	0,23 <sup>*,#</sup> (0,16-0,29; 28)	1,00 (0,73-1,30; 27)	0,21 <sup>*,#</sup> (0,18-0,49; 28)

Valores expressos em medianas

Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

\* P<0,0001 em relação aos animais controle

# P<0,0001 em relação aos animais AIA

Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn

### 4.4 Massa úmida e diâmetro das patas

Na Tabela 3 estão dispostas as massas úmidas (g) e na Tabela 4 os diâmetros (mm), das patas dianteiras, direitas e esquerdas, bem como, traseiras, direitas e esquerdas. Cabe ressaltar que a massa úmida das patas foram normalizadas pela massa corporal total dos animais estudados. Ademais, o diâmetro das patas foi registrado em dois momentos, no dia da imunização/falsa-imunização e no dia da coleta de amostras, identificados como Pré-

Imunização e Pós-Imunização, respectivamente. Esses dados mostram que a AIA promoveu um aumento significativo tanto da massa úmida quanto do diâmetro em todas as patas analisadas, independentemente da ORX. A ORX, por sua vez, não modificou a massa úmida, tampouco o diâmetro das patas dos animais estudados (Tabelas 3 e 4, respectivamente).

**Tabela 3** - Massa úmida (g) das patas.

Patas	Grupos			
	Controle	ORX	AIA	ORX+AIA
<b>Dianteira Direita</b>	1,81 (1,66-2,02; 26)	2,05 (1,89-2,18; 29)	2,61 <sup>*#</sup> (2,11-3,09; 26)	2,77 <sup>*#</sup> (2,33-3,14; 28)
<b>Dianteira Esquerda</b>	1,91 (1,70-2,06; 26)	2,02 (1,89-2,20; 29)	2,64 <sup>*#</sup> (2,39-2,95; 26)	2,79 <sup>*#</sup> (2,36-3,42; 28)
<b>Traseira Direita</b>	5,99 (5,57-6,50; 26)	6,46 (6,01-6,76; 29)	13,73 <sup>*#</sup> (12,16-15,31; 26)	14,33 <sup>*#</sup> (11,63-16,23; 28)
<b>Traseira Esquerda</b>	5,24 (4,82-5,59; 27)	5,55 (5,24-5,80; 29)	8,53 <sup>*#</sup> (7,16-9,43; 26)	8,72 <sup>*#</sup> (7,28-9,95; 27)

Valores expressos em medianas

Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

\* P<0,0001 em relação aos animais Controle

# P<0,0001 em relação aos animais ORX

Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn

**Tabela 4** - Diâmetro (cm) das patas determinados antes e após imunização/falsa-imunização.

Patas	Grupos			
	Controle	ORX	AIA	ORX+AIA
<b>Pré-imunização</b>				
<b>Dianteira Direita</b>	4,40 (4,40-4,54; 36)	4,40 (4,20-4,60; 38)	4,42 (4,20-4,60; 36)	4,40 (4,37-4,61; 34)
<b>Dianteira Esquerda</b>	4,45 (4,40-4,64; 36)	4,50 (4,40-4,70; 38)	4,50 (4,22-4,77; 36)	4,50 (4,40-4,70; 34)
<b>Traseira Direita</b>	4,82 (4,31-5,30; 38)	4,90 (4,27-5,30; 38)	4,75 (4,30-5,35; 39)	4,95 (4,50-5,40; 35)
<b>Traseira Esquerda</b>	4,67 (4,35-5,05; 38)	4,87 (4,40-5,35; 38)	4,85 (4,40-5,40; 39)	4,95 (4,50-5,50; 35)
<b>Pós-imunização</b>				
<b>Dianteira Direita</b>	4,55 (4,40-4,65; 36)	4,45 (4,35-4,65; 37)	5,10 <sup>*#</sup> (4,70-5,80; 35)	5,40 <sup>*#</sup> (4,85-6,05; 37)
<b>Dianteira Esquerda</b>	4,62 (4,41-4,80; 36)	4,40 (4,35-4,60; 37)	5,40 <sup>*#</sup> (5,00-6,20; 35)	5,40 <sup>*#</sup> (4,90-6,10; 37)
<b>Traseira Direita</b>	5,20 (4,82-5,54; 36)	5,35 (4,80-5,65; 37)	10,50 <sup>*#</sup> (9,40-12,10; 35)	10,70 <sup>*#</sup> (9,65-12,08; 37)
<b>Traseira Esquerda</b>	4,97 (4,70-5,49; 36)	5,00 (4,55-5,50; 37)	7,80 <sup>*#</sup> (6,80-8,60; 35)	8,05 <sup>*#</sup> (7,25-9,15; 37)

Valores expressos em medianas

Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

\* P<0,0001 em relação aos animais Controle

# P<0,0001 em relação aos animais ORX

Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn

#### 4.5 Massas úmidas do coração e rim

Na Tabela 5 estão apresentadas as massas úmidas (g) do coração e do rim direito, normalizadas pela massa corporal total dos animais estudados. Observou-se que a AIA promoveu um aumento significativo da massa tanto do coração, quanto do rim. A ORX, por sua vez, não influenciou a massa úmida destes órgãos em animais AIA, tampouco em animais não-imunizados (Tabela 5).

**Tabela 5** - Massa úmida (g) do coração e do rim direito

	<b>Grupos</b>			
	<b>Controle</b>	<b>ORX</b>	<b>AIA</b>	<b>ORX+AIA</b>
<b>Coração</b>	3,20 (3,00-3,44; 27)	3,26 (2,97-3,66; 28)	3,81 <sup>*#</sup> (3,60-4,09; 27)	3,79 <sup>*#</sup> (3,44-3,95; 28)
<b>Rim Direito</b>	3,11 (2,94-3,73; 26)	2,83 (2,59-3,19; 28)	3,58 <sup>*#</sup> (3,30-3,82; 26)	3,42 <sup>#</sup> (3,19-3,66; 27)

Valores expressos em medianas

Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

\* P<0,0001 em relação aos animais controle;

# P<0,0001 em relação aos animais ORX

Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn.

#### 4.6 Balanço redox do plasma

A AIA e a ORX não modificaram significativamente os valores de FRAP, nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ) e ácido úrico no plasma dos animais estudados. Todavia, a AIA diminuiu os valores de FOX em comparação aos valores dos animais do grupo controle (Tabela 6).

**Tabela 6** – Valores de FRAP, FOX,  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  e ácido úrico.

	<b>Grupos</b>			
	<b>Controle</b>	<b>ORX</b>	<b>AIA</b>	<b>ORX+AIA</b>
<b>FRAP (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	720,5 (552,2-894,6; 20)	923,2 (605,2-1363,0; 20)	718,3 (356,0-1274,0; 20)	677,2 (435,5-1071,0; 20)
<b>FOX (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	19,3 (12,5-23-7; 21)	9,9 (7,1-16,5; 19)	9,3 <sup>*</sup> (7,4-12,7; 19)	9,6 (7,1-19,7; 15)
<b><math>\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-</math> (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	21,2 (6,9-66-4; 19)	27,3 (7,1-56,5; 20)	34,5 (19,6-59,1; 20)	55,5 (32,8-63,8; 20)
<b>Ácido Úrico (ng/dL)</b>	2,5 (2,4-3,7; 11)	2,9 (2,5-4,5; 13)	2,7 (2,3-4,9; 12)	3,5 (2,1-4,5; 15)

Valores expressos em medianas

Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

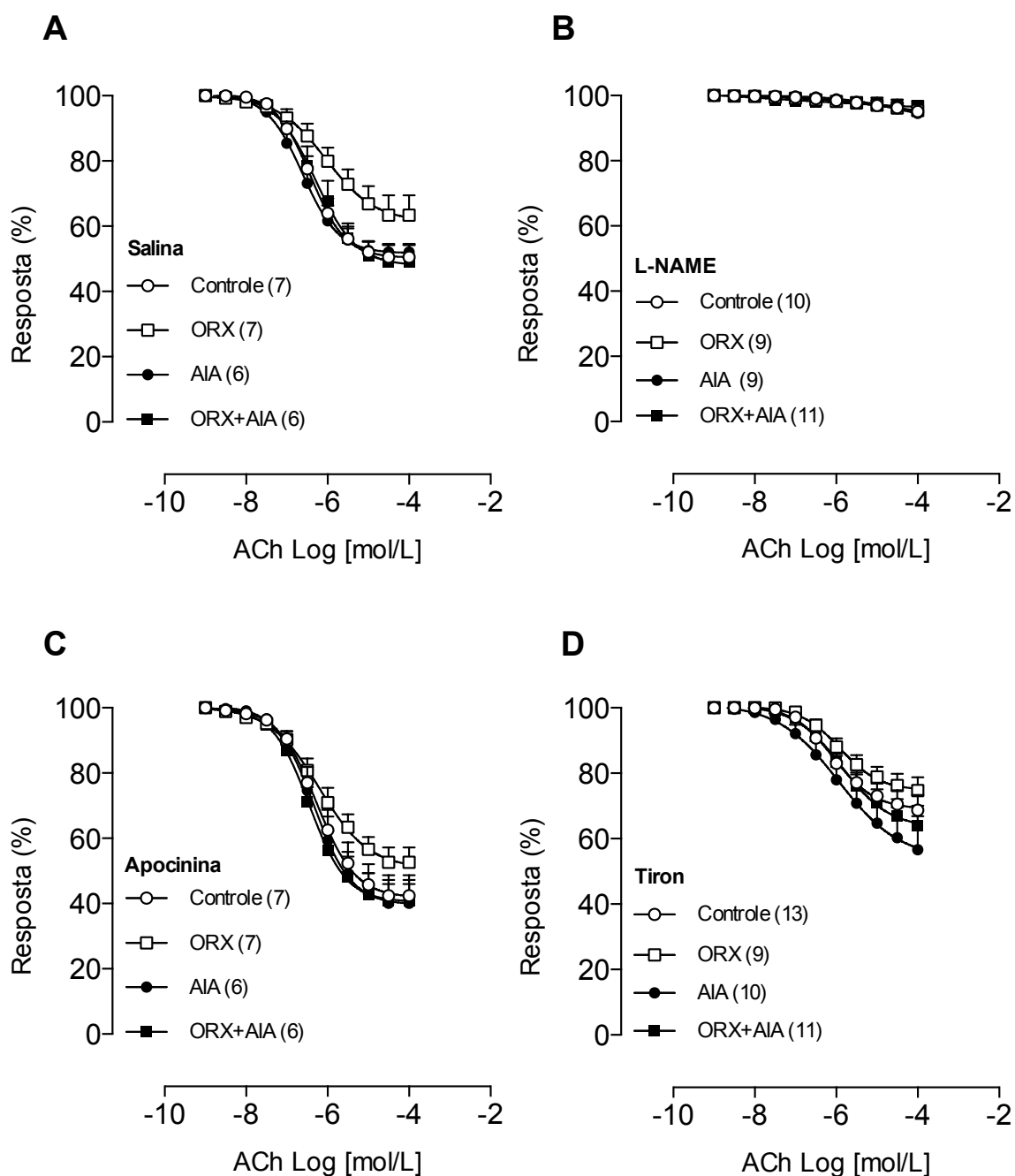
\* P<0,03 em relação aos animais Controle

Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn

#### 4.7 Estudo das respostas da aorta à ACh

Na Figura 2A são apresentadas as curvas concentração-resposta para a ACh obtidas em preparações de aorta torácica. Nota-se que a AIA não modificou o relaxamento induzido pela ACh nestas preparações. A ORX, por sua vez, reduziu o relaxamento induzido pela ACh nestas preparações. Todavia, essa redução de resposta à ACh não implicou em modificações estatisticamente significativas de  $E_{max}$  ou de  $pEC_{50}$  (Tabela 7).

A AIA e/ou ORX tampouco modificaram significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para ACh quando essas preparações foram estudadas na presença do L-NAME  $10^{-4}M$  (Fig. 2B), Apocinina  $10^{-4}M$  (Fig. 2C) ou Tiron  $10^{-4}M$  (Fig. 2D). Por conta disso, na presença desses tratamentos, não foram observadas diferenças significativas de  $E_{max}$  ou de  $pEC_{50}$  (Tabela 7) entre os grupos estudados. Cabe esclarecer que o parâmetro  $pEC_{50}$  não pode ser calculado na presença do L-NAME pois, nesta condição as respostas relaxantes à ACh foram suprimidas praticamente por completo.



**Figura 2** - Curvas concentração-resposta (relaxamento expresso como % da pré-contracção induzida por fenilefrina) para ACh determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (○), ORX (□), AIA (●) e ORX+AIA (■), na ausência (A) ou presença de L-NAME  $10^{-4}$ M (B), Apocinina  $10^{-4}$ M (C) ou Tiron  $10^{-4}$ M (D). Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras.

**Tabela 7** - Valores  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  para ACh determinados na ausência ou na presença de L-NAME ( $10^{-4}M$ ), Apocinina ( $10^{-4}M$ ) ou Tiron ( $10^{-4}M$ ).

