

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

MICHELLY CRISTINA MONTENOTE

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

Botucatu - SP
2021

MICHELLY CRISTINA MONTENOTE

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

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

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

Botucatu - SP
2021

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Michelly Cristina Montenote

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

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

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Spadella

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies – Presidente

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

Profa. Dra. Gabriela Palma Zochio

Prof. Dra Liliam Fernandes

Prof. Dra. Maria Aparecida de Oliveira

Data da aprovação: 30 de agosto de 2021.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(George Bernard Shaw)

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite reumatoide

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

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

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

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

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

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



Fonte: Material elaborado pela própria autora.

1.2 Manifestações cardiovasculares da artrite

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3 Territorialidade das manifestações cardiovasculares da artrite

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar as repercussões da AIA sobre as respostas contráteis das grandes veias centrais de ratos à noradrenalina e a angiotensina II.

2.2 Específicos

2.2.1 Verificar se as modificações de resposta induzidas pela AIA diferem a depender do agonista indutor da venoconstrição.

2.2.2 Verificar se as modificações de resposta à noradrenalina e/ou angiotensina II, induzidas pela AIA, diferem a depender do tempo de evolução do modelo

2.2.3 Verificar se as modificações de resposta à noradrenalina e/ou angiotensina II, induzidas pela AIA, diferem a depender da veia estudada

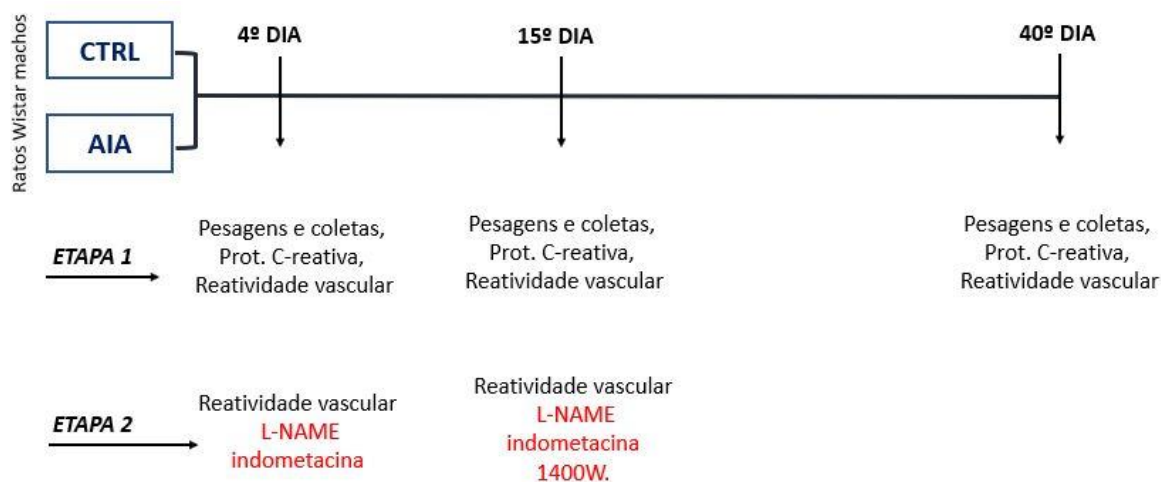
2.2.4 Verificar se as modificações de resposta à noradrenalina e/ou angiotensina II, induzidas pela AIA, envolvem mecanismos relacionados ao óxido nítrico e/ou prostanoides.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 90 ratos *Wistar* machos adultos provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA) com 10 semanas de idade. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no biotério de apoio do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Marília, em gaiolas-caixa de polipropileno padrão, com três animais por caixa, em ambiente com iluminação controlada ciclo claro-escuro de 12/12 horas, temperatura entre 20°C a 25°C e com alimentação e água *ad libitum*. A forma de tratamento, cuidados e eutanásia dos animais foram realizados em estrita conformidade com as recomendações da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FAMEMA) aprovado em Reunião Ordinária, registrado sob processo número 092/17.

3.1 Grupos e delineamento experimental

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: Controle (CTRL): submetidos a falsa indução de AIA; AIA 4: estudado 4 dias após a indução de AIA; AIA 15: estudado 15 dias após a indução de AIA; AIA 40: estudado 40 dias após a indução de AIA. Para cada grupo de AIA, avaliado nos diferentes tempos de evolução do modelo (4, 15 e 40 dias), havia um grupo de CTRL de mesma idade e massa corporal sendo estudado em paralelo. Para a determinação da proteína C – reativa os três subgrupos dos animais controle, foram agrupados em um único grupo controle. Por fim, os experimentos foram realizados conforme mostrado no diagrama a seguir:



3.2 Artrite induzida por adjuvante (AIA)

Os ratos foram pesados em balança (modelo 9094c/5, Toledo, Brasil) e, em seguida, posicionados em decúbito ventral com contenção manual, sobre campo cirúrgico para realização do procedimento de indução ou falsa-indução. A indução do grupo AIA consistiu na administração de 100 µL de uma emulsão à base de óleo mineral e água destilada, contendo 3,8 mg/ mL de *Mycobacterium tuberculosis* dessecadas - H37RV (Difco, Detroit, MI, USA), por via intradérmica, na planta da pata traseira direita. Os animais do grupo CTRL foram submetidos ao procedimento de falsa-indução, onde foi administrado 100 µL óleo mineral (HARUNA et al., 2006; HARUNA et al., 2007; SAKUTA et al., 2010).

3.3 Avaliação das manifestações articulares das patas

A avaliação de processo inflamatório articular foi feita pela medida do diâmetro das articulações tibiotársicas da pata esquerda, contralateral à que foi submetida ao protocolo de indução, com intuito de observar as repercussões sistêmicas da inflamação. Para isso, utilizou-se um paquímetro analógico (precisão de 0,05 mm). Esta avaliação do processo inflamatório articular foi complementada por medidas do volume (em mL) da mesma pata, com auxílio de um pletismômetro de água (Bonther®). Cabe ressaltar que, todas as medidas foram realizadas pelo mesmo avaliador.

3.4 Coleta do material

Os animais foram pesados e mortos por inalação de dióxido de carbono. Em seguida, foram exsanguinados através de punção da veia cava inferior, com auxílio de seringas com capacidade para 10mL. Durante a exanguinação, amostras de sangue foram coletadas e colocadas em tubos heparinizados para a separação do plasma. Outras amostras foram colocadas em tubos contendo ativador de coagulação para a separação do soro. Esses tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min à 4°C e, em seguida, alíquotas de plasma ou soro foram separadas e estocadas a -80°C para posteriores análises. Imediatamente após a coleta do sangue, as veias cava, femoral, mesentérica e porta desses animais foram dissecadas e colhidas para serem utilizadas nos experimentos de reatividade vascular.

3.5 Reatividade vascular

Imediatamente após a exsanguinação, veias cava, femoral, mesentérica e porta foram coletadas dos animais. Em uma placa de Petri recoberta com parafina, sob lupa, esses segmentos das veias cava, femoral, mesentérica e porta foram separados dos tecidos adjacentes e seccionadas em anéis de aproximadamente 3 mm de comprimento. Em seguida, esses anéis foram montados em cubas de órgão isolado com capacidade para 2mL, contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 130,0; KCl 4,7; CaCl 21,6; KH_2PO_4 1,2; MgSO_4 1,2; NaHCO_3 15,0 e glicose 11,1), com pH ajustado para 7,4, gaseificada com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2) e aquecida a 37 °C. Nestas cubas, os anéis foram mantidos entre 2 ganchos de aço inoxidáveis inseridos no lúmen, sendo que um deles foi afixado no fundo da cuba e o outro, a um transdutor isométrico de força, sob tensão basal de 0,5gf. Variações de tônus destas preparações foram registradas através de sistema Powerlab 8/30 data-acquisition system (AD Instruments, Castle-Hill, NSW, Austrália). Antes da determinação das curvas concentração-resposta, as preparações foram estabilizadas por 60 minutos. Neste período, bem como durante o experimento, a solução nutritiva foi substituída a cada 20 minutos. Para avaliação funcional da integridade endotelial, estas preparações foram pré-contráidas com fenilefrina (10^{-5}M), e em seguida desafiadas com ACh (10^{-5}M). Relaxamentos superiores a 50% foram considerados indicativos de viabilidade endotelial.

O estudo da reatividade vascular consistiu no desafio dessas preparações com NOR; (10^{-10} - 10^{-4} M) e Ang II (10^{-11} - 10^{-6} M), tanto na ausência quanto na presença de L-NAME 10^{-4} M (inibidor não seletivo de NOS) e/ou indometacina 10^{-5} M (inibidor não seletivo da COX) e, ainda, com 1400w 10^{-6} M (inibidor seletivo da iNOS). Estes inibidores foram administrados diretamente no banho de órgãos, 20 minutos antes do desafio das preparações.

As respostas vasomotoras decorrentes dos desafios das preparações com NOR ou Ang II foram expressas graficamente como curvas concentração-resposta e, a partir destas, obteve-se a pEC_{50} que indica sensibilidade da preparação ao agonista estudado. Esse parâmetro foi calculado por regressão não linear através do software Prisma 6.0 (GraphPad Software Corporation). Cabe esclarecer que não foi possível calcular a pEC_{50} para as curvas de Ang II uma vez que essas nem sempre assumiram uma conformação sigmoidal. Além da pEC_{50} , analisou-se também a resposta máxima (R_{max}) registrada em cada preparação frente a NOR e à Ang II.

3.6 Determinação da proteína C-reativa (PCR)

A PCR foi determinada no soro dos animais por meio do kit PCR – LÁTEX (Ebram Produtos Laboratoriais Ltda®), de acordo com as orientações do fabricante. Trata-se de um método qualitativo de aglutinação em látex (10 uL amostra/ 10 uL de látex). Uma vez observada a aglutinação (resultado positivo), faz-se em seguida a diluição do soro em solução salina para a titulação (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e assim por diante). Dessa forma, obtém-se um resultado semiquantitativo, expresso pela diluição mais alta que produza aglutinação visível na placa. Este teste foi realizado em todos os animais estudados.

3.7 Análise dos resultados

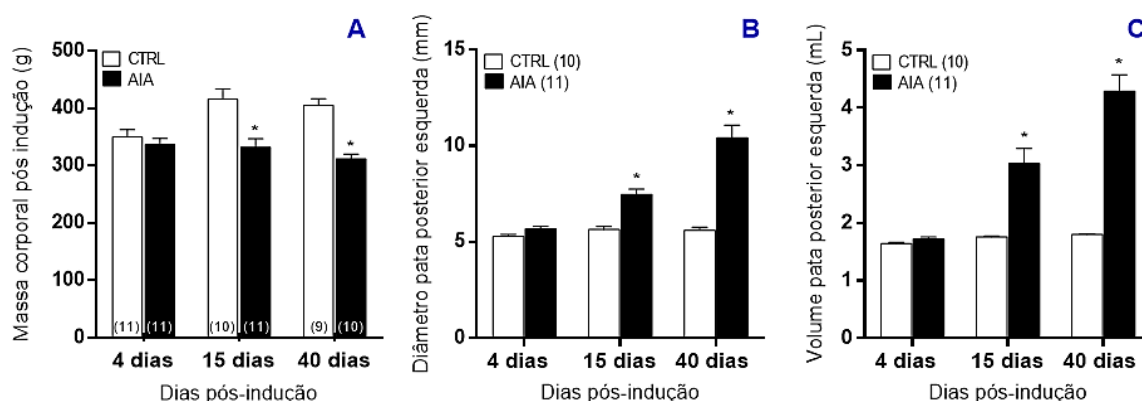
Os resultados foram organizados sob a forma de estatística descritiva, com valores de média e desvio padrão. A distribuição de normalidade foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, com correção de Lillifors, e a homogeneidade das variâncias, pelo teste de Levene. Para comparação de dois grupos independentes foi utilizado o teste “t” de Student, enquanto para três ou mais grupos, o teste de ANOVA de uma via. Foram feitas também ANOVA de duas vias com o objetivo de testar os efeitos de tempo, grupo e interação. Quando o efeito de foi estatisticamente significativo, procedeu-se ao teste Post-Hoc de Holm-Sidak. Para as variáveis que violaram os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para as condições independentes de mais de dois grupos e o teste de Mann-Whitney para comparação Post-hoc com correção de Holm-Sidak. Para todas as análises utilizou-se o software SPSS versão 19.0 for Windows, sendo adotado nível de significância de 5%. Foi utilizado o software IBM SPSS 21, 2012, da IBM Corporation para análise dos dados. Devido à natureza das variáveis em estudo, utilizou-se número de animais em estudo em cada grupo, média, desvio-padrão, mediana, valor mínimo e valor máximo.

4 RESULTADOS

4.1 Massa corporal e dimensões das patas contralaterais

A pesagem dos animais nos diferentes tempos pós-indução, revelou que o ganho de peso nos animais submetidos à AIA foi menor em relação aos animais CTRL (Figura 2A). Por outro lado, AIA promoveu aumento significativo tanto do diâmetro (Figura 2B) quanto do volume (Figura 2C) das patas posteriores esquerda dos animais estudados. Esse aumento foi percebido no 15º, mas foi ainda maior no 40º dia de desenvolvimento da AIA.

