

FACULDADE DE MEDICINA DE MARÍLIA

GABRIELA PALMA ZOCHIO

**ESTUDO DA REATIVIDADE VASCULAR EM AORTAS DE  
CAMUNDONGOS ACOMETIDOS POR ARTRITE INDUZIDA POR  
COLÁGENO**

Marília

2014

Gabriela Palma Zochio

Estudo da reatividade vascular em aortas de camundongos acometidos por artrite  
induzida por colágeno

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Marília, Mestrado Acadêmico  
em “Saúde e Envelhecimento”, para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies  
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Renato de  
Assis

Marília

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa,  
desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina de Marília

Zochio, Gabriela Palma

Estudo da reatividade vascular em aortas de camundongos  
acometidos por artrite induzida por colágeno. / Gabriela Palma  
Zochio - - Marília, 2014.

88 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde e Envelhecimento)  
- Faculdade de Medicina de Marília.

1. Artrite reumatoide. 2. Artrite experimental. 3. Endotélio. 4.  
Estresse oxidativo

Gabriela Palma Zochio

Estudo da reatividade vascular em aortas de camundongos acometidos por artrite induzida por colágeno

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Acadêmico em “Saúde e Envelhecimento”, da Faculdade de Medicina de Marília, para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Saúde e Envelhecimento.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies  
Faculdade de Medicina de Marília

---

Prof. Dr. Zamir Calamita  
Faculdade de Medicina de Marília

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia de Souza Rossignoli  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Data da aprovação: 29/01/2014

**DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, **Márcia e Gilberto**, que sempre confiaram em mim e não mediram esforços para a realização dos meus sonhos. Obrigada pelo esforço, incentivo, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas. A eles, além da dedicatória desta conquista dedico a minha vida.

À minha irmã **Cristine**, que também enfrentou comigo os desafios impostos por este início de vida acadêmica. Juntas, partilhamos anseios, medos, alegrias, realizações, experiências e conhecimentos.

Ao meu noivo **Thiago**, pelo apoio, incentivo, paciência, carinho e amor depositados em todos os momentos desta importante etapa. Obrigada por acreditar em mim e por fazer em minha vida uma grande e maravilhosa diferença.

Não poderia deixar de dedicar também este trabalho a uma pessoa muito especial em minha vida, a **Silmara**, que também sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me ajudando.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao Orientador, **Prof. Dr. Agnaldo**

Pelo incentivo, apoio, credibilidade e criteriosa orientação demonstrados ao longo destes dois anos de convivência e que foram determinantes na minha formação científica. Por exigir de mim muito mais do que supunha ser capaz de fazer. Quaisquer agradecimentos seriam insuficientes para expressar todo o meu respeito e toda minha gratidão.

Ao Coorientador, **Prof. Dr. Marcos Renato**

Pela dedicação, interesse, visão e brilhantismo depositados. Obrigada por acreditar em nossa proposta, seus questionamentos e reflexões foram fundamentais para a realização deste trabalho.

# **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, pela oportunidade de vivenciar esta experiência.

Ao Alisson, funcionário do Laboratório de Farmacologia da FAMEMA, pelo auxílio na execução dos experimentos, bem como na manutenção dos animais.

Às funcionárias do Núcleo de Atenção e Saúde em Cadeiras Básicas da FAMEMA, Célia, D. Cida e Nalva, pelo auxílio em minhas tarefas diárias.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Angélica Spadella, pela orientação e por ter me dado permissão para a utilização do Laboratório de Embriologia Humana da FAMEMA, e à técnica Kamilla, pelo auxílio no processamento das amostras.

Ao Dr. Pedro Marabini Filho, pelo auxílio no estudo histopatológico das articulações.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elane de Fátima Taipeiro, pela orientação e por ter me dado permissão para a utilização do Laboratório de Bioquímica da FAMEMA.

À bibliotecária da FAMEMA, Cláudia, pelo auxílio e prontidão no serviço de comutação, referências bibliográficas, normas de Vancouver e ficha catalográfica.

Aos professores do Mestrado Acadêmico em Saúde e Envelhecimento da FAMEMA, pelas disciplinas ministradas, que tanto contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho, bem como para a minha formação nesta instituição.

À minha amiga de laboratório Rafaela, pelas experiências e conhecimentos transmitidos, paciência, momentos de descontração e acima de tudo, pela amizade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da FAMEMA, pela disponibilidade, prontidão e compreensão para resolução de questões burocráticas.