Tratamentos	Grupos			
	Controle	ORX	AIA	ORX+AIA
<b><math>E_{max}</math></b>				
<b>Salina</b>	46,43 (41,61-56,55; 7)	66,15 (56,19-72,76; 7)	53,42 (46,00-56,84; 6)	44,29 (41,36-56,91; 6)
<b>L-NAME</b>	99,24 (91,27-100,00; 10)	99,95 (93,17-100,00; 9)	95,08 (64,93-99,86; 9)	99,90 (93,30-100,00; 11)
<b>Apocinina</b>	42,02 (29,28-48,52; 7)	54,57 (38,46-61,64; 7)	40,96 (30,88-52,89; 6)	39,95 (29,85-53,64; 6)
<b>Tiron</b>	69,45 (57,98-82,32; 13)	73,16 (65,45-84,37; 9)	59,14 (26,40-87,55; 10)	72,40 (51,58-77,37; 11)
<b><math>pEC_{50}</math></b>				
<b>Salina</b>	6,55 (6,25-6,68; 7)	5,89 (5,59-6,70; 7)	6,52 (6,22-6,77; 6)	6,45 (5,81-6,76; 6)
<b>L-NAME</b>	-	-	-	-
<b>Apocinina</b>	6,31 (5,88-6,39; 7)	6,32 (5,83-6,56; 7)	6,29 (6,05-6,50; 6)	6,48 (6,05-6,73; 6)
<b>Tiron</b>	6,07 (5,68-6,24; 13)	5,91 (5,40-6,30; 9)	6,06 (5,78-6,55; 10)	5,93 (5,61-6,24; 11)

Valores expressos em medianas

Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

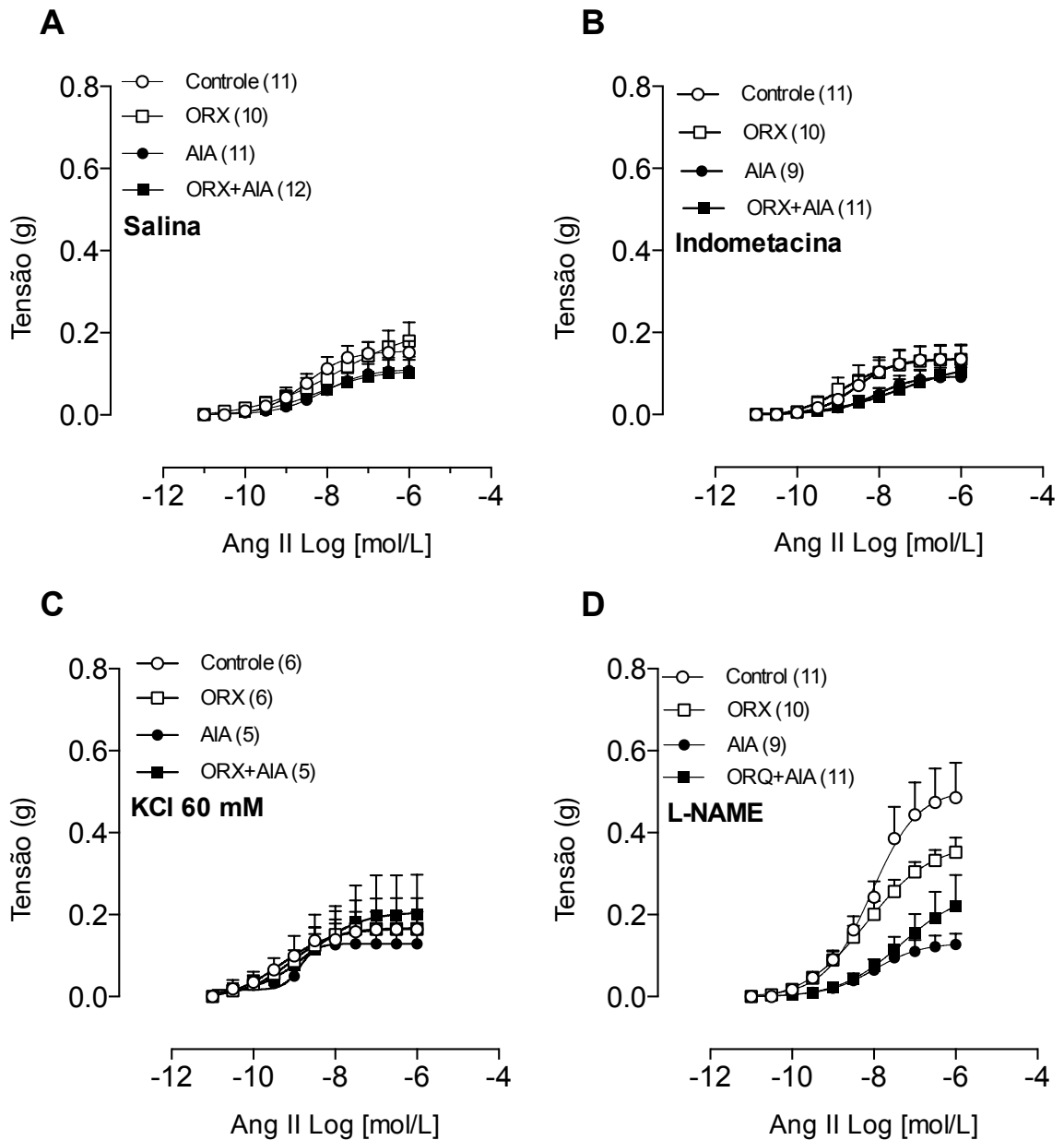
#### 4.8 Estudo das respostas da aorta à Ang II

Na Figura 3A são apresentadas as curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações de aorta torácica, obtidas dos diferentes grupos experimentais estudados. Essas curvas mostram que nem a AIA e tampouco a ORX modificaram o padrão das respostas à Ang II nestas preparações. Dessa forma, não foram observadas diferenças significativas de  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  (Tabela 8) para Ang II entre os grupos estudados.

#### 4.8.1 Influência do NO, prostanoídes e mecanismos hiperpolarizantes

A AIA também não modificou o padrão das curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações de aorta torácica incubadas com Indometacina  $10^{-5}$ M (Fig. 3B), ou naquelas desafiadas em cubas contendo solução nutritiva despolarizante (Fig. 3C). Logo, não foram observadas diferenças significativas em termos de  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  (Tabela 8) entre os grupos estudados.

Por outro lado, na presença do L-NAME  $10^{-4}$ M as respostas à Ang II em preparações de aorta torácica obtidas dos grupos falso-imunizados (controle e ORX) foram maiores em comparação ao grupo AIA (Fig. 3D). Essas diferenças foram significativas em termos de  $E_{max}$ , mas não de  $pEC_{50}$  (Tabela 8). Analisando-se comparativamente as figuras 3A e 3D, percebe-se que essas modificações de resposta entre grupos foram evidenciadas porque o tratamento com L-NAME elevou o  $E_{max}$  da Ang II nos animais falso-imunizados, sem contudo, elevar essas respostas nos animais AIA e ORX+AIA.



**Figura 3** - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (o), ORX (□), AIA (•) e ORX+AIA (■), na ausência (A) ou na presença de Indometacina  $10^{-5}$ M (B), solução nutritiva de Krebs- Henseleit hiperpolarizante (KCl 60 mM; C) ou L-NAME  $10^{-4}$ M (D), Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras.

**Tabela 8** - Valores  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  para Ang II determinados em preparações estudadas na ausência ou na presença de Indometacina  $10^{-5}M$ , solução nutritiva despolarizante (KCl 60 mM) ou L-NAME  $10^{-4}M$ .

Tratamentos	Grupos			
	Controle	ORX	AIA	ORX+AIA
<b><math>E_{max}</math></b>				
<b>Salina</b>	0,150 (0,076-0,198; 11)	0,146 (0,074-0,264; 10)	0,067 (0,018-0,201; 11)	0,073 (0,023-0,126; 12)
<b>Indometacina</b>	0,120 (0,38-0,272; 12)	0,126 (0,041-0,200; 11)	0,061 (0,034-0,144; 9)	0,120 (0,041-0,270; 8)
<b>KCl 60 mM</b>	0,091 (0,049-0,265; 6)	0,170 (0,057-0,254; 6)	0,126 (0,032-0,226; 5)	0,177 (0,035-0,376; 5)
<b>L-NAME</b>	0,529 (0,178-0,657; 10)	0,327 (0,260-0,411; 10)	0,122 <sup>**,#</sup> (0,062-0,166; 9)	0,151 (0,063-0,326; 11)
<b><math>pEC_{50}</math></b>				
<b>Salina</b>	8,34 (8,16-8,45; 11)	8,18 (7,57-8,60; 10)	8,05 (7,93-8,54; 11)	8,25 (7,84-8,64; 12)
<b>Indometacina</b>	8,40 (8,02-8,73; 12)	8,60 (7,97-9,10; 11)	8,12 (7,81-8,26; 9)	7,87 (7,14-8,43; 8)
<b>KCl 60 mM</b>	9,35 (8,15-9,94; 6)	9,11 (9,01-9,20; 6)	8,85 (8,50-9,34; 5)	8,67 (8,41-8,93; 5)
<b>L-NAME</b>	8,05 (7,87-8,54; 10)	8,15 (7,22-8,50; 10)	7,90 (7,41-8,48; 9)	7,69 (7,04-8,33; 11)

Valores expressos em medianas

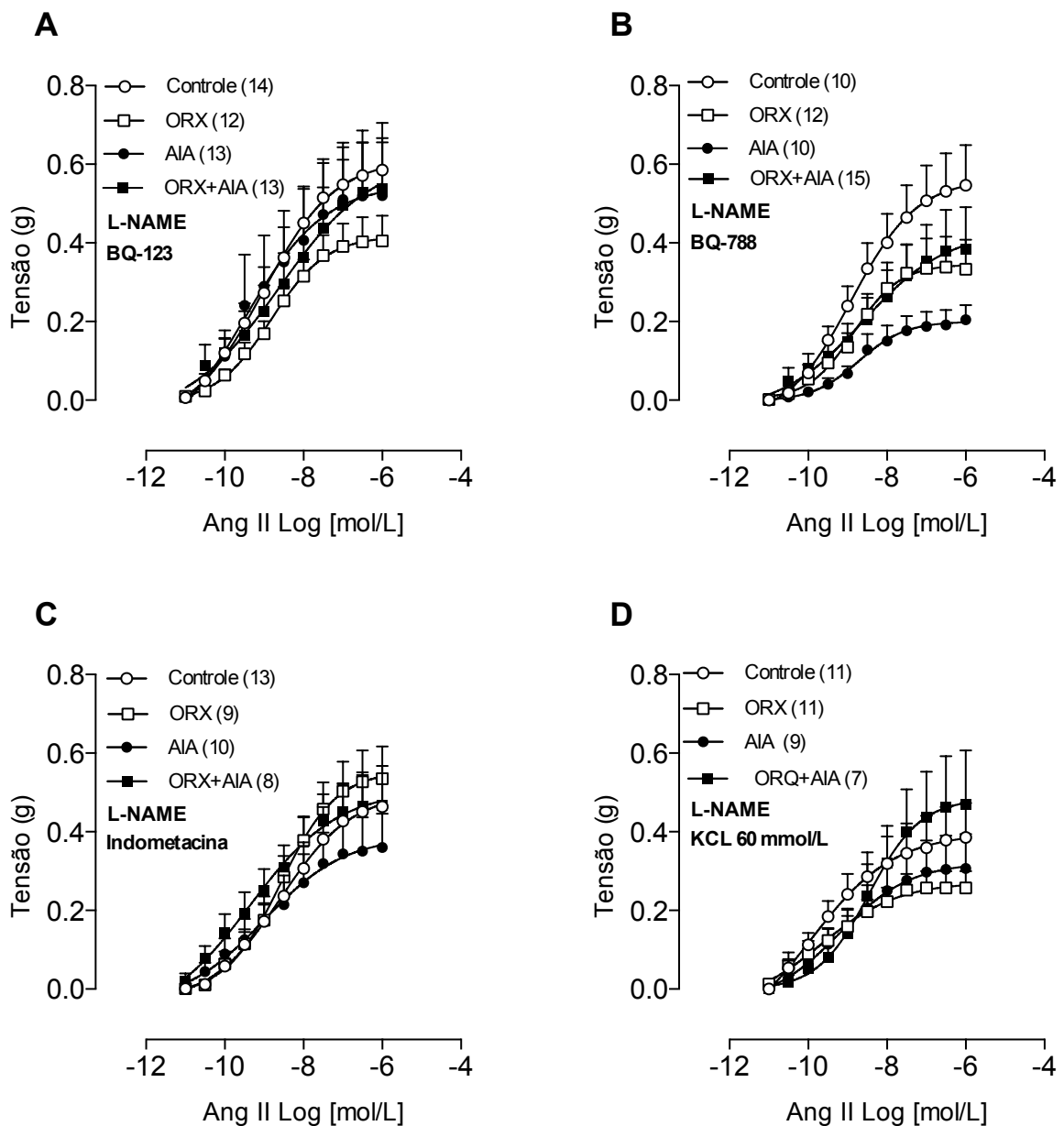
Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

\*\*  $P < 0,005$  e #  $P < 0,02$  em relação aos animais controle e ORX, respectivamente; Kruskal-Wallis, seguida por pós-teste de Dunn.

#### 4.8.2 Interação do NO com endotelina, prostanoídes e mecanismos hiperpolarizantes

Na presença simultânea de L-NAME e BQ-123, as preparações obtidas de todos os grupos estudados apresentaram um padrão de resposta à Ang II de magnitude similar àquelas

obtidas nas preparações dos animais do grupo controle. Por conta disso, não foram observadas diferenças significativas de  $E_{max}$  ou  $pEC_{50}$  (Tabela 9) entre os grupos experimentais. Já na presença concomitante do L-NAME e do BQ-788, as respostas à Ang II em preparações obtidas nos animais controle foram maiores em comparação aos demais grupos analisados. Além disso, as respostas à Ang II observadas nas preparações de animais ORX foram maiores em comparação às observadas nos animais ORX+AIA. Essas diferenças de resposta de Ang II entre grupos, no entanto, não implicaram em diferenças significativas de  $E_{max}$  ou  $pEC_{50}$  (Tabela 9). Este padrão de resposta à Ang II, em que os animais imunizados apresentaram  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  muito próximos aos animais controles, também foi observado quando as preparações foram incubadas com L-NAME, concomitantemente à indometacina (Tabela 9) ou incubadas com L-NAME em meio contendo solução nutritiva despolarizante (Tabela 9).



**Figura 4** - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (○), ORX (□), AIA (●) e ORX+AIA (■), na presença concomitante de L-NAME  $10^{-4}$ M e BQ123  $10^{-6}$ M (A), BQ788  $10^{-6}$ M (B) ou Indometacina  $10^{-5}$ M (C), bem como, na presença do L-NAME  $10^{-4}$ M em cuba contendo solução de Krebs-Henseleit despolarizante (KCl 60 mM; D). Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras.

**Tabela 9** - Valores  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  para Ang II determinados na presença de L-NAME  $10^{-4}M$  associado ao BQ123  $10^{-6}M$ , BQ788  $10^{-6}M$ , Indometacina  $10^{-5}M$  ou solução nutritiva despolarizante (KCl 60 mM).