Figura 2 - Massa corporal (A), diâmetro (B) e volume (C) da pata posterior esquerda dos animais CTRL (□) e AIA; (■) obtida nos diferentes dias pós indução



Nota: Entre parênteses o número da amostra. Barras indicam média $\pm$ erro padrão da média. Diferença significativa em relação ao grupo CTRL pelo teste Post-Hoc de Holm-Sidak ($p \leq 0,05$). Fonte: Material elaborado pela própria autora

4.2 Proteína C-Reativa

A AIA promoveu aumento significativo de PCR, em relação ao grupo CTRL, nos três momentos estudados. Vale destacar, contudo, que os valores de PCR são maiores entre no 4º e no 15º dia pós-indução, tendo uma evidente diminuição no 40º dia. Vale observar que os animais CTRL apresentaram uma discreta elevação de PCR no 4º dia após a falsa indução, que não foi verificada no 15º ou no 40º dia (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores semi-quantitativos de PCR

	4 dias	15 dias	40 dias
Grupo	Med (25th - 75th)	Med (25th - 75th)	Med (25th - 75th)
	72,0 (30,0 - 168,0) ^Φ	96 (60,0 - 168,0) ^Φ	24 (6 - 48) ^{†‡Φ}
AIA	(12)	(12)	(12)
	3,0 (0,0 - 10,5)	0 (0 - 0) [†]	0 (0 - 0) [†]
CTRL	(12)	(12)	(12)

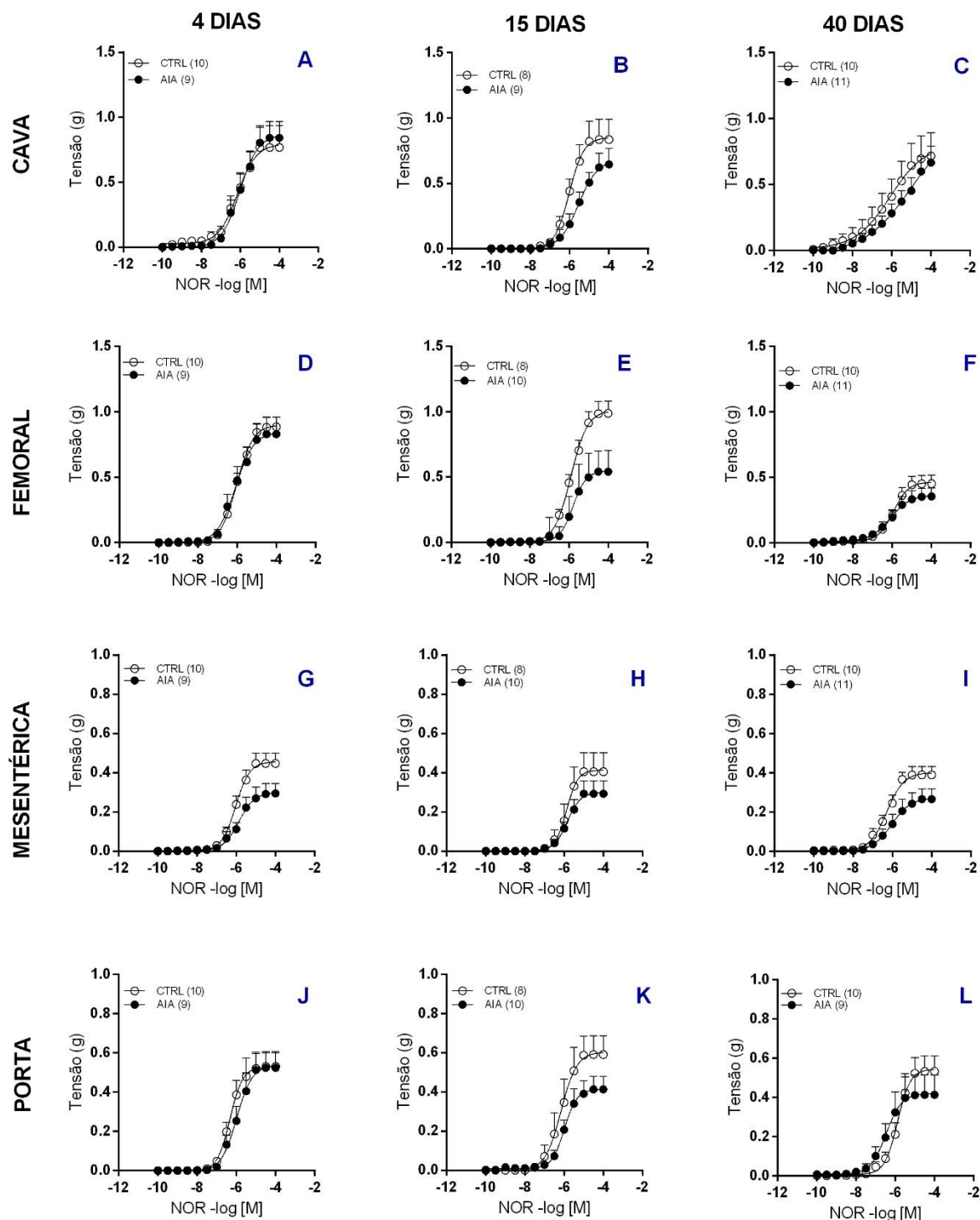
† $p \leq 0,05$ diferença significativa em relação a 4 dias dentro do grupo pelo teste de Mann-Whitney com correção de Holm-Sidak. ‡ $p \leq 0,05$ diferença significativa em relação a 15 dias dentro do grupo pelo teste de Mann-Whitney com correção de Holm-Sidak. Φ $p \leq 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo CTRL dentro do tempo pelo teste de Mann-Whitney.

4.3 Reatividade Vascular

4.3.1 Influência da AIA sobre as respostas à NOR nos diferentes tempos pós-indução

A NOR promoveu respostas contráteis evidentes e mensuráveis em todos os segmentos venosos estudados, tanto nos animais CTRL quanto nos animais AIA. Essas respostas contráteis à NOR foram observadas aos 4, 15 e 40 dias pós-indução da AIA (Figura 3).

Figura 3 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias cava, femoral, mesentérica e porta, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (o) e artrite (●) nos diferentes tempos pós-indução. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

As respostas das veias estudadas à NOR tendem a ser menores nos animais submetidos à AIA em relação aos seus controles, sobretudo no 15º dia pós-indução. Além

disso, a influência da AIA nas respostas à NOR varia a depender do segmento venosos estudado. Dessa forma, observou-se redução significativa de Rmax à NOR promovidas pela AIA apenas na veia femoral, 15 dias pós-indução (Tabela 2). Vale destacar que, no 40º dia pós-indução, o padrão de resposta à NOR observado em todas as veias estudadas foi semelhante entre os animais CTRL e AIA.

Tabela 2 – Resposta máxima e valores de pEC₅₀ para as curvas de noradrenalina obtidas das preparações de veias cava, femoral, mesentérica e porta dos grupos CTRL e AIA nos tempos 4, 15 e 40 dias

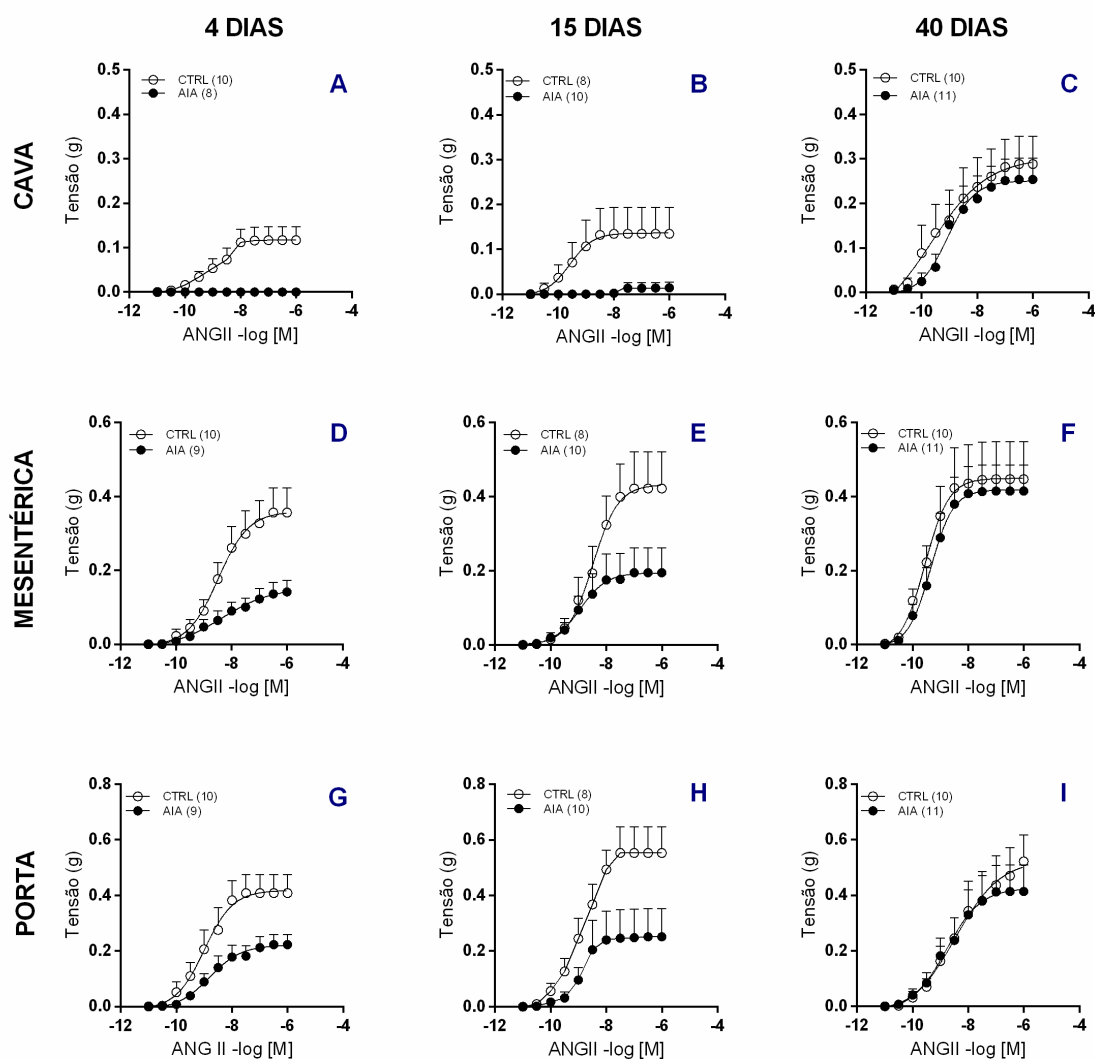
Tratamento	Rmax		pEC ₅₀	
	CTRL	AIA	CTRL	AIA
CAVA				
4 dias	0,77±0,57 (10)	0,84±0,38 (09)	6,18±0,46 (10)	5,63±0,75 (09)
15 dias	0,84±0,43 (08)	0,65±0,36 (09)	5,99±0,44 (08)	5,55±0,46 (09)
40 dias	0,72±0,56 (10)	0,67±0,42 (11)	6,17±0,69 (10)	5,86±0,95 (11)
FEMORAL				
4 dias	0,89±0,24 (10)	0,83±0,39 (09)	6,05±0,36 (10)	6,11±0,43 (09)
15 dias	0,99±0,27 (10)	0,54±0,16*‡ (10)	5,93±0,32 (10)	5,73±0,32 (10)
40 dias	0,39±0,22‡ [§] (10)	0,35±0,02‡ (11)	5,96±0,37 (10)	6,09±0,50 (11)
MESENTÉRICA				
4 dias	0,45±0,164 (10)	0,29±0,15 (09)	6,03±0,32 (10)	5,77±0,61 (09)
15 dias	0,41±0,27 (08)	0,27±0,21 (10)	5,81±0,33 (08)	5,82±0,28 (10)
40 dias	0,39±0,13 (10)	0,27±0,17 (11)	6,22±0,39 (10)	5,83±0,62 (11)
PORTA				
4 dias	0,53±0,24 (10)	0,52±0,23 (09)	6,20±0,59 (10)	5,89±0,59 (09)
15 dias	0,59±0,27 (08)	0,41±0,21 (10)	6,04±0,50 (08)	6,17±0,86 (10)
40 dias	0,53±0,25 (10)	0,41±0,30 (09)	5,31±1,91 (10)	4,90±3,32 (09)

Nota: * p≤0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle dentro do mesmo tempo pelo teste post-hoc de Bonferroni ou pelo teste de Mann-Whitney com correção de Holm-Sidak para dados não paramétricos; ‡ p≤0,05 diferença significativa em relação 4 dias dentro do grupo pelo teste post-hoc de Bonferroni ou pelo teste de Mann-Whitney com correção de Holm-Sidak para dados não paramétricos; § p≤0,05 diferença significativa em relação 15 dias dentro do grupo pelo teste post-hoc de Bonferroni ou pelo teste de Mann-Whitney com correção de Holm-Sidak para dados não paramétricos.

4.3.2 Influência da AIA sobre as respostas à angiotensina II nos diferentes tempos pós-indução

A Ang II promoveu respostas contráteis evidentes e mensuráveis sobretudo nas veias cava, mesentérica e porta. Já nas veias femorais, as respostas à Ang II foram muito discretas e irregulares, o que inviabilizou a inclusão desses dados no presente estudo. Paralelamente, observou-se que as respostas contráteis induzidas pela Ang II nessas veias foram atenuadas pela AIA na fase mais precoce do modelo, no 4º (Figuras 4A, 4D e 4G) e no 15º (Figuras 4B, 4E e 4H) dia após a indução. No 4º dia pós-indução, essa redução de resposta à Ang II traduziu-se em redução significativa de Rmax na cava e na veia mesentérica, mas não na veia porta. Já no 15º pós-indução, essa redução de resposta implicou em redução significativa da Rmax em todos os leitos estudados (Tabela 3). Por outro lado, no 40º dia pós-indução, a AIA não modificou o padrão de resposta à Ang II em nenhuma das veias estudadas (Figuras 4C, 4F e 4I).

Figura 4 - Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações isoladas de veias cava, mesentérica e porta, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (o) e artrite (●) nos diferentes tempos pós-indução. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

Tabela 3 – Resposta máxima para as curvas de angiotensina II obtidas das preparações de veias cava, mesentérica e porta dos grupos CTRL e AIA nos tempos 4, 15 e 40 dias

Tratamento	Rmax	
	CTRL	AIA
CAVA		
4 dias	0,12±0,09 (10)	0,00±0,00* (08)
15 dias	0,13±0,17 (08)	0,01±0,04* (10)
40 dias	0,31±0,07 (10)	0,25±0,02‡ [♢] (11)
MESENTÉRICA		
4 dias	0,36±0,21 (10)	0,14±0,09* (09)
15 dias	0,42±0,28 (08)	0,19±0,21* (10)
40 dias	0,47±0,31 (10)	0,48±0,22‡ [♢] (11)
PORTA		
4 dias	0,41±0,21 (10)	0,22±0,11 (09)
15 dias	0,55±0,26 (08)	0,25±0,32* (10)
40 dias	0,52±0,30 (10)	0,41±0,32 (09)

* $p \leq 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle dentro do mesmo tempo pelo teste post-hoc de Bonferroni ou pelo teste de Mann-Whitney com correção de Holm-Sidak para dados não paramétricos; ‡ $p \leq 0,05$ diferença significativa em relação 4 dias dentro do grupo pelo teste post-hoc de Bonferroni ou pelo teste de Mann-Whitney com correção de Holm-Sidak para dados não paramétricos; [♢] $p \leq 0,05$ diferença significativa em relação 15 dias dentro do grupo pelo teste post-hoc de Bonferroni ou pelo teste de Mann-Whitney com correção de Holm-Sidak para dados não paramétricos.