Ao Dr. Fernando Queiroz Cunha, do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelas matrizes de camundongos da linhagem DBA-1J, e ao seus orientandos Jhimmy e Raphael pelo auxílio na padronização da técnica de indução de artrite por colágeno.

**RESUMO**

## RESUMO

Estudos têm demonstrado que a expectativa de vida média de pacientes com artrite reumatoide (AR) é menor do que em pessoas saudáveis, em virtude de um aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares. Isto se deve, possivelmente, à disfunção endotelial resultante da intensa atividade inflamatória relacionada à AR. O aprofundamento do estudo desta disfunção endotelial, contudo, depende do desenvolvimento de modelos experimentais capazes de reproduzir de forma fidedigna os mecanismos fisiopatológicos que levam à AR. Alguns estudos tem demonstrado disfunção endotelial em modelo de artrite induzida por adjuvante (AIA). Contudo, o mesmo não foi verificado na artrite induzida por colágeno (CIA) em camundongos, 3-6 dias após a instalação do processo inflamatório poliarticular. Assim, o objetivo do presente estudo foi estudar a reatividade vascular da aorta torácica de camundongo DBA-1J 15 dias após o surgimento dos primeiros sinais inflamatórios poliarticulares do modelo CIA. Para isto, foi proposto o estudo funcional das respostas de aortas torácicas à serotonina, noradrenalina, solução despolarizante (KCl), acetilcolina ou nitroprussiato de sódio em camundongos machos da linhagem DBA-1J, controles ou acometidos pela CIA. Estas respostas também foram estudadas na presença tanto de inibidores das óxido nítrico sintases (NOS) quanto da tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) e da curcumina. Os dados obtidos sugerem que a CIA, neste período, não modifica as respostas contráteis das aortas torácicas de camundongo à serotonina, KCl e à noradrenalina, tampouco o relaxamento destas preparações induzido por acetilcolina ou nitroprussiato de sódio.

Palavras-chave: Artrite reumatoide. Artrite experimental. Endotélio. Estresse oxidativo.

**ABSTRACT**

## ABSTRACT

Studies have demonstrated that the average life expectancy of patients with rheumatoid arthritis (RA) is lower than in healthy people, due to increased mortality from cardiovascular disease. This is possibly due to endothelial dysfunction resulting from severe inflammatory activity related to RA. A deeper understanding about the study of endothelial dysfunction, depends on the development of experimental models able to reproduce reliably the pathophysiological mechanisms that leads to AR. Indeed, some studies have demonstrated endothelial dysfunction in the adjuvant-induced arthritis model (AIA). However, the same was not observed in collagen-induced (CIA) in mice, 3-6 days after onset of poliarticular inflammatory process. Thus, the aim of the present study was to investigate the vascular reactivity of thoracic aorta taken from DBA-1J mice 15 days after the appearance of the first signals of poliarticular inflammation in CIA model. Then, it was proposed a functional study of the responses of thoracic aortas taken from male DBA-1J mice control or CIA induced to serotonin, KCl and norepinephrine as well as to acetylcholine or sodium nitroprusside. These responses were also studied both in the presence of inhibitors of nitric oxide synthases (NOS), tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) and curcumin. The data suggest that CIA, in this phase, does not modify the contractile responses of mice thoracic aortas to serotonin, KCl or noradrenaline nor the relaxation induced by acetylcholine or sodium nitroprusside.

Keywords: Rheumatoid arthritis. Experimental arthritis. Endothelium. Oxidative stress.