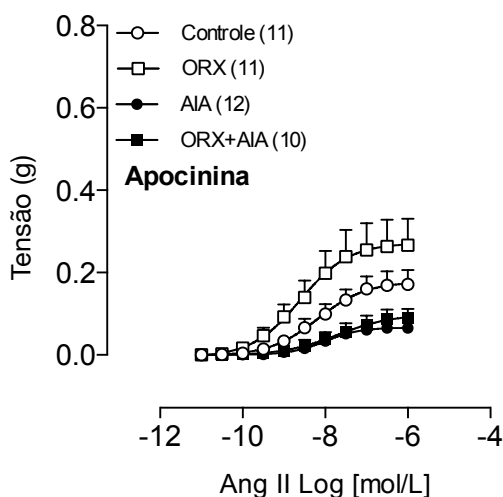
Tratamentos	Grupos			
	Controle	ORX	AIA	ORX+AIA
<b><math>E_{max}</math></b>				
<b>L-NAME + BQ123</b>	0,447 (0,172-0,975; 14)	0,442 (0,251-0,520; 12)	0,313 (0,161-0,757; 13)	0,468 (0,137-0,857; 13)
<b>L-NAME + BQ788</b>	0,556 (0,226-0,747; 10)	0,275 (0,125-0,502; 12)	0,217 (0,103-0,274; 10)	0,176 (0,097-0,586; 15)
<b>L-NAME + Indometacina</b>	0,316 (0,148-0,854; 13)	0,476 (0,410-0,754; 9)	0,328 (0,093-0,669; 10)	0,419 (0,335-0,711; 8)
<b>L-NAME + KCl 60 mM</b>	0,316 (0,102-0,588; 11)	0,187 (0,126-0,419; 11)	0,235 (0,126-0,422; 9)	0,626 (0,090-0,778; 7)
<b><math>pEC_{50}</math></b>				
<b>L-NAME + BQ123</b>	8,87 (8,54-9,53; 14)	8,71 (8,54-9,70; 12)	8,42 (7,82-9,36; 13)	8,36 (8,04-8,77; 13)
<b>L-NAME + BQ788</b>	8,89 (8,32-9,26; 10)	8,79 (8,56-9,65; 12)	8,53 (7,58-9,22; 10)	8,22 (7,93-9,36; 15)
<b>L-NAME + Indometacina</b>	8,42 (8,04-8,85; 13)	8,70 (8,13-9,25; 9)	8,70 (8,22-9,48; 10)	9,06 (8,97-9,65; 8)
<b>L-NAME + KCl 60 mM</b>	9,05 (8,05-9,45; 11)	9,23 (8,82-10,10; 11)	9,15 (8,63-9,69; 9)	8,47 (8,05-8,85; 7)

Valores expressos em medianas

Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

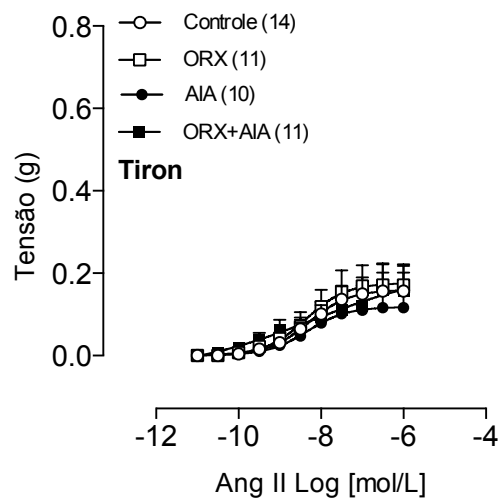
### 4.8.3 Influência de espécies reativas nas respostas da aorta à Ang II

Na presença da Apocinina, as respostas à Ang II nas preparações obtidas dos animais controle e, sobretudo dos animais ORX, foram claramente maiores em relação aos animais AIA e ORX+AIA. Por contra disso, os valores de  $E_{max}$  para Ang II obtidos no grupo ORX foram maiores em relação aos obtidos nos grupos AIA ou ORX+AIA [Controle 0,130 (0,069-0,279; 11), ORX 0,206 (0,099-0,462; 11), AIA 0,062<sup>\*</sup>, <sup>\*\*</sup> (0,039-0,094; 12) e ORX+AIA 0,078 (0,030-0,111; 10); \*P<0,05 e \*\*P<0,003 em relação aos animais ORX; Kruskal-Wallis, seguida por pós-teste de Dunn]. Por outro lado, nenhuma diferença intergrupos foi observada em termos de  $pEC_{50}$  [Controle 8,03 (7,67-8,45; 11), ORX 8,37 (7,65-9,00; 11), AIA 7,91 (7,45-8,31; 12) e ORX+AIA 7,74 (6,86-8,17; 10)].



**Figura 5** - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (○), ORX (□), AIA (●) e ORX+AIA (■), na presença de Apocinina  $10^{-4}$ M. Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras.

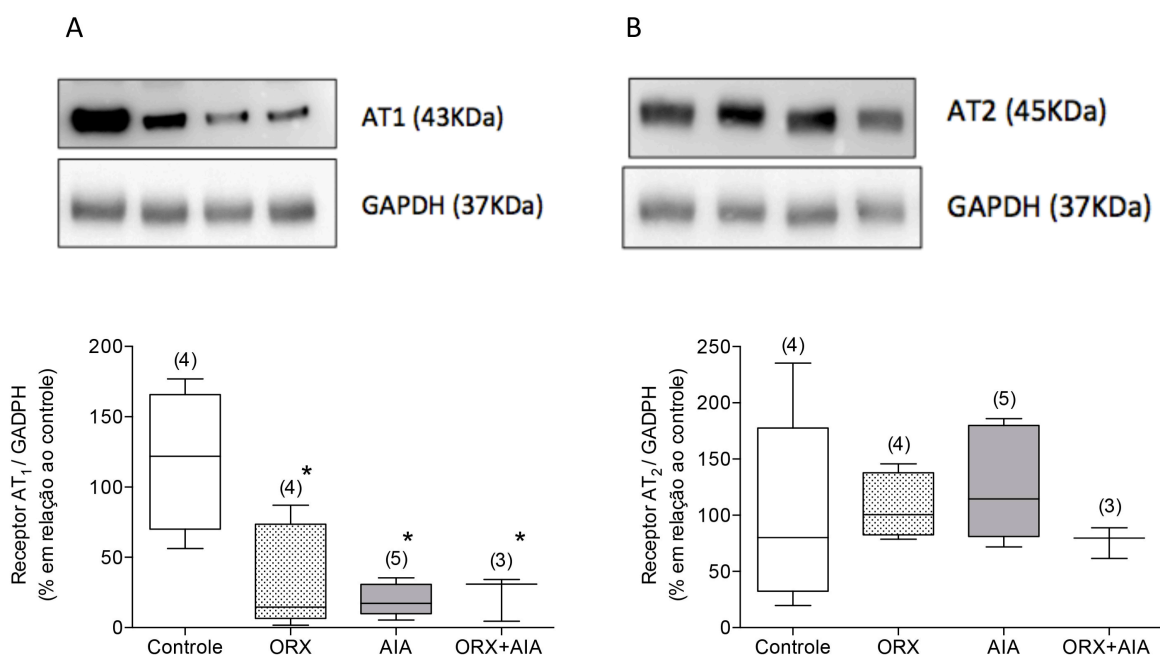
Na presença do Tiron, o padrão das curvas concentração-resposta para Ang II, determinadas em preparações isoladas de aorta não foi modificado tanto pela AIA quanto pela ORX. Assim, não foram observadas diferenças de  $E_{max}$  [Controle 0,130 (0,032-0,216; 14), ORX 0,147 (0,048-0,213; 11), AIA 0,048 (0,016-0,233; 10) e ORX+AIA 0,043 (0,017-0,305; 11)] e  $pEC_{50}$  [Controle 8,40 (8,22-8,60; 14), ORX 8,21 (7,82-8,50; 11), AIA 7,84 (7,61-8,34; 10) e ORX+AIA 8,34 (8,13-8,55; 11)] entre os grupos estudados.



**Figura 6** - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (o), ORX (□), AIA (•) e ORX+AIA (■), na presença de Tiron  $10^{-4}$ M. Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras.

#### 4.9 Estudo da expressão proteica para os receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> de Ang II em aortas

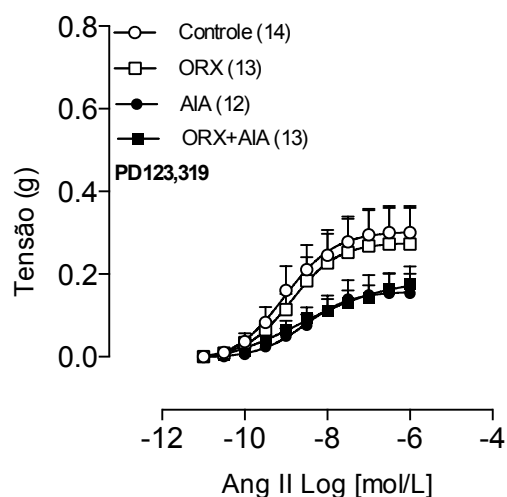
Os níveis de proteína do receptor de AT<sub>1</sub> em aortas obtidas de animais pertencentes aos grupos AIA, ORX ou ORX+AIA foram significativamente menores em comparação aos observados nas aortas dos animais controles (Fig. 8A). Por outro lado, os níveis de proteína do receptor AT<sub>2</sub> nestas preparações não diferiram entre os grupos estudados (Fig. 8B).



**Figura 7** – Expressão proteica dos receptores de Ang II subtipos AT<sub>1</sub> (A) e AT<sub>2</sub> (B), em relação à GAPDH, determinadas em aortas torácicas isoladas (parte superior) de animais pertencentes aos grupos Controle, ORX, AIA e ORX+AIA e quantificação densitométrica das bandas correspondentes (parte inferior). Valores expressos em mediana ± intervalo interquartil (p25-p75). \* P <0,05 em relação ao grupo Controle (Kruskal-Wallis seguido por pós-teste de Dunn). Entre parênteses, número de amostras.

#### 4.10 Participação dos receptores AT<sub>2</sub> nas respostas da aorta à Ang II

Na presença de PD123,319 10<sup>-6</sup>M, tanto a AIA quanto a ORX não modificaram significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para Ang II. Por conta disso, também não foram observadas diferenças significativas, em consequência da AIA e/ou da ORX, nos parâmetros de E<sub>max</sub> [Controle 0,220 (0,124-0,457; 14), ORX 0,179 (0,069-0,352; 13), AIA 0,082 (0,053-0,220; 12) e ORX+AIA 0,107 (0,041-0,279; 13)] e pEC<sub>50</sub> [Controle 8,56 (8,25-9,09; 14), ORX 8,78 (8,38-9,05; 13), AIA 8,31 (7,87-8,93; 12) e ORX+AIA 8,20 (7,86-9,00; 13)] para Ang II obtidos na presença de PD123,319, em consequência da AIA e/ou ORX.



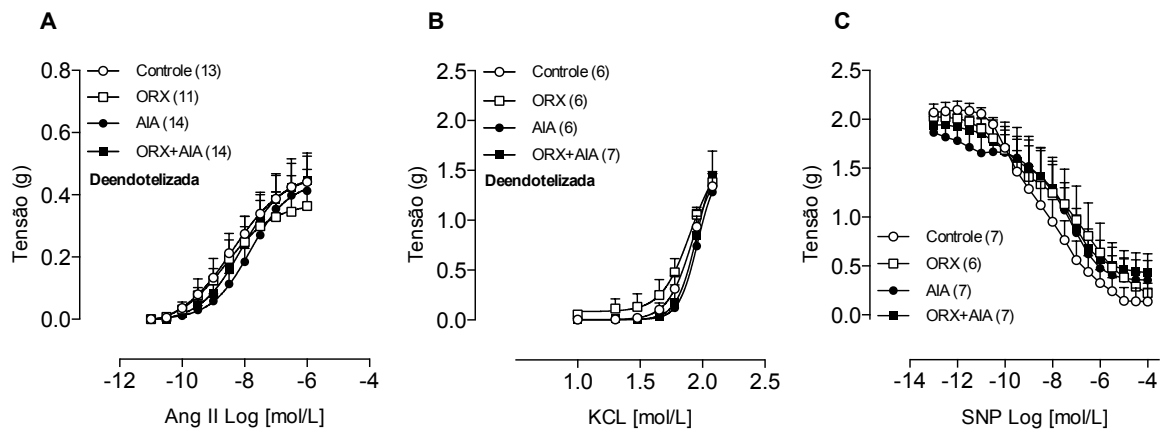
**Figura 8** - Curvas concentração-resposta para Ang II determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (○), ORX (□), AIA (●) e ORX+AIA (■), na presença de PD123,319  $10^{-6}$ M. Pontos representam média  $\pm$  E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras.

#### 4.11 Estudo das respostas à Ang II e ao KCl em aortas deendotelizadas, e ao nitroprussiato de sódio em aortas intactas

A deendotelização elevou as respostas à Ang II nas preparações de aorta torácica obtidas dos animais pertencentes aos quatro grupo estudados (Fig. 10A). Isto pode ser observado ao se comparar as  $E_{max}$  apresentadas na Figura 3A com as  $E_{max}$  apresentadas na Figura 10A. Todavia, apesar desta elevação na capacidade de resposta à Ang II decorrente da deendotelização, nenhuma diferença de  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  (Tabela 10) foi observada entre os grupos estudados.

Nessas preparações deendotelizadas, também não foram observadas modificações no padrão das curvas concentração-resposta para o KCL, induzidas pela ORX e/ou a AIA (Fig. 9B). Assim, não foram observadas diferenças significativas, em consequência da AIA e/ou ORX nos parâmetros de  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  obtidos a partir destas curvas concentração-resposta (Tabela 10).

A AIA, associada ou não à ORX também não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para nitroprussiato de sódio (Fig. 10C) determinadas em preparações isoladas de aorta torácica, com endotélio preservado. Do mesmo modo, não foram observadas diferenças significativas, em consequência da AIA e/ou ORX, nos parâmetros de  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  obtidos a partir destas curvas (Tabela 10)



**Figura 9** - Curvas concentração-resposta para Ang II (A) e KCl (B), determinadas em preparações de aorta torácica deendothelializadas, e para nitroprussiato de sódio (C), determinadas em preparações intactas, obtidas de animais pertencentes aos grupos Controle (○), ORX (□), AIA (●) e ORX+AIA (■). Pontos representam média ± E.P.M. O último ponto de cada curva concentração-resposta equivale ao  $E_{max}$  da resposta. Entre parênteses, o número de amostras.

**Tabela 10** - Valores  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  para KCL e nitroprussiato de sódio.

Tratamentos	Grupos			
	Controle	ORX	AIA	ORX+AIA
<b><math>E_{max}</math></b>				
<b>Ang II (E-)</b>	0,405 (0,144-0,636; 13)	0,337 (0,116-0,515; 11)	0,402 (0,207-0,559; 14)	0,403 (0,288-0,581; 14)
<b>KCL (E-)</b>	1,496 (1,005-1,563; 6)	1,395 (1,282-1,533; 6)	1,095 (0,924-1,719; 6)	1,513 (1,256-1,620; 7)
<b>Nitroprussiato de sódio (E+)</b>	0,000 (0,000-0,000; 7)	0,180 (0,000-0,476; 6)	0,000 (0,000-0,924; 7)	0,243 (0,000-0,873; 7)
<b><math>pEC_{50}</math></b>				
<b>Ang II (E-)</b>	8,17 (7,59-9,07; 13)	8,25 (7,31-8,60; 11)	7,91 (7,35-8,31; 14)	8,05 (7,57-8,37; 14)
<b>KCL (E-)</b>	-1,92 (-1,77 a -1,96; 6)	-1,88 (-1,69 a -1,93; 6)	-1,94 (-1,91 a -1,96; 6)	-1,95 (-1,92 a -1,96; 7)
<b>Nitroprussiato de sódio (E+)</b>	8,27 (7,36-9,68; 7)	7,91 (5,53-9,42; 6)	7,99 (7,41-8,37; 7)	7,93 (6,94-9,34; 7)

Valores expressos em medianas

Entre parênteses intervalo interquartil (p25-p75) seguido do número de animais avaliados

E-: preparações deendotelizadas.