4.3.3 Participação do NO e prostanoídes nas modificações das respostas das veias à noradrenalina induzidas pela AIA.

Uma vez que as principais modificações de resposta à NOR ocorreram nas etapas iniciais do desenvolvimento da AIA, mais precisamente no 4° ou no 15° pós indução, optamos por investigar a participação do NO e prostanoídes na modulação das respostas dessas veias à noradrenalina nesses dois momentos.

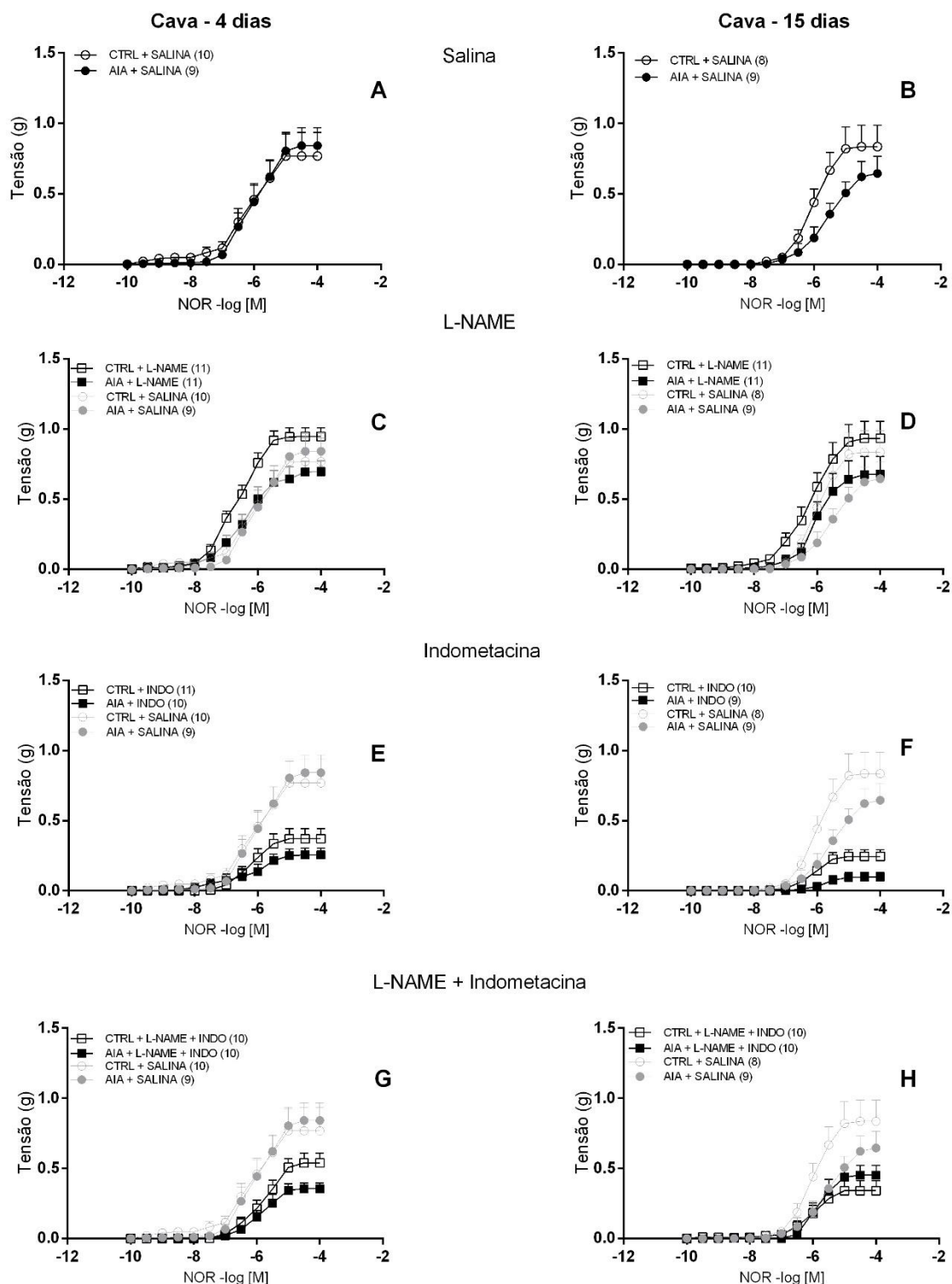
4.3.3.1 Veia cava

A AIA não modificou significativamente os valores de Rmax ou pEC₅₀ para NOR nem no 4° nem tampouco no 15° pós indução. Em paralelo, também não foram observadas modificações significativas das respostas à NOR induzidas pela AIA em nenhum desses tempos, quando essas preparações foram desafiadas na presença de L-NAME, indometacina

ou de ambos os inibidores (Figura 5, Tabela 4). Vale destacar, todavia, que a incubação dessas preparações com indometacina reduziu a R_{max} tanto das preparações obtidas de animais CTRL quanto daquelas obtidas de animais submetidos à AIA, aos 4 e aos 15 dias após a indução (Figuras 5E e 5F; Tabela 4). Uma redução de R_{max} da NOR de magnitude um pouco menor ocorreu quando a incubação com indometacina foi concomitante à incubação com L-NAME mas, com exceção nos animais AIA 15 dias, ainda assim foi significativa em relação às preparações não tratadas (Figuras 5G e 5H; Tabela 4). Essas modificações de resposta à NOR que ocorreram na presença de indometacina não foram tão evidentes em termos de pEC_{50} .

A presença do L-NAME, por outro lado, promoveu um deslocamento à esquerda das curvas concentração-resposta. Por conta disso, os valores de pEC_{50} elevaram-se em relação às preparações não tratadas, embora não significativamente. Nos animais estudados 15 dias após a indução/falsa indução da AIA, esse deslocamento das curvas promovido pelo L-NAME foi um pouco mais acentuado nos animais CTRL, evidenciando assim uma redução significativa de pEC_{50} decorrente da AIA (Figuras 5C e 5D; Tabela 4). Na presença concomitante de L-NAME e indometacina, no entanto, essa diferença de resposta deixou de ser estatisticamente significativa (Figuras 5G e 5H; Tabela 4).

Figura 5 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias cava, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle ($\square$) e artrite ($\blacksquare$) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10 $\cdot$ 4 M e indometacina 10 $\cdot$ 5 M. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

Tabela 4 – Resposta máxima e valores de pEC₅₀ de preparações obtidas da veia cava para as curvas de noradrenalina dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores

Tratamento	Rmax		pEC ₅₀	
	CTRL	AIA	CTRL	AIA
4 DIAS				
Salina	0,76±0,54 (10)	0,84±0,38 (09)	6,18±0,46 (10)	5,63±0,75 (09)
L-NAME	0,94±0,21 (11)	0,69±0,26 (11)	6,74±0,37 [‡] (11)	6,39±0,69 [‡] (11)
INDO	0,37±0,24 [‡] (11)	0,25±0,15 [‡] (10)	6,22±0,45 (11)	6,40±0,84 [‡] (10)
L-NAME + INDO	0,54±0,22 [‡] (10)	0,35±0,13 [‡] (10)	5,91±0,55 [‡] (10)	5,85±0,50 (10)
15 DIAS				
Salina	0,83±0,43 (08)	0,64±0,36 (09)	5,92±0,44 (08)	5,55±0,46 (09)
L-NAME	0,93±0,41 (11)	0,67±0,42 (11)	6,33±0,54 (11)	5,93±0,47* (11)
INDO	0,24±0,15 [‡] (10)	0,09±0,10 [‡] (09)	6,03±0,36 (10)	5,87±0,75 (09)
L-NAME + INDO	0,36±0,22 [‡] (10)	0,45±0,22 [‡] (11)	6,07±0,54 (10)	5,73±0,34 (10)

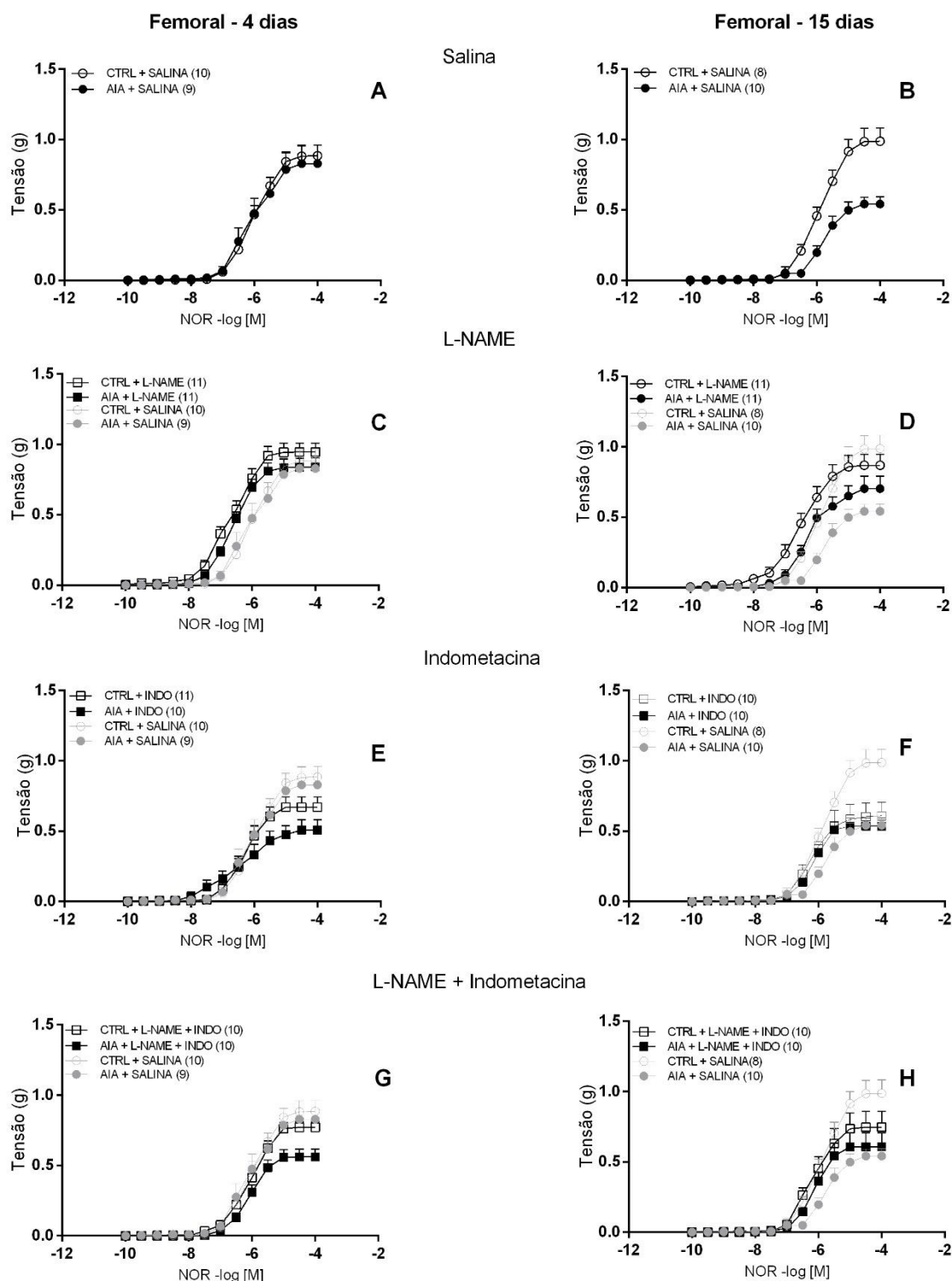
Diferenças significativas estão expressas quando entre grupos (na horizontal) e entre tratamentos (na vertical) pela correção Post-Hoc de Holm-Sidak para p-valor ≤ 0,05. * Diferença significativa em relação ao grupo controle dentro do tratamento; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com salina dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com L-NAME dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com INDO dentro do mesmo grupo.

4.3.3.2 Veia femoral

A AIA não promoveu modificações perceptíveis das respostas das veias femorais à NOR no 4º dia pós-indução (Figura 6A), mas reduziu a Rmax da NOR dessas respostas no 15º dia (Figura 6B; Tabela 5). Essa redução de resposta, todavia, não foi observada em preparações que foram desafiadas na presença do L-NAME (Figura 6D; Tabela 5). Por outro lado, a incubação com indometacina, isoladamente ou juntamente com o L-NAME, reduziu a magnitude das respostas das veias femorais à NOR, tanto nos animais CTRL quanto nos AIA, nos dois momentos estudados. Por conta disso, a redução da Rmax da NOR induzida pela AIA deixou de ser significativa na presença da indometacina uma vez que as preparações dos animais CTRL passaram a apresentar respostas à NOR semelhantes às observadas nas preparações obtidas dos animais AIA (Figuras 6F e 6H; Tabela 5).

Paralelamente, a presença do L-NAME promoveu um deslocamento à esquerda das curvas concentração-resposta para NOR, com elevação significativa de pEC_{50} , tanto nas preparações de animais CTRL quanto de AIA, aos 4 e aos 15 dias após a indução. Por outro lado, a presença da indometacina não levou a modificações significativas de pEC_{50} para NOR tanto nos animais CTRL quanto AIA, nos dois momentos estudados. Além disso, o deslocamento à esquerda das curvas causado pelo L-NAME, com consequente elevação de pEC_{50} , foi inibido pela co-incubação com indometacina (Tabela 5).