**LISTAS**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b> - Escala de graduação do escore inflamatório (em cruces).....	36
<b>Figura 1</b> - Imagem esquemática.....	37
<b>Figura 2</b> - Peso corporal em gramas (g) dos animais do grupo controle e artrite, obtidos nos dias da imunização/falsa-imunização (dia 0), do boost/falso-boost (21º dia) e dos experimentos de reatividade vascular (45º dia).....	45
<b>Figura 3</b> - Imagens das patas anteriores dos animais do grupo controle (3A) e artrite (3C) e posteriores dos animais dos grupos controle (3B) e artrite (3D).....	47
<b>Figura 4</b> - Prancha Histológica: grupo controle.....	49
<b>Figura 5</b> - Prancha Histológica: grupo artrite.....	50
<b>Figura 6</b> - Curvas concentração-resposta para serotonina obtidas em preparações intactas (A) e para KCl em preparações deendotelizadas (B) de aorta torácica de animais dos grupos controle (○) e artrite (●).....	51
<b>Figura 7</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina (A) e acetilcolina (B) obtidas em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle (○) e artrite (●).....	52
<b>Figura 8</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina (A) e nitroprussiato de sódio (B) determinadas em preparações isoladas de aorta torácica deendotelizadas, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (○) e artrite (●).....	53
<b>Figura 9</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina e acetilcolina obtidas em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle (○) e artrite (●) na presença do 1400W $10^{-6}$ M (A e C) ou L-NAME $10^{-4}$ M (B e D).....	55
<b>Figura 10</b> - Curvas concentração-resposta para noradrenalina obtidas em preparações isoladas de aorta torácica de animais pertencentes aos grupos controle (○) e artrite (●), previamente incubadas com $\text{BH}_4$ $10^{-6}$ M.....	57

**Figura 11** - Curvas concentração-resposta para noradrenalina (A) e acetilcolina (B) obtidas em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle (○) e artrite (●), previamente incubadas com curcumina  $10^{-9}$ M.....58

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Peso médio das patas obtidas dos animais dos grupos controle e artrite, normalizados pelo peso corporal total dos animais estudados (peso da pata em mg/peso total do animal em g).....46
- Tabela 2** - Valor médio das medidas da túnica íntima e túnica média da aorta torácica dos animais dos grupos controle e artrite. Valores expressos em  $\mu\text{m}$ .....48
- Tabela 3** - Valores de  $\text{pEC}_{50}$  para serotonina e KCl determinados em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle e artrite.....52
- Tabela 4** - Valores  $\text{pEC}_{50}$  para noradrenalina e acetilcolina determinados em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle e artrite.....53
- Tabela 5** – Valores  $\text{pEC}_{50}$  para noradrenalina e nitroprussiato de sódio determinados em preparações isoladas de aorta torácica de endotelizadas de animais dos grupos controle e artrite.....54
- Tabela 6** - Valores  $\text{pEC}_{50}$  para noradrenalina e acetilcolina determinados em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle e artrite, pré-tratadas com  $1400\text{W } 10^{-6}\text{M}$  ou  $\text{L-NAME } 10^{-4}\text{M}$ .....56
- Tabela 7** - Valores  $\text{pEC}_{50}$  para noradrenalina e acetilcolina determinados em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle e artrite, pré-tratadas com curcumina  $10^{-9}\text{M}$ .....58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA	Artrite induzida por adjuvante ( <i>adjuvant-induced arthritis</i> )
AR	Artrite reumatoide
BH <sub>2</sub>	dihidrobiopterina
BH <sub>4</sub>	tetrahidrobiopterina
CFA	Adjuvante completo de Freund ( <i>complete Freund's adjuvant</i> )
CIA	Artrite induzida por colágeno ( <i>Collagen-induced arthritis</i> )
CII	Colágeno bovino tipo II
COX	Ciclo-oxigenase
DBA-1J	Linhagem de camundongo susceptível à artrite induzida por colágeno
EC <sub>50</sub>	50% do efeito máximo promovido pelo agonista
E <sub>max</sub>	Efeito desencadeado pela concentração supra-máxima do agonista
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAMEMA	Faculdade de Medicina de Marília
FRAP	<i>Ferric reducing activity of plasma</i>
IAM	Infarto agudo do miocárdio
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IFA	Adjuvante incompleto de Freund ( <i>Incomplete Freund's adjuvant</i> )
IL-1	Interleucina 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-1ra	Antagonista do receptor da Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-7 $\alpha$	Interleucina 7 alfa
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-23	Interleucina 23
INF-c	Interferon c
INF- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases

$O_2^-$	Ânion superóxido
$ONOO^-$	Peroxinitrito
$PEG_2$	Prostaglandina E2
$pEC_{50}$	Valor negativo do logaritmo da concentração molar do agonista responsável por 50% do efeito máximo
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