E+: preparações intactas.

## 5 DISCUSSÃO

As manifestações da AR vão além de alterações centradas na sinóvia e articulações, visto que tecidos e órgãos como pele, vasos sanguíneos, coração, pulmões e músculos podem ser acometidos, principalmente naqueles pacientes com a doença articular mais grave (MOREIRA; CARVALHO, 1996; SKARE, 2007; CARVALHO; LANNA; BERTOLO, 2008). Pacientes artríticos com altos níveis de atividade inflamatória, provavelmente em

decorrência da inflamação sistêmica, podem desenvolver disfunção endotelial, o que resulta em aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (TORIGOE; LAURINDO, 2006; GABRIEL, 2008; LIMA; MASSABKI, 2009). Neste sentido, diversos estudos têm sido propostos visando compreender melhora disfunção endotelial que ocorre associada a AR.

Boa parte dos estudos que exploram mecanismos fisiopatológicos característicos da AR são realizados em modelos animais. Nestes modelos experimentais, o pesquisador pode abordar os mecanismos inflamatórios de forma mais direta, além de ter mais possibilidades de intervenção sobre os mesmos. Contudo, cabe ressaltar que os modelos experimentais de artrite nem sempre reproduzem com exatidão as condições fisiopatológicas da AR. Por conta disso, os dados obtidos nestes estudos experimentais não podem ser extrapolados de forma precipitada para o ser humano. Antes, é necessário o acúmulo de evidências em diferentes modelos experimentais, para que a extrapolação de dados para o ser humano seja feita de forma racional e segura. Neste sentido, o presente estudo propõe-se a contribuir nesta construção de conhecimento acerca das repercussões vasculares da AR.

O presente estudo fundamentou-se em evidências de um possível envolvimento do sistema renina-angiotensina nos danos cardiovasculares tanto na AR quanto em modelos experimentais que simulam a AR. Acredita-se que a angiotensina II (Ang II), por meio de uma ação em receptores AT<sub>1</sub>, agrave o comprometimento endotelial decorrente de inflamação sistêmica promovida pela artrite (FLAMMER et al., 2008; SAKUTA et al., 2010; SHI et al., 2012; MACKENZIE et al., 2013). Por outro lado, a literatura também relata a influência dos hormônios andrógenos, principalmente da testosterona, nas ações da Ang II sobre os tecidos vasculares (RECKELHOFF, 2005; KANG et al., 2012; MARIC-BILKAN; MANIGRASSO, 2012). De fato, existem evidências sugerindo que a testosterona acentua os efeitos vasculares da Ang II (SONG et al., 2006a; SONG et al., 2006b; SONG et al., 2010; OJEDA et al., 2010). Assim, o presente estudo buscou verificar se a testosterona, talvez modulando o balanço redox e consequentemente a atividade endotelial nestas preparações, pode participar de eventuais modificações de respostas da aorta à Ang II induzidas pela AIA.

Para que pudéssemos investigar com propriedade o papel da testosterona nas repercussões vasculares induzidas pela AIA, foi primeiramente necessário certificar-se de que o protocolo de castração utilizado era efetivo em reduzir os níveis séricos deste hormônio nos animais estudados. Essa investigação iniciou-se pela análise do ganho de massa corporal dos animais submetidos à castração, uma vez que a testosterona tem efeitos tanto virilizantes quanto anabolizantes (WANG et al., 2000). Nesta análise observamos que o ganho de massa corporal foi menor nos animais castrados, sobretudo no período compreendido entre o 21<sup>o</sup> e o

56º dias de seguimento pós-castração. Essa diferença provavelmente seja uma consequência da redução de testosterona nesses animais. O fato desta redução de massa corporal ter sido evidente no período mais tardio do protocolo, atingindo a significância no 56º dia, após a castração sugere que a redução da testosterona, e suas consequências sobre o organismo desses animais, vão se intensificando com o passar do tempo.

O ganho de massa corporal ao longo do protocolo experimental também foi menor no grupo dos animais AIA, em relação aos animais não-imunizados na última pesagem. É possível que este menor ganho de massa corporal nos animais AIA seja decorrente de uma sarcopenia, semelhante à observada na caquexia reumatoide. Na AR, este importante fator de comorbidade é resultado de diversas modificações fisiopatológicas como: anorexia, fadiga, mal-estar, alterações do sono, aumento da temperatura corporal, maior gasto energético em repouso, “supressão” medular, aumento das proteínas de fase aguda, balanço de nitrogênio negativo, hipoalbuminemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, entre outras, mediadas diretamente pelas citocinas pró-inflamatórias (ROCHA et al., 2009; TEIXEIRA; FILIPPINI; XAVIER, 2012). Tem sido proposto que o grau da caquexia reumatoide esteja diretamente relacionado com a intensidade da sinovite, o que leva a um círculo vicioso (ROCHA et al., 2009). Assumindo que o menor ganho de massa corporal observado no presente estudo, após a indução da AIA, seja de fato um fenômeno relacionado à caquexia reumatoide, esta é mais uma evidência de que o modelo de artrite utilizado reproduz a AR. Por fim, cabe ressaltar que, as massas corporais do grupo AIA+ORX foram ainda menores que as observadas nos grupos AIA e ORX isoladamente, caracterizando assim um efeito somatório entre a AIA e a castração sobre a massa corporal desses animais. Este efeito somatório indica que, a sarcopenia decorrente da artrite pode ser mais grave em situações de hipoandrogenismo.

No presente estudo, as repercussões da castração nas concentrações plasmáticas de testosterona também foram demonstradas de forma direta, através da dosagem de testosterona plasmática. Constatou-se que entre os animais castrados, os níveis plasmáticos de testosterona reduziram-se a valores não detectáveis pela metodologia empregada. Vale ressaltar que, a dosagem dos níveis plasmáticos de testosterona é o “padrão-ouro” para validação dos procedimentos de castração. Por fim, a efetividade da castração foi reforçada nos animais estudados, pela atrofia dos órgãos sexuais internos (epidídimos e ductos deferentes) e das glândulas acessórias (glândulas seminais e próstata) (MATSUDA et al., 1994; McKEE et al., 2003; BLANCO-RIVERO et al., 2006; ROSSIGNOLI; PEREIRA; CHIES, 2010). Isto posto, ainda cabe ressaltar que a redução de massa úmida observada nas vias espermáticas (epidídimos e ductos deferentes), provavelmente decorra da perda de

conteúdo celular e reabsorção espermática, enquanto a redução de massa úmida nas glândulas acessórias (glândulas seminais e próstata) associa-se à alterações tanto estruturais quanto funcionais decorrentes da intensa queda de testosterona. (TOSHIMORI, 2003; CAMPION et al., 2012). Ademais, reduções semelhantes de massa úmida de órgãos sexuais foram observados por outros estudos, confirmando assim a validade e a uniformidade dos procedimentos cirúrgicos realizados nestes animais. (ROSSIGNOLI; PEREIRA; CHIES; 2010).

Estudos prévios já discutiram a complexa interação entre hormônios esteroides e as doenças autoimunes, mais precisamente a AR. De fato, observou-se que o desenvolvimento, assim como, a gravidade da AR estão diretamente relacionados aos baixos níveis de andrógenos gonadais e adrenais. Além disso, a relação hormonal “andrógeno/estrógeno” encontra-se reduzida em pacientes AR, tanto homens quanto mulheres (CUTOLO, 2000). Segundo este estudo, isto pode justificar-se pelo fato dos andrógenos serem imunossupressores. Reforçam essa hipótese, os estudos que demonstram uma redução dos níveis de testosterona sérica tanto em pacientes do sexo masculino com AR, quanto em ratos machos submetidos à AIA (BARBIER; BRELIERE; RONCUCCI, 1985; GORDON et al., 1986; BRUOT; CLEMENS, 1987; CLEMENS; BRUOT, 1989). A terapia de reposição hormonal realizada ao longo de 6 meses em homens com AR, por sua vez, resultou na redução do número de articulações acometidas, bem como, na diminuição do consumo de anti-inflamatórios não-esteroidais (CUTOLO, 2000). Em modelos animais, observou-se que a reposição com testosterona, tanto em altas quanto em baixas doses, preveniu os danos articulares inerentes à artrite (HARBUZ et al., 1995). Todavia, no presente estudo, a AIA não modificou os níveis plasmáticos de testosterona e tampouco influenciou a massa úmida dos órgãos sexuais estudados dos animais castrados e não-castrados.

Feita a validação do procedimento de ORX, era também necessário confirmar se o protocolo de indução de AIA, utilizado no presente estudo, era efetivo em promover um processo inflamatório poliarticular. O acometimento articular induzido pela AIA foi constatado primeiramente pela ectoscopia, com foco nas patas dos animais imunizados. Segundo esta análise, todos os animais imunizados desenvolveram sinais clássicos de um processo inflamatório articular, caracterizado sobretudo por eritema e edema. Paralelamente, observou-se um aumento significativo da massa úmida das patas dos animais AIA em relação aos animais não-imunizados. Considerando que a AIA reproduza muitos mecanismos fisiopatológicos da AR, essas manifestações articulares provavelmente decorram da deposição da fibrina, hiperplasia de células sinoviais, infiltração mononuclear, formação de

*pannus*, destruição óssea e cartilaginosa (OLIVER; BRAHN, 1996; BENDELE et al., 1999; BENDELE, 2001; HEGEN et al., 2008). É válido salientar que a castração não influenciou o aumento da massa úmida das patas dos animais AIA. Essa informação é relevante pois, os estudos que avaliam as modificações vasculares induzidas por artrite podem ser criticados, visto que a gravidade do processo inflamatório articular influencia as manifestações vasculares. Assim, intervenções que atenuem os danos da artrite sobre o sistema cardiovascular de humanos ou animais submetidos à artrite podem, na verdade, ter seus efeitos no processo inflamatório das articulações acometidas e não diretamente nos vasos. Neste sentido, melhorias nos parâmetros cardiovasculares seriam apenas uma consequência da atenuação da inflamação articular. No presente estudo, entretanto, as manifestações articulares induzidas por AIA não foram influenciadas pela castração. Desta forma, podemos dizer que quaisquer alterações induzidas pela ORX no perfil das respostas à Ang II, eventualmente observadas nos animais AIA, não são resultado de modificações no processo inflamatório articular.

A AIA também promoveu um aumento na massa úmida do coração, que pode ser interpretado como hipertrofia. A hipertrofia cardíaca pode ser classificada como fisiológica ou patológica. A primeira está associada a funções cardíacas normais, tais como crescimento normal da criança, exercício físico e gravidez, enquanto a segunda, está associada a disfunções cardíacas como fibrose, rarefação capilar, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e disfunção celular, além de alterações epigenéticas indesejáveis (SHIMIZU; MINAMINO, 2016). Neste sentido, inferimos, com reservas, que o aumento de massa úmida cardíaca observada nos animais AIA está associado à hipertrofia do ventrículo esquerdo. Estudos têm sugerido que a hipertrofia do ventrículo esquerdo pode ser um importante marcador de risco para eventos cardiovasculares, em pacientes com AR. De fato, observou-se que pacientes com AR ativa apresentam a parede do ventrículo esquerdo mais espessa em comparação a pacientes com AR em remissão ou pacientes saudáveis (MYASOEDOVA et al., 2013; MIDTBØ et al., 2015).

No presente estudo, observamos que a AIA também leva a um aumento da massa úmida do rim direito. Esta análise foi realizada apenas em rins direitos porque entendemos que tanto a castração quanto a AIA têm repercussões sistêmicas. Assim, assumimos que modificações no rim direito refletem o que ocorre no rim contralateral. A literatura é menos clara em relação às ações da AIA sobre as estruturais renais, em comparação ao coração. Possivelmente, este aumento de massa úmida do rim direito indique uma ação hipertrófica da AIA sobre os rins, semelhante à observada no coração. De fato, em um modelo de artrite

induzida por colágeno desenvolvido em camundongos, observamos acometimentos no leito vascular renal semelhantes aos observados no leito vascular cardíaco (PALMA ZOCHIO TOZZATO, et al., 2016). Esses dados, embora úteis para demonstrar os efeitos extra-articulares do modelo de artrite empregado, são achados que extrapolam os objetivos do presente estudo e deverão ser investigados de forma mais detalhada em projetos futuros. Não obstante, cabe ressaltar que a castração não influenciou o aumento da massa úmida do coração e do rim direito dos animais tanto imunizados quanto não-imunizados.

Uma vez confirmada a efetividade dos procedimentos de castração e AIA, passamos à investigação das repercussões cardiocirculatórias da AIA e/ou da castração sobre o balanço redox no plasma dos animais estudados. De fato, doenças autoimunes, incluindo a AR e seus modelos experimentais, não apenas levam à destruição articular, como também propiciam uma condição de estresse oxidativo sistêmico (HARUNA et al., 2006, 2007; MÄKI-PETÄJA et al., 2008).

Avaliou-se inicialmente as defesas antioxidantes não-enzimáticas presentes no plasma dos animais pelo FRAP, que determina a concentração de íons férricos reduzidos a íons ferrosos. Assim, um plasma rico em substâncias antioxidantes reage com os íons férricos presentes no meio, reduzindo-os a íons ferrosos. Em contrapartida, um plasma carente de substâncias antioxidantes pouco reage com os íons férricos do meio (KANIE; KAMATA, 2000). Os dados obtidos mostram, que a AIA, associada ou não à ORX, não promoveu nenhuma diferença significativa nos valores de FRAP entre os grupos estudados. Esses dados confrontam estudos prévios que observaram uma redução na capacidade antioxidante plasmática de indivíduos artríticos (BRENNAN; O'NEILL, 1998; TOGARI et al., 1998). Todavia, a literatura acerca da capacidade antioxidante plasmática em indivíduos com AR é contraditória, pois outros estudos não observaram modificações desse parâmetro nessa condição fisiopatológica (SARBAN et al., 2005). Esses dados não excluem, todavia, que o estresse oxidativo nos animais submetidos à AIA esteja ocorrendo localmente, em alguns leitos vasculares, de forma que não haja um consumo perceptível das defesas antioxidantes não-enzimáticas avaliadas pelo FRAP.