Figura 6 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias femoral, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle ($\square$) e artrite ($\blacksquare$) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10-4 M e indometacina 10-5 M. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

Tabela 5 – Resposta máxima e valores de pEC₅₀ de preparações obtidas da veia femoral para as curvas de noradrenalina dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores

Tratamento	Rmax		pEC ₅₀	
	CTRL	AIA	CTRL	AIA
4 DIAS				
Salina	0,89±0,24 (10)	0,83±0,39 (09)	6,05±0,36 (10)	6,10±0,43 (09)
L-NAME	0,94±0,21 (11)	0,84±0,21 (11)	6,68±0,38 [‡] (11)	6,62±0,31 [‡] (11)
INDO	0,67±0,24 [‡] (11)	0,50±0,23 [‡] (10)	6,25±0,31 [‡] (11)	6,54±0,93 (10)
L-NAME + INDO	0,77±0,12 (10)	0,56±0,17 ^{*‡} (10)	6,06±0,40 [‡] (10)	6,06±0,33 [‡] (10)
15 DIAS				
Salina	0,98±0,27 (08)	0,54±0,16 [*] (10)	5,93±0,32 (08)	5,72±0,32 (10)
L-NAME	0,87±0,26 (11)	0,70±0,29 (11)	6,49±0,35 [‡] (11)	6,20±0,48 [‡] (11)
INDO	0,60±0,30 (10)	0,54±0,19 (10)	6,05±0,47 [‡] (10)	6,15±0,19 (10)
L-NAME + INDO	0,75±0,36 (10)	0,61±0,31 (10)	6,29±0,41 (10)	6,18±0,29 [‡] (10)

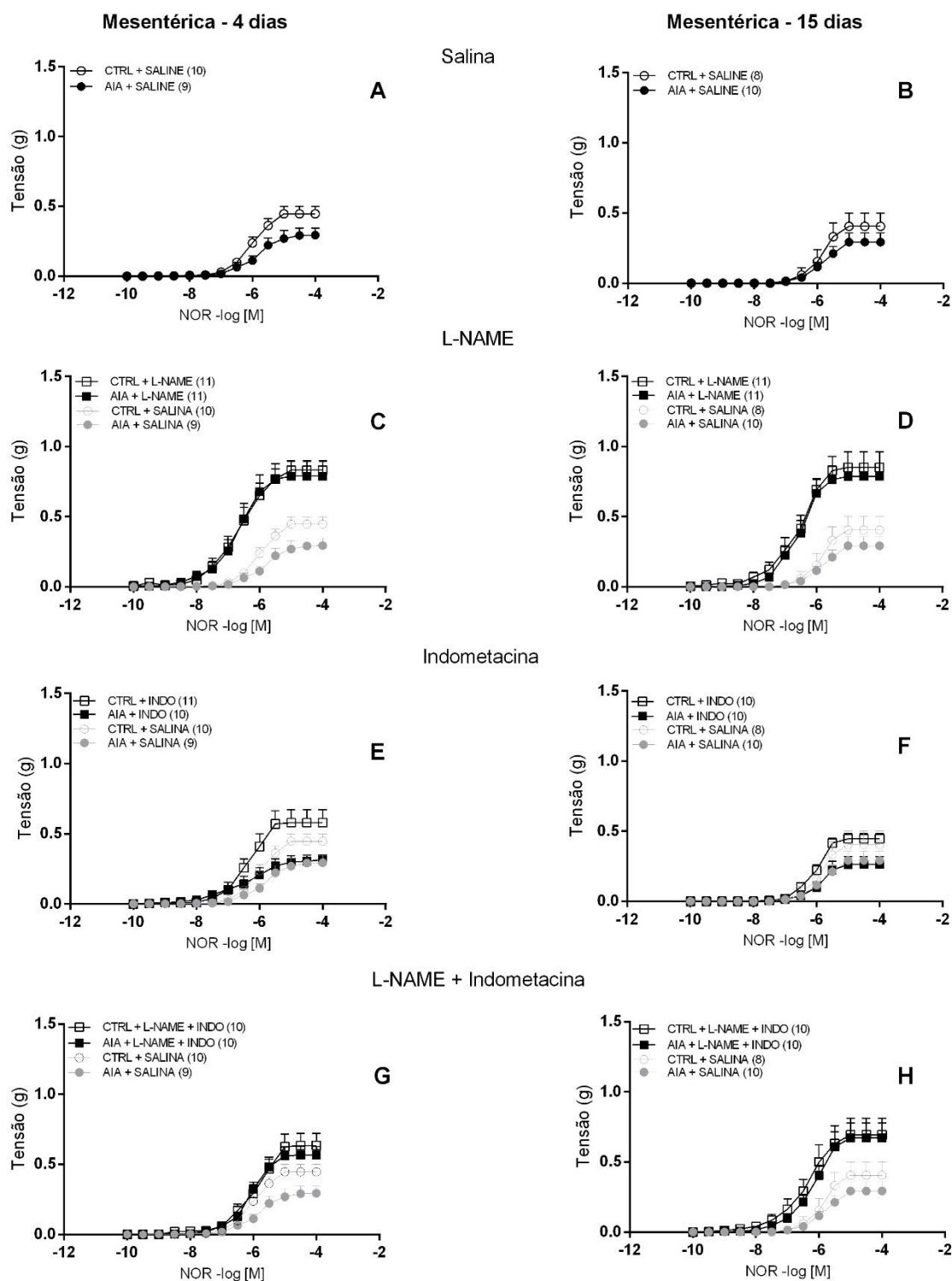
Diferenças significativas estão expressas quando entre grupos (na horizontal) e entre tratamentos (na vertical) pela correção Post-Hoc de Holm-Sidak para p-valor $\leq 0,05$. * Diferença significativa em relação ao grupo controle dentro do tratamento; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com salina dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com L-NAME dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com INDO dentro do mesmo grupo.

4.3.3.3 Veia mesentérica

Em veias mesentéricas desafiadas na ausência de bloqueios, não foram observadas modificações significativas de resposta à NOR induzidas pela AIA, tanto no 4º quanto no 15º dia após a indução (Figura 7A e 7B). Quando essas preparações foram desafiadas na presença de L-NAME, observou-se um evidente aumento na magnitude de resposta à NOR tanto nos animais CTRL quanto AIA, nos dois momentos estudados (Figura 7C e 7D). Por conta disso, os valores da Rmax e do pEC₅₀ para NOR foram significativamente elevados na presença do L-NAME, tanto nos animais CTRL quanto AIA, nos dois momentos estudado (Tabela 6). Esse aumento de resposta, todavia, foi atenuado pela co-incubação com indometacina (Figura 7G e 7H; Tabela 6).

Por outro lado, diferentemente daquilo que foi observado em veia femoral (Figura 6) e, sobretudo na veia cava (Figura 5), a indometacina não atenua as respostas à NOR na veia mesentérica. Pelo contrário, a incubação com indometacina elevou discretamente as respostas à NOR nas veias mesentéricas obtidas de animais CTRL, sem modificar essas respostas nos animais AIA. Com isso, no 4º dia após a indução, uma atenuação na Rmax da NOR decorrente da AIA foi evidenciada nessas preparações desafiadas na presença da indometacina (Figura 7E e 7F; Tabela 7).

Figura 7 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias mesentérica, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle ($\square$) e artrite ($\blacksquare$) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10-4 M e indometacina 10-5 M. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

Tabela 6 – Resposta máxima e valores de pEC₅₀ de preparações obtidas da veia mesentérica para as curvas de noradrenalina dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores

Tratamento	Rmax		pEC ₅₀	
	CTRL	AIA	CTRL	AIA
4 DIAS				
Salina	0,44±0,16 (10)	0,29±0,15 (09)	6,03±0,32 (10)	5,77±0,61 (09)
L-NAME	0,83±0,23 [‡] (11)	0,78±0,35 [‡] (11)	6,60±0,63 [‡] (11)	6,62±0,50 [‡] (11)
INDO	0,58±0,31 (11)	0,31±0,11 ^{*‡} (10)	6,24±0,34 (11)	6,28±1,04 (10)
L-NAME + INDO	0,63±0,27 (10)	0,57±0,19 (10)	5,90±0,47 [‡] (10)	6,04±0,29 [‡] (10)
15 DIAS				
Salina	0,40±0,27 (08)	0,27±0,21 (10)	5,80±0,33 (08)	5,82±0,28 (10)
L-NAME	0,85±0,36 [‡] (11)	0,78±0,31 [‡] (11)	6,60±0,55 [‡] (11)	6,46±0,40 [‡] (11)
INDO	0,44±0,12 [‡] (10)	0,26±0,18 [‡] (10)	6,07±0,31 [‡] (10)	5,80±0,24 [‡] (10)
L-NAME + INDO	0,69±0,38 (10)	0,67±0,33 [‡] (10)	6,27±0,40 (10)	6,18±0,38 (10)

Diferenças significativas estão expressas quando entre grupos (na horizontal) e entre tratamentos (na vertical) pela correção Post-Hoc de Holm-Sidak para p-valor $\leq 0,05$. * Diferença significativa em relação ao grupo controle dentro do tratamento; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com salina dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com L-NAME dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com INDO dentro do mesmo grupo.

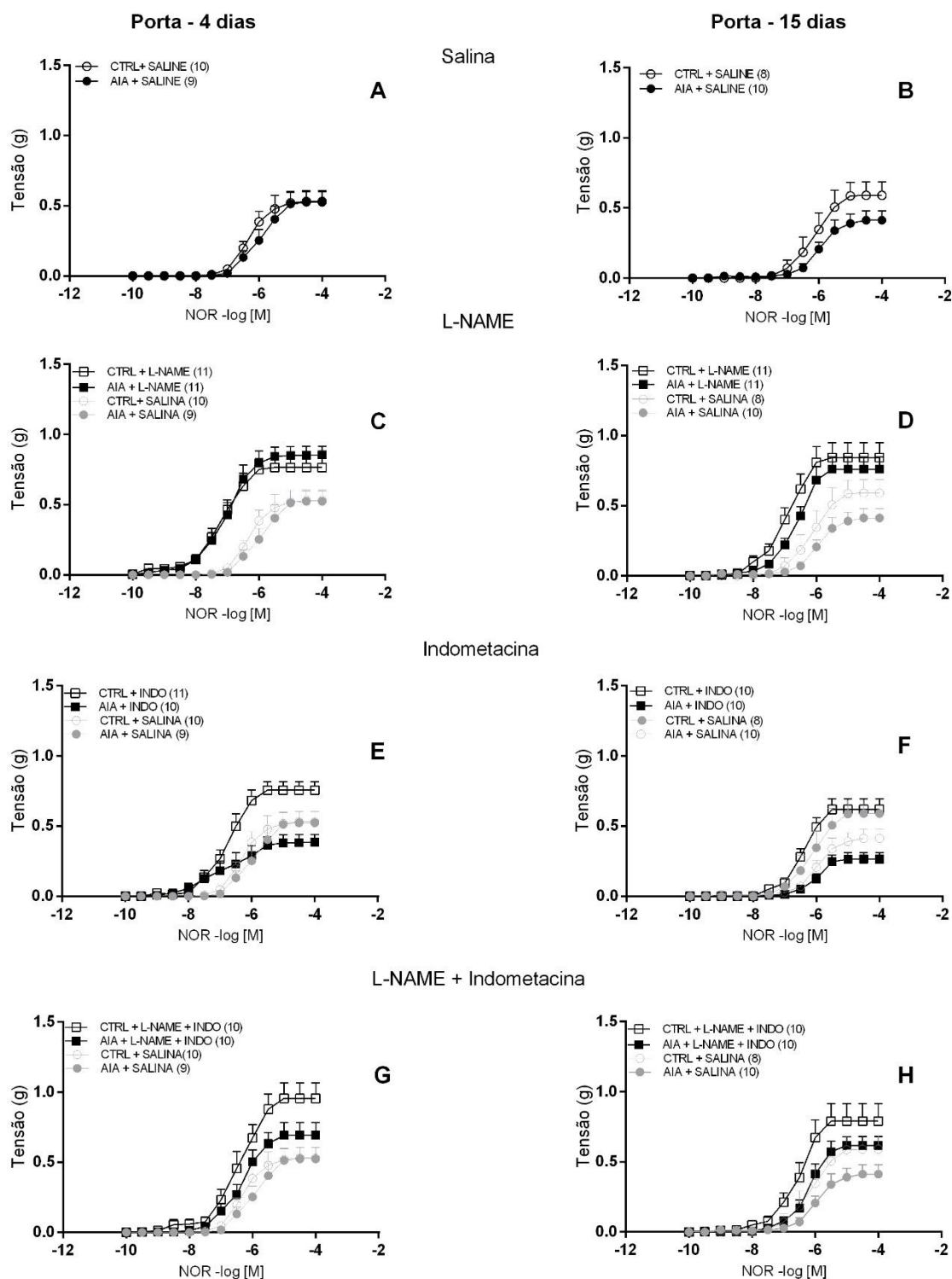
4.3.3.4 Veia porta

Na ausência de L-NAME e/ou indometacina, não foram observadas modificações significativas de resposta à NOR induzidas pela AIA, tanto no 4º quanto no 15º dia após a indução (Figura 8A e 8B).

Além disso, da mesma forma que ocorreu na veia mesentérica (Figura 7), observou-se um evidente aumento na magnitude de resposta à NOR quando veias porta obtidas tanto de animais CTRL quanto AIA foram desafiadas na presença de L-NAME. Cabe destacar que isso ocorreu tanto no 4º quanto no 15º dia pós indução/falsa indução (Figura 8C e 8D). Essas elevações de resposta à NOR traduziram-se em elevação da Rmax, que atingiu significância estatística apenas nos animais submetidos à AIA, e de pEC₅₀ (Tabela 7).

A presença da indometacina elevou discretamente as R_{max} da NOR nas preparações obtidas de animais CTRL, mas não naquelas obtidas dos animais AIA. Isso ocorreu tanto no 4° quanto no 15° dia pós-indução (Figura 8E e 8F). Com isso evidenciou-se em ambos os momentos valores de R_{max} para NOR menores em preparações de animais AIA, em relação aos seus CTRL (Tabela 7). Paralelamente, na presença da indometacina houve aumento de pEC_{50} para NOR tanto nas preparações obtidas dos animais CTRL, que atingiu significância estatística, quanto na obtidas dos animais AIA. Por conta disso, não houve diferença de pEC_{50} entre animais CTRL e AIA. Elevações semelhantes de resposta à NOR foram observadas na presença de ambos os inibidores, indometacina e L-NAME, no 4° dia pós indução/falsa indução, permitindo também evidenciar uma redução de resposta imposta pela AIA nessa preparação. Já no 15° pós-indução/falsa indução, essa elevação da R_{max} à NOR ocorreu tanto em animais CTRL quanto AIA e, por conta disso, nenhuma diferença relacionada à AIA foi observada nessa condição. Todavia, nesses animais estudados no 15° dia pós indução/falsa indução, a presença concomitante de L-NAME e indometacina deslocou mais à esquerda as curvas concentração-resposta à NOR nas preparações dos animais CTRL do que naquelas dos AIA. Com isso, os valores de pEC_{50} foram menores nesses animais AIA (Tabela 7).