# SUMÁRIO

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Artrite reumatoide.....</b>	<b>23</b>
<b>1.2 Artrite e danos cardiovasculares.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 Busca por modelos experimentais que reproduzam de forma fidedigna os danos cardiovasculares relacionados à AR.....</b>	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>31</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Animais.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Grupos experimentais.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Protocolo de indução da artrite.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Pesagens.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 Ectoscopia.....</b>	<b>34</b>
<b>3.6 Protocolo de coleta do plasma.....</b>	<b>35</b>
<b>3.7 Preparações histológicas.....</b>	<b>35</b>
3.7.1 Histopatologia das articulações.....	36
3.7.2 Histomorfometria da aorta torácica.....	36
<b>3.8 FRAP – Ferric Reducing Activity of Plasma.....</b>	<b>37</b>
<b>3.9 Estudo funcional de reatividade vascular .....</b>	<b>38</b>
<b>3.10 Curvas concentração-resposta .....</b>	<b>39</b>
<b>3.11 Análise de parâmetros farmacológicos .....</b>	<b>39</b>
<b>3.12 Análise estatística .....</b>	<b>40</b>
<b>3.13 Diagrama Experimental .....</b>	<b>40</b>
<b>3.14 Drogas e Reagentes .....</b>	<b>41</b>
3.14.1 Indução da artrite.....	41
3.14.2 Reatividade vascular.....	41
3.14.3 Preparações histológicas.....	42
3.14.4 FRAP.....	42
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Validação do modelo experimental CIA .....</b>	<b>45</b>

4.1.1	Pesagem dos animais .....	45
4.1.2	Pesagem das patas .....	46
4.1.3	Ectoscopia .....	47
4.1.4	Histopatologia das articulações .....	48
<b>4.2</b>	<b>Repercussões vasculares da CIA .....</b>	<b>48</b>
4.2.1	Histomorfometria da aorta torácica.....	48
4.2.2	Estudo de reatividade vascular à serotonina e ao KCl.....	51
4.2.3	Estudo de reatividade vascular à noradrenalina e à acetilcolina.....	52
4.2.4	Estudo da reatividade vascular em preparações de endotelizadas.....	53
4.2.5	Estudo da reatividade vascular à noradrenalina e à acetilcolina na presença de inibidores de NOS .....	54
4.2.6	Estudo da reatividade vascular à noradrenalina e à acetilcolina na presença de BH4.....	56
4.2.7	Estudo da reatividade vascular à noradrenalina e à acetilcolina na presença de curcumina.....	57
<b>4.3</b>	<b>Avaliação da capacidade antioxidante do plasma.....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>
	<b>APÊNDICE A - Fixador de Karnovsky (modificado).....</b>	<b>79</b>
	<b>APÊNDICE B – Solução descalcificante.....</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICE C – Inclusão em resina.....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE D – Hematoxilina-eosina (resina) .....</b>	<b>82</b>
	<b>APÊNDICE E – Azul de toluidina.....</b>	<b>84</b>
	<b>APÊNDICE F - Masson.....</b>	<b>86</b>
	<b>APÊNDICE G – Solução nutritiva de Krebs-Henseleit (modificado).....</b>	<b>88</b>

# **INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

# 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

## 1.1 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença reumática relativamente frequente. Trata-se de uma condição que acomete até 1% da população mundial adulta.<sup>1-4</sup> Sua ocorrência é observada em todos os grupos étnicos, dispersos entre as diferentes regiões do mundo, com predomínio no sexo feminino, sobretudo na faixa etária de 30-50 anos, embora haja registro em todas as idades.<sup>1-3,5,6</sup> No Brasil, uma análise retrospectiva dos pacientes com AR em acompanhamento ambulatorial no Estado de São Paulo, entre 2002 e 2005, delineou o seguinte perfil epidemiológico: mulher (86%), faixa etária 40-59 anos (55%), caucasóide (71%), história de início de doença há menos de dez anos (71%). Esta visão, mesmo que parcial, se assemelha às características relatadas em populações de outros países.<sup>7</sup>

Trata-se de uma doença autoimune, crônica, multissistêmica e de etiologia desconhecida, cujas principais alterações ocorrem ao nível das estruturas articulares, periarticulares e tendinosas. Caracteriza-se por um intenso processo inflamatório na sinóvia, deposição de fibrina, hiperplasia de células sinoviais, infiltrados mononucleares, formação de tecido celular invasivo (*pannus*), e, eventual anquilose em uma ou mais articulações periféricas, onde mãos e pés são preferencialmente acometidos. Vale ressaltar que a gravidade e o tempo de doença estão diretamente relacionados com as alterações ocasionadas pela inflamação e hipertrofia do tecido sinovial, onde a desorganização biomecânica das estruturas articulares provoca além da dor local, instabilidade articular, deformidades e perda de função.<sup>1,5,8-10</sup>