Em concordância com os dados do FRAP, observamos também que AIA e/ou ORX não modificaram significativamente as concentrações plasmáticas de ácido úrico nos animais estudados. Na verdade, o ácido úrico é uma importante defesa antioxidante não-enzimática e é responsável por cerca de 60% do poder antioxidante avaliado pelo FRAP (FABBRINI et al., 2014). Este dado também reforça a hipótese de que não houve um excessivo consumo das

defesas antioxidantes não-enzimáticas presentes no plasma em nenhum dos grupos experimentais

Os dados de ácido úrico, por outro lado, conflitam com a literatura. Hannawi e colaboradores (2017) correlacionaram a hiperuricemia ao aumento na espessura da camada íntima-medial da carótida comum em pacientes com AR. Corrobora o estudo de Lee et al (2016) com este achado, que observou que o controle da doença, com metotrexato, repercutiu em baixos níveis plasmáticos de ácido úrico em indivíduos artríticos.

Por outro lado, nosso estudo demonstrou uma diminuição nos valores de FOX nos animais AIA em relação aos animais controle. A técnica de FOX quantifica hidroperóxidos lipídicos, que por sua vez, é proporcional ao grau de estresse oxidativo no meio. Esses dados nos surpreenderam pois, ao invés de uma diminuição, esperávamos observar um aumento destes valores de FOX no grupo AIA. Não vemos uma razão biológica para esta redução do FOX plasmático nos animais AIA, todavia, supomos que isso se deva a uma limitação da técnica. Na verdade, embora sejam técnicas amplamente empregadas no estudo do estresse oxidativo, tanto o FOX quanto o TBARS têm especificidades limitadas. Ademais, estudos tem reportado mecanismos de defesa deficientes contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) em pacientes com AR (SARBAN et al., 2005; SEVEN et al, 2008; HIRAO et al., 2012). Assim, supondo que o modelo AIA se assemelhe também nesse aspecto à AR, é cabível supor que tais mecanismos antioxidantes estejam atenuando o estresse oxidativo decorrente do processo inflamatório nesses animais.

Estudos prévios tem sido proposto que o NO está relacionado ao processo inflamatório da artrite e podendo ser, inclusive, um biomarcador da AR (SEVEN et al., 2008; NAGY et al., 2010; WRUCK et al., 2011; STAMP et al., 2012). Provavelmente, substâncias drenadas do processo inflamatório articular para a circulação podem induzir a iNOS, levando a um drástico aumento da produção de NO pelos tecidos vasculares (YKI-JÄRVINEN; BERGHOLM; LEIRISALO-REPO, 2003; MÄKI-PETÄJÄ et al., 2008). Por outro lado, a atividade intensa dessas iNOS também pode consumir excessivamente a tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) nesses tecidos. Isso faz com que as eNOS, também presentes nesses tecidos, atuem de forma desacoplada. Caso isso ocorra, ao invés de NO, essas eNOS produzem ânions superóxidos que agravam o estresse oxidativo e reduzem a biodisponibilidade do NO no meio. A longo prazo, isso pode reduzir as concentrações de NO (HARUNA et al, 2007, 2007). De fato, um estudo do nosso laboratório relatou redução nos níveis plasmáticos de nitrito, um produto do NO, em animais submetidos à CIA (PALMA ZOCHIO TOZZATO et a., 2016). No presente estudo, por sua vez, não foram observadas diferenças significativas nas

concentrações de nitrito/nitrato, ambos produtos do NO, entre os grupos experimentais estudados. Com base nesses dados podemos concluir que biodisponibilidade do NO não diferiu entre os grupos. Ainda vale ressaltar, todavia, que as concentrações de nitrito/nitrato plasmáticas refletem a biodisponibilidade do NO no sistema cardiovascular como um todo. Dessa forma, não ficam totalmente excluídas eventuais modificações na produção de NO em territórios vasculares específicos. Considerando que a biodisponibilidade do NO pode ser reduzida pelo excesso de ânions superóxidos (HARUNA et al, 2007, 2007), esses dados diminuem ainda mais o significado biológico da redução do FOX, observada nos animais AIA.

Em seguida, passamos a investigar as respostas funcionais da aorta torácica dos grupos experimentais. Esta etapa do estudo justificou-se porque as respostas vasomotoras da aorta são moduladas por substâncias produzidas pelo endotélio vascular. Ainda assim, uma vez que o intenso processo inflamatório relacionado à AIA pode elevar o estresse oxidativo, e, conseqüentemente, reduzir a biodisponibilidade de NO (MÄKI-PETÄJÄ et al., 2008), é cabível supor que a função endotelial pode estar comprometida nestes animais.

Estudou-se primeiramente o relaxamento da aorta promovido pela ACh, considerado um dos principais parâmetros para determinação da função endotelial em aortas. Isto porque, nesta preparação, o relaxamento induzido por ACh é mediado, quase exclusivamente pelo NO produzido no endotélio (CACANYIOVA; DOVINOVA; KRISTEK, 2013). Na verdade, já foi relatado que a AIA promove uma redução de respostas à ACh em aorta de ratos, possivelmente devido a uma redução de biodisponibilidade de NO (HARUNA et al., 2006, 2007; SAKUTA et al., 2010). Todavia, os dados obtidos no presente estudo sugerem que as respostas das aortas à ACh não foram significativamente modificadas pela AIA. Estes resultados divergentes ainda nos intrigam. É possível que a linhagem dos ratos utilizada no presente estudo (Wistar) possa justificar esta discrepância de resultados. De fato, as reduções de resposta à ACh, observadas anteriormente em consequência da AIA, foram descritas em ratos Lewis. Contudo, outros estudos mostram disfunção endotelial em preparações de aorta obtidas de ratos Wistar, ainda que em uma fase um pouco mais aguda da doença (FANG et al., 1991; ÇINAR et al., 1998; CAN et al., 2001). Por outro lado, nossos dados assemelham-se aos achados de Mackenzie et al. (2013). Neste estudo não foram observadas modificações de resposta à ACh em preparações de artéria safena de animais monoartríticos, um vaso de condutância a exemplo da aorta.

No presente estudo, as respostas das aortas à ACh também não foram significativamente modificadas pela castração. Também não houve uma interação significativa entre a AIA e a castração sobre as respostas das aorta à ACh. A participação da

testosterona nas ações cardiovasculares é ainda muito controversa. Ressalta-se maior incidência de hipertensão e outras doenças cardiovasculares no envelhecimento, fase da vida em que os níveis plasmáticos de testosterona se encontram em declínio (LIU et al., 2003). Também corroboram os estudos que observaram um maior aumento de lesões ateroscleróticas em indivíduos com baixos níveis circulantes de testosterona (HAK et al., 2002; MULLER et al., 2004; ROSANO et al., 2007). Por outro lado, muitos estudos sugerem que a testosterona promova danos cardiovasculares (XU et al., 2013; ZIEMENS et al., 2013), pelo fato das doenças cardiovasculares como hipertensão e aterosclerose acometerem mais homens do que mulheres.

A fim de melhor compreender os efeitos da AIA, bem como da castração sobre os mecanismos que participam das respostas relaxantes da aorta à ACh, estudou-se também estas respostas na presença de L-NAME, Apocinina, inibidores não seletivo de óxido nítrico sintases e NAD(P)H oxidase, respectivamente. Havia a expectativa de que, caso algum mecanismo endotelial estivesse compensando eventuais prejuízos da função endotelial como um todo, em consequência do estresse oxidativo associado à superexpressão da NAD(P)H oxidase e/ou ao desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), isto poderia ser evidenciado mediante estes tratamentos (HARUNA et al., 2006; HARUNA et al., 2007). No entanto, nem o L-NAME e tampouco a Apocinina evidenciaram qualquer modificação significativa das respostas das preparações estudadas à ACh, em animais submetidos a AIA e/ou à castração.

Não tendo sido constatadas maiores alterações nas curvas concentração-resposta à ACh, passamos a estudar as respostas dessas preparações de aorta torácica à Ang II. Isto porque, como já foi mencionado, o sistema renina-angiotensina pode estar envolvido nos danos cardiovasculares inerentes à AR e aos modelos experimentais de artrite, possivelmente através da atuação da Ang II sobre os receptores AT<sub>1</sub> (FLAMMER et al., 2008; SAKUTA et al., 2010; SHI et al., 2012; MACKENZIE et al., 2013). Logo, uma compreensão detalhada dos efeitos da Ang II em aortas de ratos submetidos à AIA pode melhorar nosso entendimento em relação às modificações vasculares relacionadas à artrite. Vale ressaltar que este é o primeiro estudo a avaliar as repostas da aorta torácica à Ang II em animais AIA. O presente estudo avança também na medida em que se propõe a compreender a influência da testosterona sobre eventuais modificações de resposta da aorta à Ang II, decorrentes da AIA. De fato, a testosterona pode influenciar as ações vasculares induzidas por Ang II (RECKELHOFF, 2005; KANG et al., 2012; MARIC-BILKAN; MANIGRASSO, 2012). Além disso, evidências sugerem que a testosterona intensifica os efeitos vasculares da Ang II

(SONG et al., 2006a; SONG et al., 2006b; SONG et al., 2010; OJEDA et al., 2010). Com efeito, também é fundamental verificar compreender a influência da testosterona sobre as repercussões vasculares da AIA, incluindo alterações nas resposta à Ang II, pode ser útil na identificação novos alvos terapêuticos para a AR.

Fundamentados nos estudos que observaram um aumento na expressão dos receptores  $AT_1$  e da enzima ECA em aortas de ratos submetidos à AIA (SAKUTA et al., 2010), esperávamos observar um aumento das respostas à angiotensina II em preparações de aorta de animais AIA. Esta expectativa era reforçada ainda pela possível disfunção endotelial nestes animais AIA (HARUNA et al., 2006, 2007; SAKUTA et al., 2010), que, conforme já foi discutido, não se concretizou. Entretanto, o presente estudo não evidenciou modificações significativas das respostas das preparações desafiadas com Ang II.

Embora não tenham sido observadas alterações no perfil das respostas das aortas provenientes dos animais AIA à Ang II, o presente estudo não descarta eventuais modificações dessas respostas em outras porções do sistema cardiovascular, como áreas de ramificação ou curvaturas vasculares. Estas áreas, expostas a um fluxo sanguíneo mais turbilhonado, podem ser mais susceptíveis aos danos vasculares da AIA (CARDA et al., 2015). O presente estudo também não exclui possíveis modificações de resposta à Ang II, induzidas pela AIA, em outros leitos vasculares, que desempenham diferentes papéis fisiológicos. O modelo de aorta isolada, embora seja considerado adequado para o estudo de mecanismos endoteliais em diversas condições fisiológicas e fisiopatológicas, não representa todo o sistema vascular.

Estudos prévios, realizados no nosso laboratório, demonstraram que as respostas de alguns leitos venosos à Ang II podem ser moduladas por diversos mediadores produzidos localmente, que atuam de forma redundante entre si em determinadas condições fisiológicas (CHIES et al., 2013; CHIES et al., 2017). Com base nestas observações, propôs-se o desafio dessas preparações com Ang II, na presença da Indometacina. Este tratamento, no entanto, não evidenciou qualquer modificação relevante das respostas à Ang II entre os grupos experimentais. Esses resultados enfraqueceram a hipótese de uma participação dos prostanoídes, bem como das espécies reativas produzidas por cicloxigenases (TORRES et al., 2004) em eventuais ações da AIA e da ORX sobre a modulação das respostas de aorta à Ang II.

Algumas preparações também foram avaliadas na presença da solução nutritiva contendo KCl 60 mM/L. Cabe ressaltar que essa maior concentração de KCl no líquido nutritivo despolariza parcialmente a membrana das células, e assim, neutraliza de forma

inespecífica os mecanismos hiperpolarizantes que regulam o tônus vascular (KRAVTSOV; KWAN, 1995). Todavia, este tratamento também não evidenciou qualquer modificação relevante das respostas à Ang II entre os grupos estudados. Logo, esses dados sugerem que a participação dos mecanismos hiperpolarizantes que regulam o tônus vascular, não é determinante nas eventuais ações da AIA e da ORX sobre as modulações das respostas de aorta à Ang II.

Por outro lado, na presença do L-NAME, observamos um aumento expressivo na magnitude das respostas à Ang II, sobretudo nas preparações obtidas dos animais não-imunizados, tanto falso-castrados quanto ORX. Este aumento de resposta à Ang II, observado na presença do L-NAME, evidenciou uma diferença significativa de  $E_{max}$  entre os animais controles e ORX, comparativamente aos animais do grupo AIA.

Uma primeira hipótese considerada para explicar o fato de não ter havido um aumento de resposta na presença de L-NAME, naquelas preparações obtidas dos animais submetidos à AIA, foi uma ativação das metaloproteinases-9 (MPP-9). Isto porque foi observado elevados níveis de MPP-9 em plasma e na musculatura lisa de aortas de camundongos submetidos à CIA (REYNOLDS et al., 2012). Segundo estes autores, este aumento de MPP-9 justificaria a redução das respostas contráteis à serotonina observadas nas aortas destes animais. Esta hipótese, no entanto, logo nos pareceu pouco plausível pois, em preparações deendotelizadas, não foram observadas diferenças de resposta à Ang II entre os animais imunizados e não imunizados. Com efeito, estes dados sugerem que as respostas à Ang II em animais submetidos a AIA são atenuadas por mecanismos endoteliais, não relacionados ao NO. Nos animais ORX+AIA, entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Esses dados sugerem que a mobilização dos mecanismos de modulação, não relacionados ao NO nos animais imunizados depende, ao menos parcialmente, dos níveis fisiológicos de testosterona plasmática.

As respostas à Ang II de maior magnitude nas preparações obtidas de animais controle, quando desafiadas na presença unicamente do L-NAME, mostra outra semelhança com o fenômeno já observado em veias. Nesses estudos foi observado que a Ang II pode induzir a liberação de endotelina (ET) em tecidos de veias e esta, por sua vez, à liberação de substâncias endoteliais vasodilatadoras. Nos animais submetidos ao treinamento físico, esse mecanismo parece modular as ações da Ang II em diversos leitos venosos (CHIES; ROSSIGNOLI, 2009; CHIES et al., 2013; CHIES et al., 2017). Todavia, o conhecimento acerca do envolvimento da ET na artrite é escasso, embora inúmeras doenças reumáticas de caráter sistêmico promovam danos vasculares que parecem estar associadas à este peptídeo

(MAYES, 2003). Ademais, estudos tem reportado que pacientes com AR apresentam um aumento significativo nos níveis plasmáticos de ET (PACHE et al., 2002).