Figura 8 - Curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações isoladas de veias porta, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle ($\square$) e artrite ($\blacksquare$) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10 $\cdot$ 4 M e indometacina 10 $\cdot$ 5 M. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

Tabela 7 – Resposta máxima e valores de pEC₅₀ de preparações obtidas da veia porta para as curvas de noradrenalina dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores

Tratamento	Rmax		pEC ₅₀	
	CTRL	AIA	CTRL	AIA
4 DIAS				
Salina	0,53±0,24 (10)	0,52±0,23 (09)	6,20±0,59 (10)	5,88±0,59 (09)
L-NAME	0,77±0,24 (11)	0,85±0,20 [‡] (11)	7,12±0,42 [‡] (11)	6,90±0,52 [‡] (11)
INDO	0,76±0,20 (11)	0,38±0,18 ^{*‡} (10)	6,72±0,41 [‡] (11)	6,58±0,97 (10)
L-NAME + INDO	0,95±0,35 [‡] (10)	0,69±0,29 ^{*‡} (10)	6,47±0,46 [‡] (10)	6,34±0,41 [‡] (10)
15 DIAS				
Salina	0,59±0,27 (08)	0,41±0,21 (10)	6,042±0,50 (08)	6,17±0,86 (10)
L-NAME	0,84±0,36 (11)	0,76±0,29 [‡] (11)	6,89±0,44 [‡] (11)	6,61±0,31 [‡] (11)
INDO	0,62±0,24 (10)	0,26±0,15 ^{*‡} (10)	6,40±0,30 (10)	6,04±0,39 [‡] (10)
L-NAME + INDO	0,79±0,40 (10)	0,61±0,20 [‡] (10)	6,55±0,31 (10)	6,18±0,32 [*] (10)

Diferenças significativas estão expressas quando entre grupos (na horizontal) e entre tratamentos (na vertical) pela correção Post-Hoc de Holm-Sidak para p-valor $\leq 0,05$. * Diferença significativa em relação ao grupo controle dentro do tratamento; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com salina dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com L-NAME dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com INDO dentro do mesmo grupo.

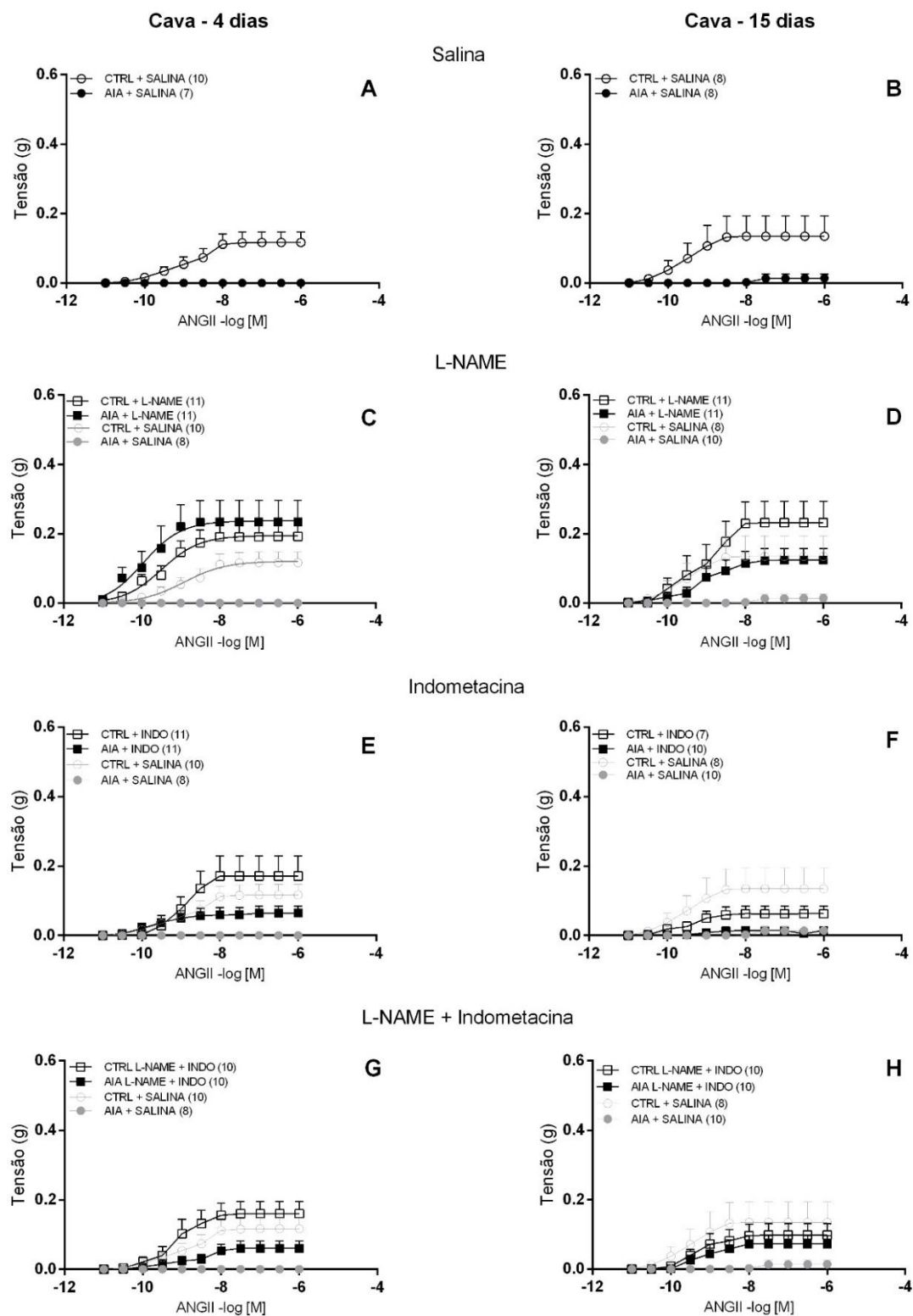
4.3.4 Participação do NO e prostanoídes nas modificações das respostas das veias à angiotensina II induzidas pela AIA.

4.3.4.1 Veia cava

Como já havia sido observado anteriormente (Figura 4), a AIA reduziu significativamente as respostas da veia cava à Ang II tanto no 4º quanto no 15º dia após a indução (Figuras 9A e 9B), o que levou à reduções significativas nos valores da Rmax (Tabela 8).

Quando os desafios foram feitos na presença do L-NAME, observou-se respostas maiores à Ang II tanto nas preparações obtidas de animais pertencentes ao grupo CTRL quanto naquelas obtidas de animais AIA. Dessa forma, não mais se observou diferenças de resposta à Ang II, em termos da Rmax, entre os animais CTRL e AIA. Vale destacar que isso ocorreu tanto no 4º quanto no 15º dia após indução/falsa indução da AIA (Figuras 9C e 9D; Tabela 8).

Figura 9 - Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações isoladas de veias cava, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle ($\square$) e artrite ($\blacksquare$) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10 $\cdot$ 4 M e indometacina 10 $\cdot$ 5 M. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

Quando as preparações obtidas de animais estudados no 4º dia foram desafiadas com Ang II na presença da indometacina, observou-se que o aumento da Rmax nos animais CTRL foi menor que o observado no L-NAME e, nos animais AIA, isso praticamente não ocorreu (Figura 9E). Apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa, os valores da Rmax foram menores nos animais AIA estudados no 4º dia, quando comparado ao CTRL (Tabela 8). Por outro lado, no 15º pós-indução/falsa indução, o padrão das respostas à Ang II foi menor em ambos os grupos, mesmo assim, as Rmax determinadas nas preparações obtidas dos animais AIA foram significativamente menores em relação aos determinados nas preparações dos seus CTRL (Figura 9F; Tabela 8).

Tabela 8 – Resposta máxima de preparações obtidas da veia cava para as curvas de angiotensina II dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores

Tratamento	Rmax	
	CTRL	AIA
4 DIAS		
Salina	0,12±0,10 (10)	0,04±0,13* (08)
L-NAME	0,19±0,13 (11)	0,23±0,21 [‡] (11)
INDO	0,17±0,19 (11)	0,06±0,07 [‡] (11)
L-NAME + INDO	0,16±0,11 (10)	0,06±0,07* [‡] (10)
15 DIAS		
Salina	0,13±0,17 (08)	0,01±0,04* (10)
L-NAME	0,23±0,20 [‡] (11)	0,12±0,11 [‡] (11)
INDO	0,06±0,06 [‡] (07)	0,01±0,03* [‡] (10)
L-NAME + INDO	0,10±0,10 (10)	0,07±0,08 [‡] (10)

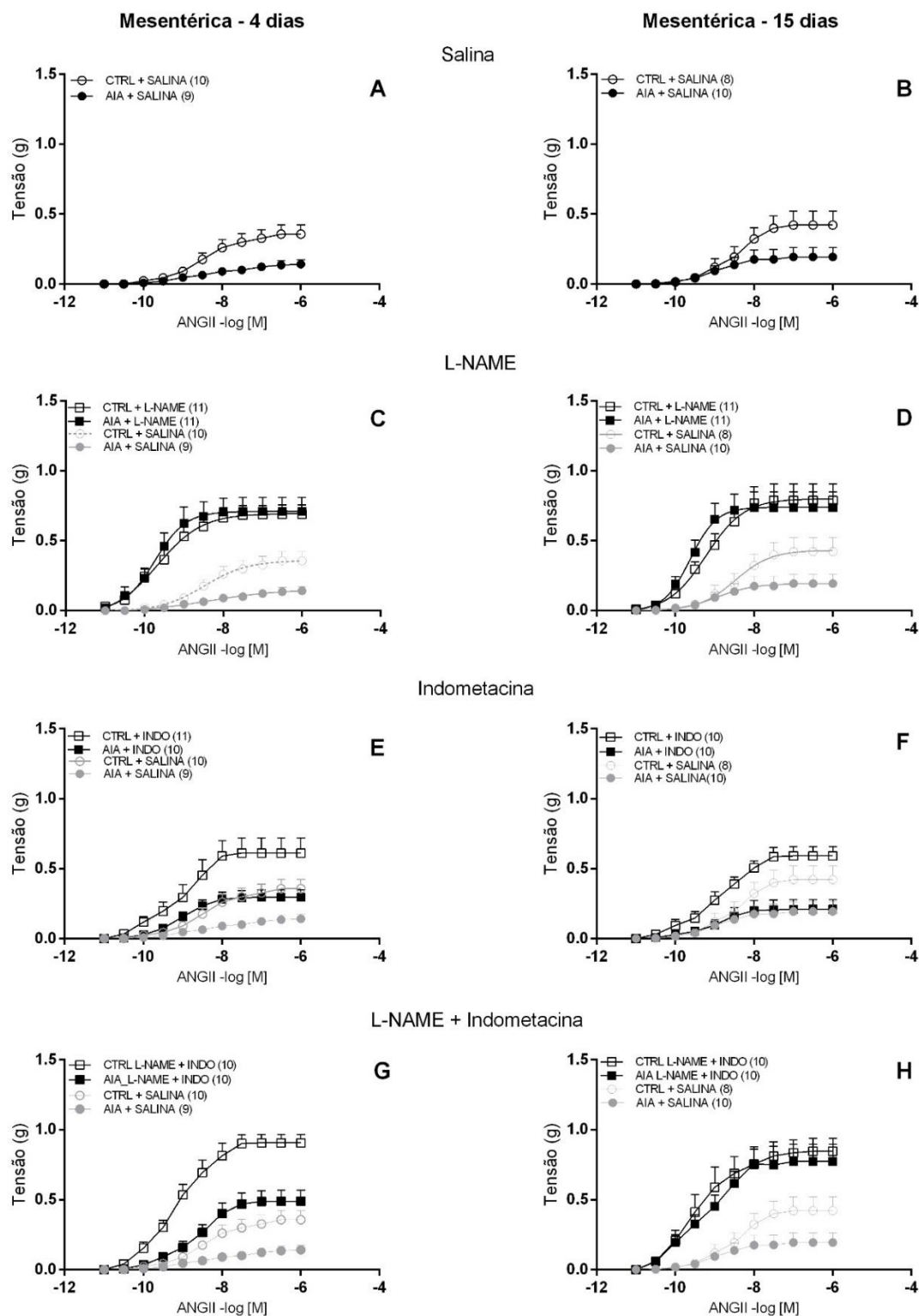
Diferenças significativas estão expressas quando entre grupos (na horizontal) e entre tratamentos (na vertical) pela correção Post-Hoc de Holm-Sidak para p-valor $\leq 0,05$. * Diferença significativa em relação ao grupo controle dentro do tratamento; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com salina dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com L-NAME dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com INDO dentro do mesmo grupo.

Por fim, é curioso observar que a redução de resposta à Ang II causada pela AIA, caracterizada por redução da Rmax, volta a ser observada em preparações obtidas no 4º dia pós indução/falsa indução, incubadas concomitante do L-NAME e indometacina (Figura 9G; Tabela 8). Contudo, isso não ocorre nos animais estudados no 15º pós indução/falsa indução (Figura 9H; Tabela 8).

4.3.4.2 Veia mesentérica

A presença do L-NAME elevou as respostas à Ang II em veias mesentéricas obtidas tanto dos animais CTRL quanto AIA, estudados no 4° e no 15° pós indução. Dessa forma, não mais se observou diferenças de resposta à Ang II entre os animais CTRL e AIA, tanto no 4° quanto no 15° dia após indução (Figuras 10C e 10D; Tabela 9). As respostas à Ang II também foram elevadas pela incubação com a indometacina, mas isso ocorreu de forma menos acentuada e a diferença de resposta entre animais CTRL e AIA permaneceu evidente nessa condição (Figuras 10E e 10F; Tabela 9). Por outro lado, a presença concomitante de L-NAME e indometacina também elevou as respostas à Ang II nas veias mesentéricas, quando essas foram estudadas no 4° dia pós indução (Figuras 10G e 10H). Curiosamente, embora também tenha ocorrido elevação de resposta à Ang II nos animais AIA, essa modificação foi de menor magnitude em relação à observada na presença exclusiva do L-NAME (Figura 10G) nesse momento de evolução do modelo. Por conta disso, nesse momento, os valores da Rmax para Ang II foram significativamente menores nos animais AIA em relação aos seus CTRL (Tabela 9). Por outro lado, a presença concomitante de L-NAME e indometacina elevou de forma semelhante as respostas à Ang II nas veias mesentéricas obtidas de animais CTRL e AIA, quando esses foram estudados no 15° dia pós-indução. Por essa razão, nenhuma diferença para Ang II foi observada entre animais CTRL e AIA nesse momento (Figura 10H; Tabela 9).