Embora sua etiologia ainda permaneça obscura, muitos avanços têm ocorrido no estudo de sua patogênese. Admite-se que o desenvolvimento da doença se deva à interação de diversos fatores como: patrimônio genético do hospedeiro (HLA-DR4 e HLA-DR1), fatores comportamentais, agentes ambientais, desequilíbrio imunológico e alterações endócrinas.<sup>1,2,5</sup> Neste sentido, a evolução da AR ocorre a partir da manutenção da reação autoimune, com ativação das células T *helper* CD4+ e outros linfócitos, desregulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e transformação da sinóvia em *pannus*, levando à destruição da articulação.<sup>1,2,5,9</sup>

## 1.2 Artrite e danos cardiovasculares

As manifestações da AR vão além da dor e invalidez resultantes do comprometimento articular, visto que a sobrevida de um paciente com AR é menor quando comparada com a sobrevida da população geral.<sup>4,11-14</sup> Isso ocorre porque estes indivíduos estão predispostos a infecções, complicações sistêmicas da doença e complicações secundárias ao tratamento.<sup>5</sup> As principais manifestações extra-articulares incluem quadros cutâneos (nódulos reumatoides), oculares (episclerite, esclerite e ceratoconjuntivite *sicca*), pleuropulmonares, cardíacos (pericardite e miocardite), hematológicos (anemia hipocrômica e microcítica, eosinofilia e síndrome de Felty), neurológicos (neuropatia periférica e mononeurite múltipla), osteometabólicos, e manifestações como vasculites, linfadenopatias e amiloidoses.<sup>1-3,5</sup>

É também bastante clara a associação entre a AR e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Segundo Gabriel<sup>11</sup>, pacientes artríticos apresentam um aumento significativo no risco de morte geral, atribuídos principalmente a eventos cardiovasculares. Dentre estes eventos, destacam-se infarto agudo do miocárdio (IAM) e insuficiência cardíaca congestiva (ICC).<sup>12</sup> Ademais, estudos mais recentes confirmaram a maior frequência de aterosclerose em pacientes artríticos. Submetidos à ultrassonografia de carótidas, estes indivíduos apresentaram aumento da espessura da camada íntima-medial da carótida comum, um indicador de aterosclerose generalizada.<sup>15-19</sup>

Possivelmente, a liberação sistêmica de inúmeras citocinas pró-inflamatórias decorrente da inflamação crônica inerente à AR comprometa a função endotelial.<sup>20,21</sup> Com efeito, este mecanismo fisiopatológico somado à fatores de risco clássicos é frequentemente proposto para justificar a grande correlação entre a AR e o aumento da morbimortalidade cardiovascular, observada na maioria dos estudos epidemiológicos.<sup>11-13</sup> Com base nestas premissas, Bergholm *et al.*<sup>22</sup> observaram que o controle e/ou supressão precoce da inflamação sistêmica na AR, não apenas diminui a atividade da doença, como também pode melhorar ou prevenir a perda da função endotelial.

O mecanismo que leva a esta disfunção endotelial ainda é pouco entendido, contudo parece envolver um excedente local de radicais livres. Em aortas provenientes de ratos portadores de artrite induzida experimentalmente, foi

observada uma redução significativa da função endotelial, associada a um aumento do estresse oxidativo decorrente do aumento da expressão NAD(P)H oxidase e do desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS).<sup>23,24</sup> Neste sentido, foi sugerido que a atenuação do aumento do fluxo induzido pela acetilcolina em antebraço de pacientes com AR, indicativo de disfunção endotelial, está associada a um aumento da atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ao aumento dos níveis circulantes de mieloperoxidase.<sup>20</sup> Segundo estes autores, este aumento da iNOS consumiria o cofator tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), levando ao desacoplamento da eNOS. Funcionando de forma desacoplada, a eNOS produziria ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) ao invés de óxido nítrico (NO). Este O<sub>2</sub><sup>-</sup> altamente concentrado, produzido tanto pela eNOS atuando de forma desacoplada quanto pela mieloperoxidase, poderia então ligar-se ao NO que ainda é produzido localmente e formar o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Dessa forma, há uma redução nas concentrações endoteliais de NO (vasodilatador, inibidor da agregação plaquetária e da adesão leucocitária) em paralelo ao aumento das concentrações de ONOO<sup>-</sup>, um agente oxidante contra o qual o organismo não dispõe de defesas.<sup>20,23</sup> É válido salientar também que este ONOO<sup>-</sup> formado pode oxidar a BH<sub>4</sub> em dihydrobiopterina (BH<sub>2</sub>), reduzindo ainda mais a biodisponibilidade deste cofator, o que contribui para que mais eNOS permaneça na forma desacoplada, dando origem a um ciclo vicioso.<sup>25</sup>