Neste sentido, algumas preparações foram estudadas na presença do BQ-123, juntamente com o L-NAME. Nessa circunstância, as aortas provenientes de animais submetidos à AIA apresentaram respostas à Ang II com magnitude semelhante àquelas que foram obtidas dos animais não-imunizados. Logo, a diferença entre grupos de  $E_{max}$  para Ang II, observada na presença do L-NAME isoladamente, deixou de ser significativa. Esses dados sugerem que a ET, atuando sobre os receptores  $ET_A$ , de alguma forma, mantém reduzidas as respostas à Ang II em aortas de animais AIA. É verdade que os receptores  $ET_A$  são comumente observados na camada muscular vascular lisa e, quando estimulados, normalmente promovem vasoconstrição (KOBAYASHI et al., 2008; MAGUIRE; DAVENPORT, 2015). Contudo, estudos prévios sugerem a liberação de prostaciclina (prostanoides vasodilatadores) por meio da estimulação de receptores  $ET_A$  em pulmões de rato perfundidos (D'ORLEANS et al., 1992), e em leito arterial do rim de coelhos (TÉLÉMAQUE et al., 1993). Neste sentido, é possível inferir que em preparações cuja síntese de NO tenha sido inibida, as respostas à Ang II permanecem parcialmente atenuadas pelas prostaciclina liberadas pela ação da ET sobre os receptores  $ET_A$ .

Em outras preparações, as respostas à Ang II foram estudadas na presença do L-NAME juntamente ao BQ-788. Embora as respostas à Ang II permaneçam menores em animais submetidos à AIA nesta condição, a diferença de  $E_{max}$  para Ang II observada entre grupos, na presença do L-NAME isoladamente, também deixou de ser significativa. Isto provavelmente ocorreu porque o BQ-788, adicionado à estas preparações, elevou ligeiramente as respostas à Ang II em aortas de animais AIA. Esses dados nos permitem inferir que em preparações cuja síntese de NO tenha sido inibida, as respostas à Ang II permanecem parcialmente atenuadas pelos mediadores vasodilatadores liberados através da ação de ET sobre os receptores  $ET_B$ . Reforçam essa hipótese, os estudos prévios que reportam liberação de substâncias vasodilatadoras endoteliais mediadas por receptores  $ET_B$  em artérias de ratos. (KOHAN et al., 2011; MAZZUCA; KHALIL, 2012).

No presente estudo, as diferenças de  $E_{max}$  entre grupos, que haviam sido observadas na presença de L-NAME, também deixaram de ser significativas quando a Indometacina foi acrescida à incubação. Aparentemente, isso ocorreu pois o acréscimo da indometacina elevou o padrão das respostas em todos os grupos estudados. Esses dados sugerem que prostanoides vasodilatadores podem de fato atuar de forma redundante ao NO, garantindo a modulação das respostas à Ang II em preparações de animais expostos à AIA mesmo quando a síntese deste

gás for inibida. Reforçam inclusive a hipótese de que a ação moduladora da ET, que provavelmente ocorre nas preparações dos animais submetidos à AIA através da ação em receptores ET<sub>A</sub>, envolve a liberação de prostaciclina. Vale destacar que a via moduladora ET → receptores ET<sub>B</sub> → prostanoídes vasodilatadores já foi observada em veias de animais submetidos ao exercício (CHIES et al., 2013; CHIES et al., 2017).

Na ausência do NO, a modulação das respostas à Ang II em aortas de animais AIA pode envolver também mecanismos hiperpolarizantes. De fato, nenhuma diferença significativa de respostas à Ang II foi detectada entre grupos quando a incubação com L-NAME foi realizada em cubas contendo solução nutritiva despolarizante, condição favorável para a inibição de mecanismos hiperpolarizantes (HU et al., 2016). Além disso, tem sido proposto que os EDHF desempenham um papel fundamental na regulação do tônus vascular em vasos de capacitância provenientes de animais monoartríticos (MACKENZIE et al., 2013). Cabe ressaltar, entretanto, que o protocolo experimental proposto pelo presente estudo não pode identificar os subtipos de canais de K<sup>+</sup> envolvidos neste mecanismo regulatório. Por fim, também é cabível propor que esses supostos mecanismos hiperpolarizantes possam ser mobilizados pela ET nas preparações cuja síntese de NO está inibida. Isso porque já foi observado em carótidas de ratos que mecanismos hiperpolarizantes podem ser mobilizados pela ativação de receptores ET<sub>B</sub> (TIRAPELLI et al., 2005).

Os resultados que foram discutidos até agora dão suporte à hipótese de que, nas aortas dos animais AIA, a modulação das respostas à Ang II se dá por mecanismos que não envolvem NO. Porém, persiste a dúvida se, nestes animais, a modulação exercida pelo NO está preservada ou comprometida pelo esperado estresse oxidativo decorrente do processo inflamatório local. Esta é uma pergunta desafiadora pois estando prejudicada ou preservada, a mediação através do NO fica oculta nesses animais pela ação dos demais mecanismos moduladores já propostos. Essa hipótese fica um pouco enfraquecida pelo fato de não ter havido redução das respostas à ACh nas preparações dos animais AIA. Contudo, devemos considerar que a liberação de NO induzida por estimulação dos receptores muscarínicos pode não ser exatamente igual à induzida pela estimulação de receptores para Ang II.

A fim de aprofundar o entendimento deste fenômeno, decidimos estudar também estas respostas na presença da Apocinina. Decidimos realizar esses experimentos pois o complexo enzimático NAD(P)H oxidase é considerado uma das principais vias de produção de ânions superóxidos nos leitos vasculares (HARUNA et al., 2006, 2007). Os dados obtidos mostram que, na presença da Apocinina, as respostas à Ang II foram nitidamente menores nos animais AIA em relação àqueles não imunizados. Isso indica que a modulação exercida pelo NO pode

estar prejudicada nas preparações dos animais AIA, provavelmente pelo excesso de ânions superóxido. Assim o tratamento com apocinina, que bloqueia da síntese de ânions superóxidos, pode ter melhorado o funcionamento da modulação que envolve o NO e esta, por sua vez, passou a cooperar de forma mais efetiva com os já mencionados mecanismos não relacionados ao NO na modulação das respostas à Ang II. Caso isso seja verdade, a modulação das respostas à Ang II nos animais AIA dependeria principalmente dos mecanismos não relacionados ao NO, uma vez que a via Ang II → receptores AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> → NO estaria comprometida pelo estresse oxidativo local. Cabe destacar que essa diferença de resposta à Ang II, entre animais imunizados e não imunizados foi maior, e atingiu a significância nos animais privados de testosterona. Nossos dados não nos permitem analisar esta particularidade mas é possível que na ausência da testosterona, não apenas a modulação endotelial mediada por NO é prejudicada pelo excesso de ânions superóxido, mas também a contração induzida por este peptídeo. Assim, na presença da apocinina, a modulação endotelial torna-se mais efetiva nos animais ORX+AIA, assim como a contração mediada pela Ang II torna-se mais intensa, e supere ainda mais a modulação endotelial, nos animais ORX.

A hipótese de prejuízo da modulação das respostas à Ang II mediada por NO nos parece plausível, embora ainda um pouco frágil. Isso porque, quando as respostas à Ang II foram estudadas em preparações tratadas com Tiron, não foram observadas quaisquer alterações nas curvas concentração-resposta à Ang II, entre os grupos estudados. Vale destacar que o Tiron é capaz de remover radicais livres dos tecidos independentemente destes serem produzidos pelo complexo NAD(P)H oxidase. Portanto, outras abordagens experimentais são ainda necessárias para compreender com mais clareza o funcionamento dos mecanismos endoteliais relacionados ao NO que atuam na modulação das respostas à Ang II, em aorta de ratos submetidos à AIA.

As evidências apresentadas sugerem que, na vigência do bloqueio da síntese do NO, as respostas à Ang II são moduladas nos animais submetidos a AIA por substâncias produzidas localmente. Contudo, foi também realizada uma avaliação da presença dos receptores da Ang II nas aortas dos animais pertencentes aos quatro grupos experimentais estudados. Os dados obtidos mostraram que a presença de receptores AT<sub>1</sub> foi significativamente reduzida não apenas em aortas de animais AIA, como também nos ORX e nos ORX+AIA. Nos animais AIA, esses dados não eram esperados, visto que Sakuta et al. (2010) observaram um aumento dos receptores AT<sub>1</sub> em aortas de animais submetidos à este

mesmo modelo de artrite. Por outro lado, a presença dos receptores AT<sub>2</sub> não sofreu modificação pela AIA, tampouco em consequência da ORX.

Por conta dessas modificações, podemos inferir que a presença dos receptores AT<sub>2</sub> aumentou em relação aos receptores AT<sub>1</sub>, nos grupos AIA e/ou ORX. Como sabemos, na aorta, os receptores AT<sub>1</sub> localizam-se preferencialmente na camada muscular lisa, também conhecida como média, onde promovem contração, ativação do complexo NAD(P)H oxidase e etc, quando estimulados. Por outro lado, os receptores AT<sub>2</sub> são mais abundantes no endotélio da aorta e, quando estimulados, promovem ações vasomotoras opostas àquelas do AT<sub>1</sub> por meio da liberação de substâncias endoteliais relaxantes como o NO (BROWN; GONZALEZ; MONTELONE, 2017). Isso não quer dizer, todavia, que as ações da Ang II mediadas por receptores AT<sub>2</sub> sejam necessariamente maiores nos animais pertencentes aos grupos AIA, ORX ou ORX+AIA. Na verdade, aumentos na presença de receptores em um determinado tecido não implica necessariamente em aumento do efeito biológico decorrente de sua ativação.

A fim de verificar se o aumento relativo dos receptores AT<sub>2</sub> teria algum papel nas modificações de resposta da aorta à Ang II relatadas nesse estudo, decidimos realizar os experimentos de reatividade da aorta à Ang II também na presença do PD123,319. Os dados obtidos na presença deste antagonista mostram um aumento das respostas à Ang II em aortas de animais não-imunizados, assim como ocorreu na presença do L-NAME. Este aumento, contudo, não foi estatisticamente significativo. Provavelmente, o bloqueio dos receptores AT<sub>2</sub> comprometem a liberação do NO e isso contribui para a elevação das respostas sobretudo nos animais controle e ORX, que não foram imunizados. Entretanto, essa diferença não atinge significância pois diferentemente do L-NAME, o bloqueio dos receptores AT<sub>2</sub> não inibem apenas a liberação do NO (BROWN; GONZALEZ; MONTELONE, 2017). Com efeito, a inibição da liberação de outros mediadores vasodilatadores pelo PD123,319, inclusive nas preparações provenientes dos animais AIA e ORX+AIA, pode resultar em um padrão de resposta à Ang II não claramente distinto entre os grupos experimentais estudados.

Por outro lado, a redução da expressão proteica dos receptores AT<sub>1</sub> poderia traduzir-se em uma diminuição na capacidade de resposta à Ang II nas preparações dos animais que foram submetidos a AIA. Isso poderia justificar o padrão atenuado de resposta à Ang II exibido pelas preparações dos grupos AIA e ORX+AIA quando estudadas na presença do L-NAME. Essa hipótese, todavia, embora não possa ser completamente descartada, fica enfraquecida pelo fato de não terem sido observadas diferenças significativas entre os grupos no padrão das respostas à Ang II, em preparações de endotelizadas. Além disso, também não

foram observadas diferenças de respostas ao KCl, um vasoconstritor direto, ou ao nitroprussiato de sódio, um doador de NO, entre os grupos estudados. Logo, esses dados sugerem que as modificações à Ang II, observadas na presença do L-NAME, aparentemente também não envolvem modificações nas propriedades contráteis dessas preparações, bem como sua sensibilidade ao NO.

Por fim, os dados obtidos no presente estudo, se por um lado mostram um intrigante mecanismo de modulação de respostas à Ang II em animais submetidos à AIA, que envolve a participação redundante de diversas substâncias endoteliais, por outro, nos impõe desafios. Amparados puramente em um raciocínio lógico, supomos que essa modulação multimediada sobre as respostas à Ang II nas aortas dos animais AIA tenha a função de assegurar a homeostasia. De fato, a já referida modulação das respostas à Ang II que ocorre em veias de animais expostos ao exercício, com características bastante semelhantes as identificadas no presente estudo, tem um nítido papel homeostático (CHIES et al., 2013 e CHIES et al., 2017). Contudo, o entendimento do real papel deste fenômeno exigirá uma complementação dos dados aqui apresentados, por meio de outras abordagens metodológicas.

## **6 CONCLUSÃO**

O presente estudo não identificou modificações drásticas induzidas pela AIA e/ou pela ORX, em ratos Wistar na função endotelial e nas respostas induzidas pela Ang II quando todos os mecanismos moduladores endoteliais estão presentes. Entretanto, quando os mecanismos endoteliais relacionados ao NO foram bloqueados, observou-se um aumento nas respostas à Ang II em aortas de animais não-imunizados. Aparentemente, este aumento depende parcialmente da testosterona, visto que as respostas à Ang II nestas preparações são menores. Por sua vez, nas aortas de animais submetidos à AIA, mecanismos locais parecem ser mobilizados para atuar como uma espécie de “backup” ao NO na modulação das respostas à Ang II, sempre que a produção deste gás é inibida ou sua biodisponibilidade é comprometida por conta do estresse oxidativo local. Possivelmente esses mecanismos locais, que cooperam com o NO, são ativados pela estimulação dos receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> e envolvem tanto prostanoides vasodilatadores quanto mecanismos indutores de hiperpolarização das células da musculatura lisa vascular presentes na aorta.