Figura 10 - Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações isoladas de veias mesentérica, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle ($\square$) e artrite ($\blacksquare$) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10-4 M e indometacina 10-5 M. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

Tabela 9 – Resposta máxima de preparações obtidas da veia mesentérica para as curvas de angiotensina II dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores

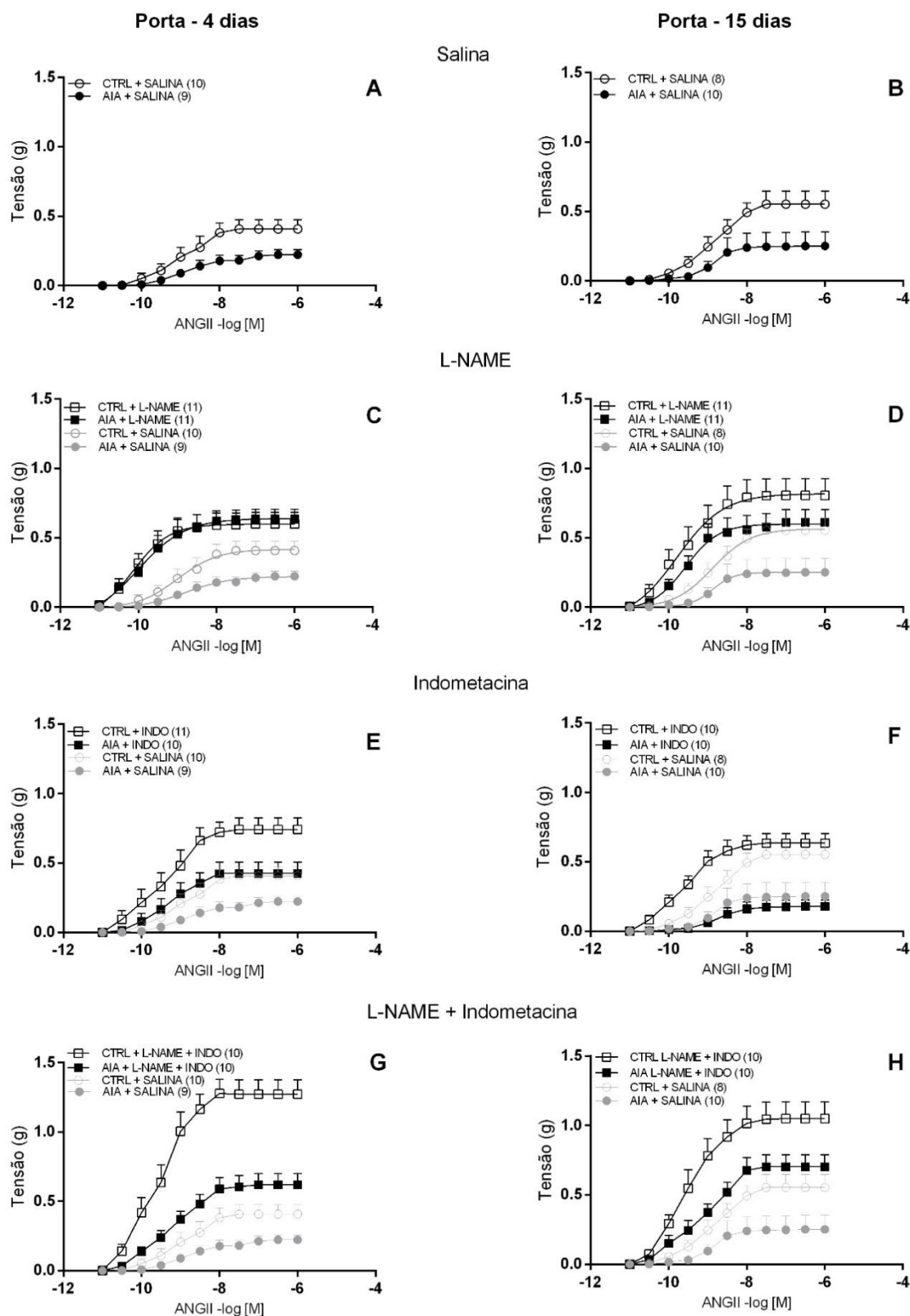
Tratamento	Rmax			
	CTRL		AIA	
4 DIAS				
Salina	0,35±0,21	(10)	0,14±0,09*	(09)
L-NAME	0,69±0,22 [‡]	(11)	0,71±0,33 [‡]	(11)
INDO	0,61±0,36	(11)	0,29±0,16* [‡]	(10)
L-NAME + INDO	0,90±0,19 [‡] ↓	(10)	0,48±0,25* [‡]	(10)
15 DIAS				
Salina	0,42±0,28	(08)	0,19±0,21	(10)
L-NAME	0,79±0,40	(11)	0,73±0,37 [‡]	(11)
INDO	0,59±0,21	(10)	0,21±0,21* [‡]	(10)
L-NAME + INDO	0,84±0,29 [‡]	(10)	0,77±0,39 [‡] ↓	(10)

Diferenças significativas estão expressas quando entre grupos (na horizontal) e entre tratamentos (na vertical) pela correção Post-Hoc de Holm-Sidak para $p\text{-valor} \leq 0,05$. * Diferença significativa em relação ao grupo CTRL dentro do tratamento; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com salina dentro do mesmo grupo; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com L-NAME dentro do mesmo grupo; ↓ Diferença significativa em relação ao tratamento com INDO dentro do mesmo grupo.

4.3.4.3 Veia porta

A presença do L-NAME também elevou as respostas da veia porta à Ang II tanto nos animais CTRL quanto AIA, no 4° e no 15° pós-indução (Figura 11). Essas modificações de resposta à Ang II traduziram-se em elevações significativas de Rmax, sobretudo nos animais AIA. Por conta disso, a redução de resposta à Ang II induzida pela AIA que havia sido observada nessa veia, sobretudo no 15° dia pós-indução/falsa indução, deixou de existir (Figuras 11C e 11D; Tabela 10). Na presença da indometacina também ocorreu elevação nas respostas da veia porta à Ang II no 4° e no 15° pós-indução, mas sobretudo naquelas obtidas dos animais CTRL. Assim, nessa condição, ficou evidenciada ainda mais a redução de resposta da veia porta à Ang II induzida pela AIA, uma vez que a Rmax dos animais AIA ficaram significativamente abaixo dos seus respectivos CTRL, tanto no 4° como no 15° dia após indução (Figuras 11E e 11F; Tabela 11). Essas modificações induzidas pela indometacina foram ainda maiores quando o bloqueio foi feito em concomitância com o L-NAME (Figuras 11G e 11H; Tabela 10).

Figura 11 - Curvas concentração-resposta para angiotensina II determinadas em preparações isoladas de veias porta, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle ($\square$) e artrite ($\blacksquare$) aos 4 e 15 dias pós-indução, na presença de salina e dos inibidores L-NAME 10⁻⁴ M e indometacina 10⁻⁵ M. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

Tabela 10 – Resposta máxima de preparações obtidas da veia porta para as curvas de angiotensina II dos tempos 4 e 15 dias na ausência e na presença dos inibidores

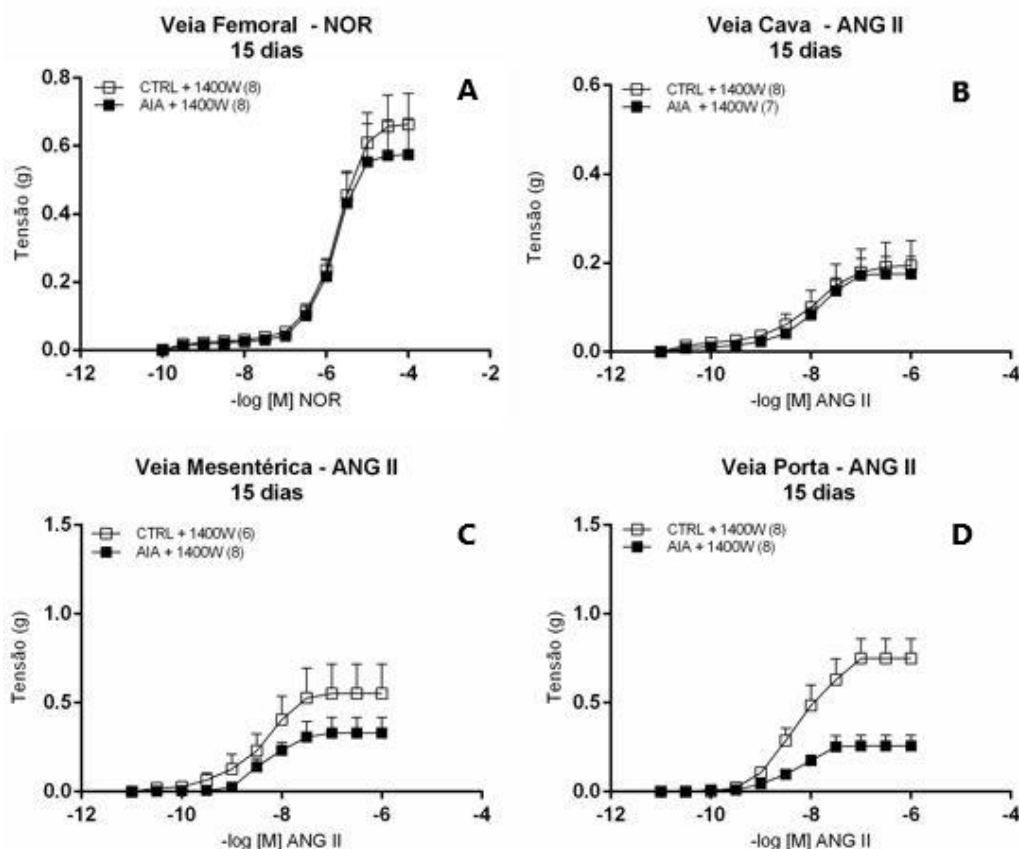
Tratamento	Rmax			
	CTRL		AIA	
4 DIAS				
Salina	0,40±0,21	(10)	0,22±0,11	(09)
L-NAME	0,59±0,28 [‡]	(11)	0,63±0,23 [‡]	(11)
INDO	0,74±0,28 [‡]	(11)	0,45±0,21 ^{*‡}	(10)
L-NAME + INDO	1,27±0,33 ^{‡‡‡}	(10)	0,61±0,26 ^{*‡‡}	(10)
15 DIAS				
Salina	0,55±0,27	(08)	0,25±0,32 [*]	(10)
L-NAME	0,81±0,40	(11)	0,61±0,30 [‡]	(11)
INDO	0,63±0,21	(10)	0,17±0,15 ^{*‡}	(10)
L-NAME + INDO	1.04±0,39 ^{‡‡}	(10)	0,70±0,27 ^{*‡‡}	(10)

Diferenças significativas estão expressas quando entre grupos (na horizontal) e entre tratamentos (na vertical) pela correção Post-Hoc de Holm-Sidak para $p\text{-valor} \leq 0,05$. * Diferença significativa em relação ao grupo CTRL dentro do tratamento; [‡] Diferença significativa em relação ao tratamento com salina dentro do mesmo grupo; ^{‡‡} Diferença significativa em relação ao tratamento com L-NAME dentro do mesmo grupo; ^{‡‡‡} Diferença significativa em relação ao tratamento com INDO dentro do mesmo grupo.

4.3.5 Participação da iNOS nas modificações das respostas induzidas pela AIA nas veias cava, mesentérica e porta à angiotensina II e na veia femoral à noradrenalina.

As veias que apresentaram modificações de respostas tanto para NOR (Tabela 2) quanto para ANG II (Tabela 3), aos 15 dias pós-indução/falsa-indução, foram desafiadas também na presença do 1400W. Nessa condição, a redução de resposta à NOR na veia femoral (Figura 12 A), assim como à Ang II nas veias cava (Figura 12 B) e mesentérica (Figura 12 C), todas induzidas pela AIA, deixaram de existir. Por outro lado, a presença do 1400W não suprimiu a redução de resposta à Ang II causada pela AIA na veia porta (Figura 12D; Tabela 11).

Figura 12 - Curvas concentração-resposta para angiotensina II e noradrenalina obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (□) e artrite (■) aos 15 dias pós-indução, na presença de 1400W. Pontos representam média $\pm$ E.P.M. Entre parênteses, o número de amostras



Fonte: Material elaborado pela própria autora

Tabela 11 – Resposta máxima e pEC₅₀ de preparações obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (CTRL) e artrite (AIA) aos 15 dias para curvas de angiotensina II e noradrenalina na presença de 1400W.

	Rmax		pEC ₅₀	
	CTRL	AIA	CTRL	AIA
Noradrenalina				
FEMORAL	0,66 $\pm$ 0,26 (8)	0,57 $\pm$ 0,29 (8)	5,73 $\pm$ 0,26 (8)	5,75 $\pm$ 0,27 (8)
Angiotensina II				
CAVA	0,19 $\pm$ 0,16 (8)	0,18 $\pm$ 0,10 (7)	-	-
MESENTÉRICA	0,55 $\pm$ 0,41 (6)	0,33 $\pm$ 0,24 (8)	-	-
PORTA	0,75 $\pm$ 0,32 (8)	0,26 $\pm$ 0,17* (8)	-	-

Nota: Dados expressos em média $\pm$ D.P. Entre parênteses, o número de amostras. * indica diferença significativa entre os grupos CTRL e AIA pelo teste t Student para amostras independentes para p-valor $\leq$ 0,05. a. indica p-valor ajustado para violação da homogeneidade das variâncias.

5 DISCUSSÃO

Apesar de estabelecida a associação de doenças inflamatórias sistêmicas com o aumento dos riscos aumentados para a saúde cardiovascular, os mecanismos envolvidos nessas alterações ainda são mal compreendidos. Essa carência de informações é ainda maior em relação ao leito venoso, uma vez que os estudos que objetivam estudar as repercussões vasculares da artrite têm se concentrado no leito arterial. Cabe ressaltar que o leito venoso, além de exercer o importante papel de escoar o sangue proveniente da periferia ao coração, é o principal compartimento de capacitância em mamíferos, pois armazena aproximadamente 60-80% do volume de sangue de um animal em repouso (ROTHER, 2006). Nesse sentido, qualquer modificação nas respostas das veias causada pela AR podem ter implicações no volume diastólico final e, conseqüentemente, no débito cardíaco. Nesse contexto, o presente estudo mostra que a AIA modifica as respostas contráteis de veias a vasoconstritores diretamente envolvidos na manutenção do tônus vascular. Dessa forma, reforça a ideia de que a investigação das manifestações cardiovasculares da AR não podem restringir-se ao leito arterial, mas devem considerar também o leito venoso.

O presente estudo avaliou as repercussões da AIA sobre as respostas contráteis de veias à NOR e à Ang II, mostrando que os mecanismos endoteliais relacionados sobretudo ao NO podem ser alterados nesse modelo experimental de artrite. A interpretação dos dados aqui apresentados, contudo, pode extrapolar o âmbito da vasomotricidade pois esses mesmos mecanismos endoteliais também conferem um fenótipo anti-inflamatório ao endotélio, podendo ter repercussões inclusive na coagulação sanguínea. Nesse sentido, já foi demonstrado que pacientes portadores de AR são mais susceptíveis ao desenvolvimento de trombose (LEE et al., 2016). Com efeito, os dados aqui apresentados também apontam para a necessidade de se abordar os mecanismos relacionados à coagulação sanguínea em estudos posteriores.

Antes de passarmos à análise dos dados aqui apresentados, foi necessário demonstrar que o modelo de artrite experimental empregado foi efetivo. Nesse sentido, a AIA promoveu redução significativa no ganho de massa corporal dos animais a partir do 15º dia pós indução. Essa redução de massa corporal observada nos animais AIA é resultado de uma sarcopenia semelhante à observada na caquexia reumatoide (AN et al., 2020), condição esta que pode estar diretamente relacionada com a intensidade da inflamação sinovial que esses animais apresentaram durante a progressão da artrite (ROCHA et al., 2009; GOMEZ-SANMIGUEL et al., 2016). Além da sarcopenia, a AIA pode também promover redução

da massa de tecido adiposo nesses animais, contribuindo assim para a redução da massa corporal (MARTÍN *et al.*, 2008). Em estudo anterior, nosso grupo observou redução significativa da massa magra e, por conseguinte, redução da massa úmida e do diâmetro das fibras do músculo sóleo, em ratos acometidos pela AIA. Nesse estudo, observamos também redução da massa gorda e alterações microvasculares na musculatura esquelética a partir do 15º dia pós-indução, que se acentuam na fase mais tardia do modelo (PITA *et al.*, 2020)

No presente estudo, o dado que melhor indica a efetividade do modelo AIA é o aumento no diâmetro e no volume das patas posteriores esquerda, contralaterais às que receberam a indução. Esses aumentos de diâmetro e volume das patas foram observados a partir do 15º dia pós-indução, mas intensificou-se por volta do 40º dia. Isso mostra que a inflamação se torna poliarticular a partir do 15º dia pós-indução, com sinais clínicos mais sistêmicos (TOTOSON *et al.*, 2016, 2015).

A existência de um processo inflamatório sistêmico nos animais AIA é corroborada pelo aumento da PCR, observado já no 4º dia pós-indução, que foi ainda maior no 15º. Curiosamente, esse aumento tende à reversão na fase mais tardia do modelo, no 40º dia pós-indução. Possivelmente, pelo fato de a PCR ser um marcador inespecífico de inflamação de fase aguda, essa reversão parcial observada no 40º dia pode indicar que o processo inflamatório esteja em fase de resolução. Isso ocorre apesar das malformações articulares ainda serem evidentes no 40º dia. Com efeito, nessa fase de remissão, o tecido cicatricial não volta à conformação inicial, mas o processo inflamatório articular já esteja em declínio. Nesse sentido, já foi descrito que a gravidade da AIA aumenta até o 33º dia pós-indução e, a partir daí, ocorre redução dos sinais clínicos de inflamação (TOTOSON *et al.*, 2016). Esse estudo também demonstrou que os níveis circulantes de algumas citocinas se elevam já no 4º dia pós-indução da AIA, como a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), enquanto outras mostram-se elevadas mais tardiamente, como IL-1 β e TNF- α que atingem níveis circulantes maiores entre o 11º e o 33º dia. Além disso, os níveis circulantes dessas citocinas tendem a diminuir com o passar do tempo, corroborando assim para a reversibilidade do processo inflamatório relacionado à AIA.

Cabe mencionar que alguns animais do grupo controle apresentaram discreta elevação da PCR no 4º após a falsa indução. Supomos que isso deva-se à agressão promovida pelo trauma da agulha somado à ação do óleo mineral nos tecidos subcutâneos da pata, onde foi feita injeção. Essa lesão parece ter sido transitória uma vez que nenhum animal controle apresentou elevação da PCR nos demais tempos pós-injeção do óleo mineral.

Uma vez confirmada a efetividade do modelo, passamos a investigar as respostas das veias cava, femoral, mesentéricas e porta à NOR e à Ang II, foco do presente estudo. Com base nos dados da PCR apresentados anteriormente, decidimos realizar uma etapa exploratória do estudo, desafiando preparações obtidas de animais AIA no 4º, 15º e 40º dias pós-indução e seus respectivos controles.

Entre as preparações estudadas, apenas a veia femoral apresentou uma redução significativa de respostas à NOR induzida pelas AIA, no 15º dia pós-indução. Essa modificação de resposta se deu apenas em termos de R_{max} , sugerindo que a artrite modifica a capacidade de resposta dessa preparação à NOR e não a sensibilidade à mesma. Pela escassez de informações acerca dos efeitos da artrite sobre as veias, foi necessário interpretar esses dados tomando como base nos dados obtidos em artérias. Assim sendo, nossos dados corroboram estudos anteriores realizados em aorta de ratos, nos quais a AIA promove redução das respostas da aorta à NOR, mas apenas por volta do 4º dia pós-indução (PRATTI *et al.*, 2012; TOTOSON *et al.*, 2016). Foi observado também que, no 29º dia pós-indução, as respostas da aorta à fenilefrina, um agonista seletivo de receptores α_1 -adrenérgicos, podem estar aumentadas em animais que apresentam grau brando de AIA ou reduzidas, quando a gravidade da doença é moderada ou intensa (ÜLKER *et al.*, 2000). Respostas maiores à fenilefrina também foram observadas em aortas sem endotélio obtidas de animais AIA, 26 dias após a indução, demonstrando que a musculatura lisa vascular pode tornar-se mais responsiva nesses animais (ÇINAR *et al.*, 1998). Em camundongos submetidos à CIA, foi demonstrado redução na contração da aorta torácica induzida por serotonina ou KCL, possivelmente em consequência de níveis aumentados da proteína metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) nesse vaso (REYNOLDS *et al.*, 2012).

Por outro lado, observamos que a AIA diminuiu significativamente as respostas das veias cava, mesentérica e porta à Ang II, porém apenas na fase mais precoce do modelo, ou seja, no 4º e no 15º dias pós-indução. Essa modificação de resposta foi caracterizada em termos de R_{max} , contudo, os dados obtidos não permitem descartar modificações na sensibilidade dessas preparações à Ang II uma vez que não foi possível o cálculo de pEC_{50} para esse agonista. Cabe mencionar, no entanto, que as modificações nos valores de área sob a curva (dados não mostrados) seguiram rigorosamente aquelas observadas em termos de R_{max} . Isso sugere que a AIA modificou essencialmente a capacidade de resposta dessas preparações à Ang II. Esses dados sugerem que a inflamação causada pela AIA pode reduzir as respostas contráteis destas veias à Ang II. Porém, essa redução de resposta à Ang II causada pela AIA deixa de ser observada por volta do 40º dia pós-indução, quando o

processo inflamatório aparentemente começa a regredir. Essa observação nos surpreendeu, pois, estudos anteriores mostraram aumento na expressão de receptores AT₁ e atividade da enzima conversora de angiotensina em aorta de ratos submetidos à AIA, por volta do 40º dia pós-indução (SAKUTA *et al.*, 2010). Isso reforça a necessidade de um olhar específico para o leito venoso quando se estuda as repercussões vasculares da artrite, assim como uma compreensão mais aprofundada da reversão do processo inflamatório que ocorre na fase mais tardia do modelo AIA.

O presente estudo mostra que as reduções de resposta das veias estudadas ocorreram no 4º e no 15º dias pós-indução, exatamente no período em que a PCR estava mais elevada. Isso sugere a participação do processo inflamatório sistêmico relacionado à AIA nesse fenômeno. Coincidentemente, a redução das respostas das aortas de rato à NOR causada pela AIA, observada por TOTOSON (2016), foi evidente no 4º, mas não no 11º dia pós indução. Possivelmente, citocinas inflamatórias provenientes das articulações acometidas pela AIA induziram iNOS nos tecidos vasculares e, com isso, elevaram substancialmente a produção local de NO (MAKI-PETAJA *et al.*, 2008; TOZZATO *et al.*, 2016). Assim, o excesso de NO produzido pode ter reduzido as respostas das veias estudadas. Corroborar em parte essa hipótese o fato do nosso grupo de pesquisa ter observado anteriormente uma elevação dos níveis séricos de nitrito/nitrato, que são metabólitos do NO, no 15º dia pós-indução (dados ainda não publicados). Aumentos das concentrações plasmáticas de nitrito/nitrato também foram anteriormente observados em animais submetidos tanto à AIA (ABE *et al.*, 2004) quanto à CIA (SAKAGUCHI *et al.*, 2004). Essa hipótese fica ainda mais reforçada pela observação de que níveis séricos de nitrito/nitrato estão elevados em ratos submetidos à AIA, sobretudo entre o 10º e o 15º dia após a indução (MARTÍN, *et al.*, 2008).

O fato de as alterações de resposta observadas serem transitórias, ou seja, ocorrerem apenas na fase mais precoce do modelo, pode dar a impressão de serem menos importantes. Isso porque existe sempre a tendência de evitar investimentos em processos fisiopatológicos autolimitados. Cabe destacar, contudo, que muitas alterações fisiopatológicas funcionais e estruturais que ocorrem no sistema cardiovascular são precedidas por alterações transitórias que podem ser detectadas funcionalmente. Além disso, como já foi dito, essas alterações de resposta vascular podem estar ocorrendo em paralelo a outras alterações do leito venoso, que podem inclusive significar maior risco potencial ao organismo. Nesse contexto, estudos que abordem a coagulação sanguínea nessa fase da evolução da AIA são necessários. Além disso, não se pode desconsiderar que a AR é uma doença crônica com recorrentes episódios de

exacerbação inflamatória articular. Com efeito, talvez aquilo que foi observado no presente estudo possa ocorrer de forma intermitente nos portadores de AR.

Para melhor compreender os mecanismos envolvidos nas reduções de resposta à NOR causadas pelas AIA, desafiamos as preparações também na presença do L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS. Esses experimentos foram feitos apenas com preparações obtidas no 4º e no 15º pós-indução pois foi nesses tempos que as referidas modificações de resposta foram evidenciadas. Os dados obtidos mostram que o tratamento com L-NAME aumenta as respostas à NOR nas veias obtidas tanto dos animais CTRL quanto AIA. Isso sugere a participação do NO produzido por NOS constitutivas na modulação da venoconstrição induzida pela NOR nessas veias. Ademais, esses aumentos de resposta causados pelo L-NAME são discretos nas veias femoral e cava, que drenam o sangue das patas desses animais, mas exuberantes nas veias mesentérica e porta, que drenam o sangue da região esplâncnica. Isso mostra que a participação do NO na modulação das respostas contráteis de veias à NOR é mais decisiva na circulação esplâncnica. Por fim, cabe mencionar que essa elevação de resposta à NOR, ocorrida na presença do L-NAME, suprimiu a diferença de Rmax observada entre as veias femorais de animais CTRL e AIA colhidas 15 dias após a indução. Esses dados concordam com estudo anterior no qual o L-NAME é capaz de reverter redução de resposta contrátil à fenilefrina decorrente da AIA na microcirculação de Joelho de ratos (BADAVI *et al.*, 2000). Com isso fica evidente o envolvimento do NO na redução de resposta da veia femoral à NOR, causada pela AIA. Observamos também que a diferença de resposta à NOR também é suprimida quando as veias femorais são desafiadas na presença de 1400W, um inibidor seletivo para iNOS. Essa informação fortalece a hipótese de que citocinas oriundas do processo inflamatório articular induzem a expressão de iNOS na veia femoral, resultando em aumento da síntese de NO e consequente redução das respostas à NOR.

Quando as preparações foram desafiadas pela Ang II na presença do L-NAME, observamos um importante aumento de resposta em todos os leitos estudados, tanto aos no 4º quanto no 15º dia pós-indução. Primeiramente, esse aumento de resposta decorrente do tratamento com L-NAME ocorreu nas veias obtidas de animais CTRL, o que sugere a participação do NO produzido por NOS constitutivas na modulação da venoconstrição induzida pela Ang II nessas veias. A participação de produtos da NOS na modulação das respostas de veia mesentérica à Ang II já havia sido demonstrada anteriormente (CHIES *et al.*, 2017). Todavia, aumentos semelhantes de resposta à Ang II foram observados em veias cava, mesentérica e porta, obtidas de animais AIA, quando desafiadas na presença do L-

NAME. Com isso, as diferenças de Rmax para Ang II que haviam sido observadas entre animais CTRL e AIA, tanto no 4° quanto no 15° pós-indução, deixaram de existir. Isso mostra que a AIA promove reduções das respostas dessas veias à Ang II por um mecanismo que envolve NO. Buscando identificar a isoforma da NOS envolvida nesse mecanismo fisiopatológico, desafiámos preparações obtidas no 15° dia pós-indução também na presença de 1400W. Nessa condição, as diferenças de resposta à Ang II entre animais CTRL e AIA foram suprimidas nas veias cava e mesentérica, mas não na veia porta. Fica evidente, com isso, que a AIA reduz as repostas das veias cava e mesentérica à Ang II através da indução de iNOS, elevando assim a produção local de NO. Provavelmente esse aumento de iNOS é consequência da liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas articulações acometidas. No caso da veia porta, esse mecanismo aparentemente não está envolvido.