## REFERÊNCIAS

- ALKAABI, J.K.; HO, M.; LEVISON, R.; PULLAR, T.; BELCH, J.J. Rheumatoid arthritis and macrovascular disease. **Rheumatology (Oxford)**, v. 42, n. 2, p. 292-297, 2003.
- ARAB, K.; STEGHENS, J.P. Plasma lipid hydroperoxides measurement by an automated xylenol orange method. **Anal. Biochem.**, v.325, n.1, p.158-63, 2004.
- BARBIER, A.; BRELIERE, J.C.; RONCUCCI, R. Preliminary study of testosterone levels in rats with adjuvant arthritis. **Arthritis. Rheum.**, v. 28, n. 8, p. 959-960, 1985.
- BENDELE, A.; MCCOMB, J.; GOULD, T.; MCABEE, T.; SENELLO, G.; CHLIPALA, E.; GUY, M. Animal models of arthritis: relevance to human disease. **Toxicol. Pathol.**, v. 27, n. 1, p. 134-42, 1999.
- BENDELE A. Animal models of rheumatoid arthritis. **J. Musculoskelet. Interact.**, v.1, n, 4, p.377-385, 2001.
- BERGHOLM, R.; LEIRISALO-REPO, M.; VEHKAVAARA, S.; MÄKIMATTILA, S.; TASKINEN, M. R.; YKI-JÄRVINEN, H. Impaired responsiveness to NO in newly diagnosed patients with rheumatoid arthritis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.22, n. 10, p. 1637-41, 2002.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BLANCO-RIVERO, J.; BALFAGÓN, G.; FERRER, M. Orchidectomy modulates  $\alpha_2$ -adrenoceptor reactivity in rat mesenteric artery through increased thromboxane A<sub>2</sub> formation. **Vasc. Res.**, v.43, n.1, p.101-108, 2006.
- BRENNAN, P.; O'NEILL, L.A. Inhibition of nuclear factor kappaB by direct modification in whole cells--mechanism of action of nordihydroguaiaritic acid, curcumin and thiol modifiers. **Biochem. Pharmacol.**, v.55, n.7, p.965-973, 1998.
- BROWN, T.; GONZALEZ, J.; MONTELEONE, C. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema: A review of the literature. **J. Clin. Hypertens. (Greenwich)**, v. 19, n. 12, p. 1377-1382, 2017.
- BOTS, M. L.; HOFMAN, A.; DE JONG, P.T.; GROBBEE, D.E. Common carotid intima-media thickness as an indicator of atherosclerosis at other sites of the carotid artery. The Rotterdam study. **Ann. Epidemiol.**, v. 6, n. 2, p. 147-153, 1996.
- BRUOT, B.C.; CLEMENS, J.W. Effect of adjuvant-induced arthritis on serum luteinizing hormone and testosterone concentrations in the male rat. **Life. Sci.**, v. 41, n. 13, p. 1559-1565, 1987.
- CACANYIOVA, S.; DOVINOVA, I.; KRISTEK, F. The role of oxidative stress in acetylcholine-induced relaxation of endothelium-denuded arteries. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 64, n. 2, p. 241-247, 2013.

- CAMPION, S.; CATLIN, N.; HEGER, N.; MCDONNELL, E. V.; PACHECO, S. E.; SAFFARINI, C.; SANDROF, M. A.; BOEKELHEIDE, K. Male reprotoxicity and endocrine disruption. **EXS.**, v. 101, p. 315-360, 2012.
- CAPARROZ-ASSEF, S.M.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L.; BERSANI-AMADO, C. A.; BRACHT, A.; KELMER-BRACHT, A.M.; ISHII-IWAMOTO, E.L. The uncoupling effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drug nimesulide in liver mitochondria from adjuvant-induced arthritic rats. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 19, n. 2, p. 117-124, 2001.
- CARDA, A.P.; MARCHI, K.C.; RIZZI, E.; MECAWI, A.S.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; PADOVAN, C.M.; et al. Acute restraint stress induces endothelial dysfunction: role of vasoconstrictor prostanoids and oxidative stress. **Stress.**, v.1 8, p. 1-11, 2015.
- CARVALHO, M.A.; LANNA, C.C.; BERTOLO, M.B. **Reumatologia: diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 675 p.
- 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.**, v.71, n.4, p.401-410, 2002.
- CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n. 6 p. 417-423, 2002.
- CHIES, A.B.; DE SOUZA ROSSIGNOLI, P. Exercise increases the phenylephrine effects in isolated portal vein of trained rats. **Vascul. Pharmacol.**, v. 51, n. 2-3, p. 125-132, 2009.
- CHIES, A.B.; ROSSIGNOLI, P.S.; BAPTISTA, R.F.; DE LÁBIO, R.W.; PAYÃO, S.L. Exercise reduces angiotensin II responses in rat femoral veins. **Peptides**, v. 44, p. 47-54, 2013.
- CHIES, A.B.; ROSSIGNOLI, P.S.; BAPTISTA, R.F.; DE LÁBIO, R.W.; PAYÃO, S.L. PAYÃO SL. Prostanoids counterbalance the synergism between endothelin-1 and angiotensin II in mesenteric veins of trained rats. **Peptides**, v. 88, p. 67-73, 2017.
- CHINNATHAMBI, V.; MORE, A.S.; HANKINS, G.D.; YALLAMPALLI, C.; SATHISHKUMAR, K. Gestational exposure to elevated testosterone levels induces hypertension via heightened vascular angiotensin ii type 1 receptor signaling in rats. **Biol. Reprod.**, v. 91, n. 1, p. 6, 2014.
- CLEMENS, J.W.; BRUOT, B.C. Testicular dysfunction in the adjuvante-induced arthritic rat. **J. Androl.**, v. 10, n. 6, p. 419-424, 1989.
- CUTOLO, M. Sex hormone adjuvante therapy in rheumatoid arthritis. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, v.26, n.4, p.881-895, 2000.
- ÇINAR, M. G.; 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.**, v.31, n.1, p.149-1953, 1998.

DE GASPARO, M.; CATT, K. J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J. W.; UNGER, T. International union of pharmacology XXIII: the renin angiotensin II receptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 415-472, 2000.

D'ORLÉANS-JUSTE, P.; TÉLÉMAQUE, S.; CLAING, A.; IHARA, M.; YANO, M. Human big endothelin-1 and endothelin-1 release prostacyclin via the activation of ET1 receptors in the rat perfused lung. **Br. Pharmacol.**, v. 105, p. 773-775, 1992.

FABBRINI, E.; SERAFINI, M.; BARIC, I.C.; HAZEN, S.L.; KLEIN, S. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. **Diabetes**, v. 63, p. 976-981, 2014.

FANG, Z.Y.; FONTAINE, J.; UNGER, P.; BERKENBOOM, G. Alterations of the endothelial function of isolated aortae in rats with adjuvant arthritis. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 311, p. 122-130, 1991.

FLAMMER, A.J.; SUDANO, I.; HERMANN, F.; GAY, S.; FORSTER, A.; NEIDHART, M.; KÜNZLER, P.; ENSELEIT, F.; PÉRIAT, D.; HERMANN, M.; NUSSBERGER, J.; LUSCHER, T. F.; CORTI, R.; NOLL, G.; RUSCHITZKA, F. Angiotensin-converting enzyme inhibition improves vascular function in rheumatoid arthritis. **Circulation**, v. 117, n. 17, p. 2262-2269, 2008.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta. Cir. Bras.**, v. 20, p. 28-34, 2005.

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

GABRIEL, S.E. Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. **Am. J. Med.**, v. 121, n. 10, p. S9-14, 2008.

GRANGER, D.L.; TRAIKTOR, R.R.; BOOCKVAR, K.S.; HIBBS JUNIOR, J.B. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess Reaction. **Methods. Enzymol.**, v. 268, p. 141-51, 1996.

GRIENGLING, K.K.; MINIERI, C.A.; OLLERENSHAW, J.D.; ALEXANDER, R.W. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth cells. **Circ. Res.**, v. 74, p. 1141-1148, 1994.

GRIENGLING, K.K.; LASSEGUE, B.; ALEXANDER, R.W.; Angiotensin receptors and their therapeutic implications. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 281-306, 1996.

GOELDNER, I.; SKARE, T.L.; REASON, I.T.; UTIYAMA, S. R. Artrite reumatoide: uma visão atual. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 47, n. 5, p. 495-503, 2011.

GONZALES, R.J.; KRAUSE, D.N.; DUCKLES, S.P. Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 286, n. 2, p. H552-H560, 2004

GORDON, D.; BEASTALL, G.H.; THOMSON, J.A.; STURROCK, R.D. Androgenic status and sexual function in males with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. **Q. J. Med.**, v. 60, n. 231, p. 671-679, 1986.

HAK, A.E.; WITTEMAN, J.C.; JONG, F.H.; GEERLINGS, M.I.; HOFMAN, A.; POLS, H. A. Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: the Rotterdam study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 8, p. 3632-9, 2002.

HANNAMI, S.; ALSALMI, I.; MOLLER, I.; NAREDO, E. Uric acid is independent cardiovascular risk factor, as manifested by increased carotid intima-media thickness in rheumatoid Arthritis patients. **Clin. Rheumatol.**, v. 36, n. 8, p. 1897-1902, 2017.

HARBUZ, M.S, PERVEEN-GILL, Z.; LIGHTMAN, S.L.; JESSOP, D.S. A protective role for testosterone in adjuvant-induced arthritis. **Br. J. Rheumatol.**, v. 34, n. 12, p. 1117-1122, 1995.

HARUNA, Y.; MORITA, Y.; KOMAI, N.; YADA, T.; SAKUTA, T.; TOMITA, N.; FOX, D. A.; KASHIHARA, N. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase and uncoupled endothelial nitric oxide synthase. **Arthritis Rheum.**, v. 54, n. 6, p. 1847-1855, 2006.

HARUNA, Y.; MORITA, Y.; YADA, T.; SATOH, M.; FOX, D.A.; KASHIHARA, N. Fluvastatin reverses endothelial dysfunction and increased vascular oxidative stress in rat adjuvant-induced arthritis. **Arthritis. Rheum.**, v. 56, n. 6, p. 1827-1835, 2007.

HEGEN, M.; KEITH JR, J.C.; COLLINS, M.; NICKERSON-NUTTER, C.L. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 67, n. 11, p. 1505-1515, 2008.

HEISS, G.; SHARRETT, A.R.; BARNES, R.; CHAMBLESS, L.E.; SZKLO, M.; ALZOLA, C. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. **Am. J. Epidemiol.**, v. 134, n. 3, p. 250-256, 1991.

HIRAO, M.; YAMASAKI, N.; OZE, H.; EBINA, K.; NAMPEI, A.; KAWATO, Y. et al. Serum level of oxidative stress marker is dramatically low in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab. **Rheumatol. Int.**, v. 32, n. 12, p.4041-4045, 2012.

HU, G.; LI, X.; ZHANG, S.; WANG, X. Association of rat thoracic aorta dilatation by astragaloside IV with the generation of endothelium-derived hyperpolarizing factors and nitric oxide, and the blockade of Ca(2+) channels. **Biomed. Rep.**, v. 5, n. 1, p. 27-34, 2016.

JIANG, Z.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe<sup>2+</sup> in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and an iodometric method. **Lipids.**, v. 26, p. 853-856, 1991.

KANG, N.N.; FU, L.; XU, J.; HAN, Y.; CAO, J. X.; SUN, J.F.; ZHENG, M. et al. Testosterone improves cardiac function and alters angiotensin II receptors in isoproterenol-induced heart failure. **Arch. Cardiovasc. Dis.**, v. 105, n. 2, p. 68-76, 2012.

- KANIE, N.; KAMATA, K. Contractile responses in spontaneously diabetic mice. I. Involvement of superoxide anion in enhanced contractile response of aorta to norepinephrine in C57BL/KsJ(db/db) mice. **Gen. Pharmacol.**, v.35, n.6, p.311-318, 2000.
- KHAN, F.; GALARRAGA, B.; BELCH, J.J. The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 6, n. 5, p. 253-261, 2010.
- KOBAYASHI, T.; NOGAMI, T.; TAGUCHI, K.; MATSUMOTO, T.; KAMATA, K. Diabetic state, high plasma insulin and angiotensin II combine to augment endothelin-1-induced vasoconstriction via ETA receptors and ERK. **Br. J. Pharmacol.** v. 155, n. 7, p. 974-983, 2008.
- KOHAN, D.E.; ROSSI, N.F.; INSCHO, E.W.; POLLOCK, D.M. Regulation of blood pressure and salt homeostasis by endothelin. **Physiol. Rev.**, v. 91, n. 1, p. 1-77, 2011.
- KRAVTSOV, G.M.; KWAN, C.Y. A revisit on the mechanism of action of KCl-induced vascular smooth muscle contraction: a key role of cation binding to the plasma membrane. **Biol. Signals.**, v. 4, n. 3, p. 160-167, 1995.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
- KUMEDA, Y.; INABA, M.; GOTO, H.; NAGATA, M.; HENMI, Y.; FURUMITSU, Y.; ISHIMURA, E.; INUI, K.; YUTANI, Y.; MIKI, T.; SHOJI, T.; NISHIZAWA, Y. Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 46, n. 6, p. 1489-1497, 2002.
- LEE, J.J.; BYKERK, V.P.; DRESSER, G.K.; BOIRE, G.; HARAOU, B.; HITCHON, C.; THORNE, C.; TIN, D.; JAMAL, S.; KEYSTONE, E.C.; POPE, J.E. reduction in serum uric acid may be related to methotrexate efficacy in early rheumatoid arthritis: data from the canadian early arthritis cohort (CATCH). **Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.**, v. 4, n. 9, p. 37-43, 2016.
- LEVY, R. A.; PACHECO, M. S. Artrite reumatoide: como eu trato. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 96, n. 5, p. 32-36, 2009.
- LIMA, M.C.; MASSABKI, P.S. Fatores de risco para doenças cardiovasculares na artrite reumatoide: tabagismo e aterosclerose. **Rev. Soc. Bras. Clin. Med.**, v. 7, n. 5, p. 343-347, 2009.
- LIU, P.Y.; DEATH, A.K.; HANDELSMAN, D.J. Androgens and cardiovascular disease. **Endocr. Rev.**, v.24, n. 3, p. 313-40, 2003.
- LOUZADA JR, P.; SOUZA, B.D.; TOLEDO, R.A.; CICONELLI, R. M. Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 47, n. 2, p. 84-90, 2007.
- MACKENZIE, A.; DUNNING, L.; FERRELL, W.R.; LOCKHART, J.C. Angiotensin II type 1 receptor blockade protects endothelium-derived hyperpolarising factor-mediated relaxation in a rat model of monoarthritis. **Life. Sci.**, v. 92, n. 23, p. 1131-1137, 2013.

MAGUIRE, J.J.; DAVENPORT, A.P. Endothelin receptors and their antagonists. **Semin. Nephrol.**, v. 35, n. 2, p. 125-136, 2015.

MARIC-BILKAN, C.; MANIGRASSO, M.B. Sex differences in hypertension: contribution of the renin-angiotensin system. **Gend. Med.**, v. 9, n. 4, p. 287-91, 2012.

MARQUES NETO, J.F.; GONÇALVES, E.T.; LANGEN, L.F.; CUNHA, M.F.; RADOMINSKI, S.; OLIVEIRA, S.M.; CURY, S.E.; MEDEIROS, F.; SAMPAIO, G.C. Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in brazilian population samples. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 33, p. 169-173, 1993.