O aumento na presença de iNOS já havia sido observado tanto em aorta quanto na microcirculação renal de camundongos submetidos à CIA (TOZZATO *et al.*, 2016), assim como nos vasos do antebraço de humanos portadores de AR (MÄKI-PETÄJÄ *et al.*, 2008). Também já foi demonstrado que a redução das respostas contráteis induzida pela fenilefrina em microcirculação do joelho, observada em ratos submetidos à AIA pode ser prevenida pelo tratamento com L-NAME (BADAVI *et al.*, 2000) Além disso, já foi demonstrado que carótidas de coelhos submetidos à superexpressão gênica de iNOS apresentam redução da resposta contrátil à fenilefrina, assim como redução da resposta relaxante à ACh causada pelo excesso de ânions superóxidos formado em decorrência do excessivo consumo de BH₄ (GUNNETT *et al.*, 2005).

Se por um lado os dados apresentados até aqui sugerem o envolvimento do NO nas reduções de resposta de veias aos agonistas estudados, por outro, mostram características intrigantes desse mecanismo. Uma vez que aparentemente ocorre aumento na atividade de iNOS tanto na veia cava quanto mesentérica, era de se esperar que as respostas contráteis desses dois vasos fossem reduzidas frente a qualquer agonista vasoconstritor. Isso porque a iNOS é uma enzima cuja atividade não depende da elevação de cálcio intracelular promovida pela ação de agonistas farmacológicos; essa enzima permanece em constante atividade quando expressa (MAYER E HEMMENS, 1997; ALDERTON *et al.*, 2001). Por fim, os dados obtidos na presença do 1400W mostram que o iNOS participa da redução das respostas à Ang II nas veias cava e mesentérica, mas não na veia porta. Isso sugere que também as diferentes isoformas de NOS são expressas distintamente nos leitos venosos desses animais AIA de forma território-específica.

Por outro lado, tem sido proposto que prostanoídes vasorelaxantes e prostanoídes vasoconstritores também participam da regulação do tônus vascular. Já foi demonstrado que o aumento da expressão/atividade de COX-2, induzida principalmente durante a resposta inflamatória, contribui para a disfunção endotelial em aorta de ratos submetidos à AIA (PRATI *et al*, 2012). Além disso, citocinas inflamatórias oriundas das articulações também podem promover aumento da síntese de prostanoídes nos vasos sanguíneos, através do aumento da expressão da COX-2 (PANG E KNOX, 1997). Nesse sentido, observou-se o envolvimento de prostanoídes na redução da contração induzida pela fenilefrina em aorta de ratos submetidos à AIA de grau intenso (ULKER *et al.*, 2000). Cabe mencionar também que o NO foi capaz de estimular a COX e, por consequência, estimular a liberação de prostanoídes tanto em macrófagos de camundongos (SALVEMINI *et al.*, 1995) quanto no sistema cardiovascular de ratos (SALVEMINI *et al.*, 1993). Por essa razão, decidimos desafiar essas preparações também na presença de indometacina, um inibidor não seletivo de COX.

Os dados obtidos em preparações desafiadas com NOR na presença de indometacina sugerem que a participação de prostanoídes na regulação dessas respostas é território-específica. Nas veias femoral e cava, o bloqueio das COXs reduziu as respostas à NOR. Na veia femoral, a redução de resposta ocorreu sobretudo nos animais controles, fazendo com que esses respondessem com a mesma magnitude em relação aos animais AIA, cuja resposta à NOR já se encontrava reduzida. Esses dados sugerem que prostanoídes vasoconstritores contribuem para a ação contrátil desses vasos frente à NOR. Essa ação sinérgica exercida por prostanoídes vasoconstritores frente às respostas contráteis induzidas pela NOR já foi descrita em aortas de ratos (RAPOPORT, 1993; LAMB *et al.*, 1994).

Por outro lado, o sinergismo entre prostanoídes e NO parece não ocorrer nas veias esplâncnicas. Nesses vasos, o tratamento com de indometacina chegou a aumentar as respostas contráteis à NOR, sobretudo na veia porta. Cabe destacar que esse aumento de resposta ocorreu apenas nos animais CTRL, evidenciando assim uma inédita diferença de R_{max} para NOR entre animais CTRL e AIA. Esses dados sugerem que prostanoídes vasodilatadores modulam as respostas à NOR nas veias mesentéricas e, sobretudo, nas veias porta. Nos animais AIA, esse efeito modulador das respostas à NOR oculta a disfunção contrátil causada pela AIA nesses vasos em consequência de uma possível maior participação da iNOS, na veia mesentérica, e de NOS constitutivas, na veia porta. Isso fica evidente pois a co-incubação com indometacina e L-NAME eleva essas respostas também

nas preparações obtidas de animais AIA, permitindo com que essas apresentem valores de R_{max} semelhantes aos observados nas preparações de animais CTRL em idêntica condição.

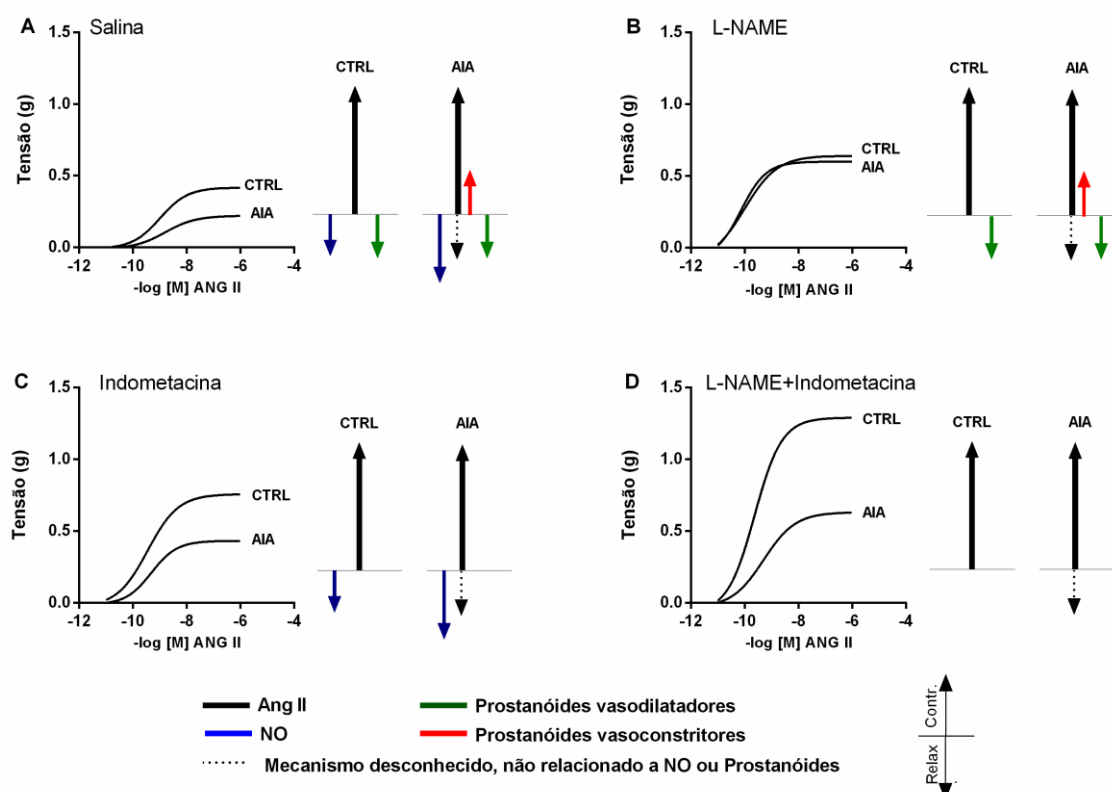
A interação entre NO e prostanoídes é ainda mais intrigante na modulação das respostas dessas veias à Ang II. No presente estudo, o bloqueio da síntese de prostanoídes pela indometacina elevou as respostas à Ang II em todos os vasos estudados, com exceção da cava estudada no 15º dia pós-indução. Por conta dessa elevação, não mais foi observada a diferença de resposta à Ang II entre animais CTRL e AIA, observada em veias cavas estudadas no 4º dia pós-indução. Supomos, todavia, que o fenômeno persista nessa preparação; possivelmente o desaparecimento dessa significância tenha sido ocasional. Nas veias mesentéricas e porta, essas elevações de resposta foram ainda maiores tanto no 4º quanto no 15º dia pós-indução. Cabe destacar, contudo, que o tratamento com indometacina elevou as respostas à Ang II tanto nos animais CTRL quanto AIA, porém, as diferenças de R_{max} entre esses grupos foram preservadas. Esses dados indicam a participação de prostanoídes vasodilatadores na modulação das respostas desses vasos à Ang II em todos os vasos estudados, tanto nos animais CTRL quanto AIA. Contudo, fica evidente também que os prostanoídes não participam decisivamente das reduções de resposta desses vasos à Ang II causadas pela AIA.

Talvez o aspecto mais curioso dessa interação entre NO e prostanoídes ocorra na fase mais precoce do modelo. Como mencionado anteriormente, as reduções das respostas contráteis desses vasos à Ang II parecem estar relacionadas ao aumento da síntese do NO. Nesse sentido, era plausível supor que as respostas das preparações estudadas à Ang II fossem maximizadas pelo tratamento simultâneo com L-NAME e indometacina, assim como ocorreu com o L-NAME isoladamente. Contudo, na presença desses dois inibidores, as respostas à Ang II obtidas nas preparações nos animais AIA voltaram a ser menores em relação às observados nas preparações dos animais CTRL. Com isso, a diferença de resposta à Ang II entre animais CTRL e AIA, que havia sido suprimida pelo tratamento como L-NAME, voltou a ser observada quando a indometacina foi acrescida no tratamento. Cabe destacar que esse fenômeno, claramente observado no 4º dia pós-indução, tende a desaparecer à medida que o tempo passa, sendo ainda perceptível apenas na veia porta após 15 dias da indução.

Possivelmente, nessa fase mais inicial do modelo, a AIA mobilize algum mecanismo relaxante ainda desconhecido, não relacionado a NO e prostanoídes, que leva à

redução das respostas dessas preparações à Ang II. A ação desse suposto mecanismo relaxante frente à ação da Ang II, todavia, pode ser compensada pela produção de prostanoídes vasoconstritores (Figura 13-A). Dessa forma, na ausência de NO, as respostas obtidas nos animais AIA se igualam às obtidas nos CTRL, pois a menor capacidade de resposta à Ang II é compensada pela produção de prostanoídes vasoconstritores (Figura 13-B). Por outro lado, quando a síntese de prostanoídes (vasodilatadores e vasoconstritores) é inibida pela indometacina, as respostas à Ang II nos animais AIA permanecem menores em relação a dos controles pois, além do acima sugerido mecanismo relaxante, existe a maior produção local de NO (Figura 13-C). Por fim, quando bloqueamos paralelamente a síntese de NO e prostanoídes, esse suposto mecanismo relaxante atua isoladamente, determinando uma menor capacidade de resposta à Ang II nas preparações obtidas dos animais AIA (Figura 13-D). Cabe ressaltar que esse fenômeno não foi observado frente à NOR. Isso sugere que esse suposto mecanismo é mobilizado exclusivamente frente à ação da Ang II.

Figura 13 – Interação de forças que determinam a atividade contrátil do vaso em resposta à angiotensina II



Nota: A - Curva representativa dos mecanismos envolvidos na ausência de inibidores em animais submetidos ou não à artrite. B - Curva representativa dos mecanismos envolvidos na presença de L-NAME. C - Curva representativa dos mecanismos envolvidos na presença de indometacina. D - Curva representativa dos mecanismos envolvidos na presença de L-NAME e indometacina. Seta preta: força contrátil exercida pela angiotensina II. Seta azul: força relaxante exercida pelo óxido nítrico. Seta vermelha: força contrátil exercida por prostanoídes vasoconstritores. Seta verde: força relaxante exercida por prostanoídes vasodilatadores. Seta pontilhada: força exercida pelo mecanismo desconhecido não relacionado à óxido nítrico ou prostanoídes.

Por fim, é importante salientar que as alterações vasculares relacionadas à artrite normalmente decorrem da disfunção endotelial causada pelo aumento do estresse oxidativo. Ao menos em parte, isso pode ser consequência de uma indução maciça da iNOS causada pela ação de citocinas inflamatórias. Quando em atividade, essa grande quantidade de enzimas promove depleção de BH₄, levando a eNOS a atuar de forma desacoplada, produzindo assim o O₂⁻ ao invés do NO. O O₂⁻ produzido em excesso no endotélio vascular pelas iNOS superexpressas, reage com o NO, reduzindo assim sua biodisponibilidade. Além disso, o O₂⁻ em excesso degrada BH₄ constituindo assim um círculo vicioso e agravando a disfunção endotelial (GUNNETT *et al.*, 2005; SAKUTA *et al.*, 2010; MCNEILL e CHANNON, 2012). Era de se esperar, todavia, que uma disfunção endotelial levasse ao aumento das respostas contráteis dessas veias aos agonistas estudados. Isso porque o endotélio vascular, por meio da liberação de NO e outros fatores relaxantes localmente produzidos, modula as respostas contráteis dos vasos sanguíneos. Neste contexto, o fato de ter havido redução das respostas a esses vasoconstritores, ao invés de aumento, sugere que o excesso de NO produzido localmente impacta mais em tais respostas do que do estresse oxidativo que eventualmente esteja ocorrendo nesses vasos. Contudo, não podemos descartar a influência do estresse oxidativo, ainda que em menor grau, sobre as respostas obtidas nessas preparações. Assim, entendemos que uma importante limitação do presente estudo foi não ter estudado outras vias de liberação de NO bem como as respostas relaxantes induzidas nessas veias pela ACh. Cabe esclarecer, todavia, que o estudo das respostas vasodilatadoras em veias é particularmente difícil, pois esse tipo de preparação não exhibe platôs estáveis quando se faz a pré-contração necessária para o estudo dessas respostas.

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXOS

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



Famema

**SECRETARIA DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO,
CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

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

Marília, 02 de Junho de 2017

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

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

I - Título do Projeto:

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

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

- 092/17

III - Nome do Pesquisador ou Professor Responsável pelo protocolo:

- Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies

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

- Pesquisa Científica

V - Vigência da Autorização:

- 02/06/17 à 03/2021

VI - Espécie/linhagem/raça:

- Ratos Wistar

VII - Número de Animais Autorizados:

- 320

VIII - Peso/idade:

- Aproximadamente 350g/12 semanas

IX - Sexo:

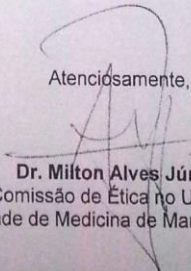
- Masculino

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

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

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

Atenciosamente,


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

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