MATSUBARA, H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. **Circ. Res.**, v. 83, p. 1182-1191, 1998.

MATSUDA, K.; RUFF, A.; MORINELLI, T.A.; MATHUR, R.S.; HALUSHKA, P.V. Testosterone increases thromboxane A<sub>2</sub> receptor density and responsiveness in rat aortas and platelets. **Am. J. Physiol.**, v.267, 3 Pt2, p.H887-H893, 1994.

MAYES, M.D. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. **Arthritis. Rheum.**, v. 48, n. 5, p. 1190-11909, 2003.

MAZZUCA, M.Q.; KHALIL, R.A. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. **Biochem. Pharmacol.**, v.84, n. 2, p. 147-162, 2012.

MÄKI-PETÄJÄ, K.M.; CHERIYAN, J.; BOOTH, A. D.; HALL, F.C.; BROWN, J.; WALLACE, S.M.; ASBY, M.J.; MCENIERY, C.M.; WILKINSON, I.B. Inducible nitric oxide synthase is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction. **Int. J. Cardiol.**, v. 129, n. 3, p. 399-405, 2008.

McKEE, A.P.; van RIPER, D.A.; DAVISON, C.A.; SINGER, H.A. Gender-dependent modulation of  $\alpha_1$ -adrenergic responses in rat mesenteric arteries. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 284, n. 5, p.H1737-H1743, 2003.

MIDTBØ, H.; GERDTS, E.; KVIEN, T.K.; OLSEN, I.C.; HIRTH, A.; SKULSTAD, E., et al. Disease activity and left ventricular structure in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 54, p. 511-519, 2015.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-42, 1991.

MOREIRA, C.; CARVALHO, M.A. **Noções práticas de reumatologia**. Belo Horizonte: Health, 1996. 1 v.

MOTA, I.M.; CRUZ, B.A.; BRENOL, C.V.; PEREIRA, I.A.; FRONZA, L.S.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M.V.; SILVA, N.A.; LOUZADA JUNIOR, P.; GIORGI, R.D.; LIMA, R.A.; PINHEIRO, G.R. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 51, n. 3, p. 199-219, 2011.

MULLER, M.; VAN DEN BELD, A.W.; BOTS, M.L.; GROBBEE, D.E.; LAMBERTS, S. W.; VAN DER SCHOUW, Y.T. Endogenous sex hormones and progression of carotid atherosclerosis in elderly men. **Circulation**, v. 109, n. 17, p. 2074-9, 2004.

MYASOEDOVA, E.; DAVIS III, J.M.; CROWSON, C.S.; ROGER, V.L.; KARON, B.L.; BORGESON, D.D., et al. Rheumatoid arthritis is associated with left ventricular concentric remodeling: results of a population-based cross-sectional study. **Arthritis Rheum.** v. 65, n. 7, p. 1713-1718, 2013.

NAGY, G.; KONCZ, A.; TELARICO, T.; FERNANDEZ, D.; ERSEK, B.; BUZÁS, E. et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res. Ther.**, v. 12, n. 3, p. 210, 2010.

NOZAKI, K.; GOTO, H.; NAKAGAWA, T.; HIKIAMI, H.; KOIZUMI, K.; SHIBAHARA, N.; SHIMADA, Y. Effects of keishibukuryogan on vascular function in adjuvant-induced arthritis rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 6, p. 1042-1047, 2007.

OJEDA, N.B.; ROYALS, T.P.; BLACK, J.T.; DASINGER, J.H.; JOHNSON, J.M.; ALEXANDER, B.T. Enhanced sensitivity to acute angiotensin II is testosterone dependent in adult male growth-restricted offspring. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 298, n. 5, p. R1421-7, 2010.

OLIVER, S.J.; BRAHN, E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **J. Rheumatol. Suppl.**, v. 44, p. 56-60, 1996.

ORIJ, G.K.; KEISER, H. R. Protein kinase C mediates angiotensin II-induced contractions and the release of endothelin and prostacyclin in rat aortic rings. **Prostaglandins Leukot. Esset. Fatty Acids**, v. 57, p. 135-141, 1997.

PACHE, M.; SCHWARZ, H.A.; KAISER, H.J.; WÜEST, P.; KLÖTI, M.; DUBLER, B.; et al. Elevated plasma endothelin-1 levels and vascular dysregulation in patients with rheumatoid arthritis. **Med. Sci. Monit.** v. 8, n. 9, p. CR616-619, 2002.

PACURARI, M.; KAFOURY, R.; TCHOUNWOU, P.B.; NDBELE, K. The renin-angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. **Int. J. Inflamm.**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

PALMA ZOCHIO TOZZATO, G.; TAIPEIRO, E.F.; SPADELLA, M.A.; MARABINI FILHO, P.; DE ASSIS, M.R.; CARLOS, A.P. et al. Collagen-induced arthritis increases inducible nitric oxide synthase not only in aorta but also in the cardiac and renal microcirculation of mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v.183, n.3, p.341-349, 2016.

PARK, Y.B.; AHN, C.W.; CHOI, H. K.; LEE, S.H.; IN, B.H.; LEE, H.C.; NAM, C.M.; LEE, S.K. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: morphologic evidence obtained by carotid ultrasound. **Arthritis Rheum.**, v. 46, n. 7, p. 1714-1719, 2002.

PEREIRA, I.A.; MOTA, I.M.; CRUZ, B.A.; BRENOL, C.V.; FRONZA, L.S.; BERTOLO, M. B.; FREITAS, M.V.; SILVA, N.A.; LOUZADA JUNIOR, P.; GIORGI, R.D.; LIMA, R.A.; PINHEIRO, G.R. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 52, n. 2, p. 152-174, 2012.

PRATI, C.; BERTHELOT, A.; WENDLING, D.; DEMOUGEOT, C. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: up-regulation of the vascular arginase pathway. **Arthritis Rheum.**, v. 63, n. 8, p. 2309-2317, 2011.

RECKELHOFF, J.F. Sex steroids, cardiovascular disease, and hypertension: unanswered questions and some speculations. **Hypertension**, v.45, p.170-174, 2005.

REYNOLDS, S.I.; WILLIAMS, A.S.; WILLIAMS, H.; SMALE, S.; STEPHENSON, H.J.; AMOS N.; GEORGE, S.J.; O'DONNELL, V.B.; LANG, D. Contractile, but not endothelial, dysfunction in early inflammatory arthritis: a possible role for matrix metalloproteinase-9. **Br. J. Pharmacol.**, v. 167, n. 3, p. 505-5014, 2012.

ROCHA, O.M.; BATISTA, A.A.; MAESTÁ; N.; BURINI, R. C.; LAURINDO, I.M. Sarcopenia da caquexia reumatoide: conceituação, mecanismos, consequências clínicas e tratamentos possíveis. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.49, n.3, p.288-301, 2009.

ROSANO, G.M.; SHEIBAN, I.; MASSARO, R.; PAGNOTTA, P.; MARAZZI, G.; VITALE, C.; MERCURO, G.; VOLTERRANI, M.; AVERSA, A.; FINI, M. Low testosterone levels are associated with coronary artery disease in male patients with angina. **Int. J. Impot. Res.**, v. 19, n. 2, p.176-82, 2007.

ROSSIGNOLI, P.S.; PEREIRA, O.C.M.; CHIES, A.B. Orchidectomy enhances the effects of phenylephrine in rat isolated portal vein. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.37, n.3, p.368-374, 2010.

SAKUTA, T.; MORITA, Y.; SATOH, M.; FOX, D. A.; 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.**, v. 62, n. 5, p. 1319-1328, 2010.

SATO, E. I. **Guia de reumatologia**. 2. ed. Barueri: Manole, 2010. 519 p.

SARBAN, S.; KOCYIGIT, A.; YAZAR, M.; ISIKAN, U.E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **Clin. Biochem.**, v.38, n.11, p.981-986, 2005.

SEVEN, A.; GÜZEL, S.; ASLAN, M.; HAMURYUDAN, V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. **Clin. Biochem.**, v. 41, n. 7-8, p. 538-543, 2008.

SILVA-ANTONIALLI, M.M.; TOSTES, R.C.; FERNANDES, L.; FIOR-CHADI, D.R.; AKAMINE, E.H.; CARVALHO, M.H.; FORTES, Z.B.; NIGRO, D.A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. **Cardiovasc. Res.**, v. 62, n. 3, p. 587-93, 2004.

SHI, Q.; ABUSARAH, J.; BAROUDI, G.; FERNANDES, J.C.; FAHMI, H.; BENDERDOUR, M. Ramipril attenuates lipid peroxidation and cardiac fibrosis in an experimental model of rheumatoid arthritis. **Arthritis. Res. Ther.**, v. 14, n. 5, p. R223, 2012.

SHIMIZU, I.; MINAMINO, T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. **J. Mol.**

**Cell. Cardiol.**, v.97, p.245-262, 2016.

SKARE, T.L. **Reumatologia**: princípios e práticas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 335 p.

SONG, J.; KOST JR, C.K.; MARTIN, D.S. Androgens augment renal vascular responses to ANG II in New Zealand genetically hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 290, n. 6, p.R1608-15, 2006a.

SONG, J.; KOST JR, C.K.; MARTIN, D.S. Androgens potentiate renal vascular responses to angiotensin II via amplification of the Rho kinase signaling pathway. **Cardiovasc. Res.**, v. 72, n. 3, p. 456-63, 2006b.

SONG, J.; EYSTER, K.M.; KOST JR, C.K.; KJELLEN, B.; MARTIN, D.S. Involvement of protein kinase C-CPI-17 in androgen modulation of angiotensin II-renal vasoconstriction. **Cardiovasc. Res.**, v. 85, n. 3, p. 614-21, 2010.

STAMP, L.K.; KHALILOVA, I.; TARR, J.M.; SENTHILMOHAN, R.; TURNER, R.; HAIGH, R.C. et al. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 51, n. 10, p. 1796-1803, 2012.

STORCH, A. S.; MATTOS, J. D.; ALVES, R.; GALDINO, I. S.; ROCHA, H. N. M. Methods of Endothelial Function Assessment: Description and Applications. **Int. J. Cardiovasc. Sci.**, v. 30, n. 3, p. 262-273, 2017 .

TEIXEIRA, V.O.; FILIPPINI, L.I.; XAVIER, R.M. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.52, n.2, p.247-259, 2012.

TÉLÉMAQUE, S.; GRATTON, J.P.; CLAING, A.; D'ORLÉANS-JUSTE P. Endothelin-1 induces vasoconstriction and prostacyclin release via the activation of endothelin ETA receptors in the perfused rabbit kidney. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 237, p. 275-281, 1993.

TIMMERMANS, P.B.; WONG, P.C.; CHIU, A.T.; HERBLIN, W.F.; BENFIELD, P.; CARINI, D.J. et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. **Pharmacol. Rev.**, v. 45, p. 205-251, 1993.

TIRAPELLI, C.R.; CASOLARI, D.A.; YOGI, A.; MONTEZANO, A.C.; TOSTES, R.C.; LEGROS, E. et al. Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K<sup>+</sup> channels in ETB-induced relaxation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 146, n. 6, p. 903-912, 2005.

TOGARI, A.; ARAI, M.; MOGI, M.; KONDO, A.; NAGATSU, T. Coexpression of GTP cyclohydrolase I and inducible nitric oxide synthase mRNAs in mouse osteoblastic cells activated by proinflammatory cytokines. **FEBS Lett.**, v.428, n.3, p.212-216, 1998.

TORIGOE, D.Y.; LAURINDO, I.M. Artrite reumatóide e doenças cardiovasculares. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, p. 60-66, 2006.

TORRES, L.; ANDERSON, C.; MARRO, P.; MISHRA, O.P.; DELIVORIA-PAPADOPOULOS, M. Cyclooxygenase-mediated generation of free radicals during hypoxia in the cerebral cortex of newborn piglets. **Neurochem. Res.**, v. 29, n. 10, p. 1825-1830, 2004.

TOSHIMORI K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. **Microsc. Res. Tech.**, v. 61, n. 1, p. 1-6, 2003.

VALDEZ, N.F. Endotelina-1: vasoconstrictor intrínseco del endotélio vascular. **Rev. Med.**, v. 21, n. 2, p. 64-78, 2013.

VALLE, R.M.; ABREU, L.C.; PICARELLI, Z.P.; VALLE, J.R. Influence of castration upon trophism and reactivity of rat seminal vesicles. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 15, n. 1, p. 49-53, 1982.

VANHOUTTE, P. M.; SHIMOKAWA, H.; FELETOU, M.; TANG, E. H. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiol. (Oxf)**, v. 219, n. 1, p. 22-96. 2016.

XU, L.; FREEMAN, G.; COWLING, B.J. ; SCHOOLING, C.M. Testosterone therapy and cardiovascular events among men: a systematic review and meta-analysis of placebo-controlled randomized trials. **BMC Med.**, v. 11, n. 1, p.108, 2013.

YILMAZ, B.; CANPOLAT, S.; SANDAL, S.; AKPOLAT, N.; KUTLU, S.; IHLAN, N.; KELESTIMUR, H. Paint thinner exposure inhibits testosterone synthesis and secretion in a reversible manner in the rat. **Reprod. Toxicol.**, v. 22, n. 4, p. 791-796, 2006.

YKI-JÄRVINEN, H.; BERGHOLM, R.; LEIRISALO-REPO, M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 62, n. 7, p. 630-634, 2003.

WANG, C.; SWERDLOFF, R.S.; IRANMANESH, A.; DOBS, A.; SNYDER, P.J.; CUNNIGAN, G.; MATSUMOTO, A.M.; WEBER, T.; BERMAN, N. Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition parameters in hypogonadal men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.85, n.8, p.2839-2853, 2000.

WHITE, R.M.; RIVERA, C.O.; DAVISON, C.A. Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms account for gender differences in vasodilation to acetylcholine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, n. 1, p. 375-380, 2000.

WRUCK, C.J.; FRAGOULIS, A.; GURZYNSKI, A.; BRANDENBURG, L.O.; KAN, Y. W.; CHAN, K. et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 70, n. 5, p. 844-850, 2011

ZIEMENS, B.; WALLASCHOFSKI, H.; VÖLZKE, H.; RETTIG, R.; DÖRR, M.; NAUCK, M.; KEEVIL, B.G.; BRABANT, G.; HARING, R. Positive association between testosterone, blood pressure, and hypertension in women: longitudinal findings from the Study of Health in Pomerania. **J. Hypertens.**, v. 31, n. 6, p.1106-13, 2013.