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

Os estudos que visam compreender os mecanismos fisiopatológicos que determinam a AR, bem como aqueles que visam o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, dependem de bons modelos experimentais. Entende-se por bons modelos experimentais, aqueles capazes de reproduzir de forma fidedigna os principais mecanismos fisiopatológicos da AR. Isto se aplica, inclusive, no que diz respeito ao estudo dos danos cardiovasculares relacionados à AR. Contudo, é válido ressaltar que embora apresentem semelhanças fisiopatológicas importantes com a AR, estes modelos experimentais não devem ser confundidos com a doença que se desenvolve nos seres humanos.<sup>26-29</sup> Com efeito, qualquer extrapolação para seres humanos de resultados de pesquisa obtidos nestes modelos experimentais deve ser feita com muita cautela. Neste sentido, para que extrapolações possam ser feitas de

forma racional e segura, é desejável que um mesmo mecanismo fisiopatológico seja testado no maior número possível de modelos experimentais.<sup>30</sup>

Inúmeros modelos de artrite estão descritos na literatura, todos com semelhanças e diferenças com relação à AR. Entre os mais conhecidos, podemos citar a artrite induzida por adjuvante (*adjuvant induced arthritis* – AIA)<sup>23,24,26-29,31-37</sup> e a artrite induzida por colágeno tipo II (*collagen induced arthritis* – CIA)<sup>26-29,38-47</sup>, bem como as artrites induzidas por fragmentos da parede celular estreptocócica<sup>26</sup>, ácido pristânico<sup>26,48</sup>, avridina<sup>26,49</sup>, retrovírus<sup>26</sup>, *lactobacillus*<sup>26</sup>, micoplasma<sup>26,50</sup> e zymosan<sup>26,51,52</sup>. Dentre os modelos experimentais citados, destacam-se a AIA e a CIA devido ao grande número de estudos que os empregam.

O modelo de artrite induzida por adjuvante foi um dos primeiros modelos experimentais de artrite descritos na literatura e, desde então, tem sido amplamente utilizado, principalmente em testes pré-clínicos de novos agentes terapêuticos. A técnica clássica de indução da artrite por adjuvante utiliza ratos Lewis, e se baseia em uma única injeção intradérmica de adjuvante completo de Freund (CFA) na base da cauda do animal.<sup>26-29</sup> Com rápida evolução e grande reprodutibilidade, este modelo apresenta características semelhantes à AR como eritema e edema de extremidades, inflamação poliarticular, infiltração celular (polimorfonuclear), reabsorção óssea seguida de proliferação óssea periosteal, formação de *pannus*, destruição óssea e cartilaginosa e conseqüentemente perda de função. Ademais, observou-se o envolvimento de células T *helper* e citocinas pró-inflamatórias, além da presença de altos níveis de TNF- $\alpha$ , INF-c, IL-1, IL-6 e IL-7 $\alpha$  em linfonodos e/ou articulações afetadas. Contudo, trata-se de um modelo célula T dependente, mas, sistema complemento independente. Além disso, pouco se sabe sobre o papel das células B neste modelo experimental.<sup>27-29</sup>

O modelo AIA tem sido bastante utilizado em estudos que investigam danos cardiovasculares induzidos por artrite. Um dos primeiros estudos nesta área constatou que a resposta contrátil da aorta de ratos induzidos por artrite é menos dependente de cálcio extracelular.<sup>31</sup> Esta observação foi reforçada posteriormente em outro estudo no qual se observou um aumento das respostas contráteis à fenilefrina em aortas deendotelizadas de ratos acometidos por AIA, 26 dias após indução da doença.<sup>32</sup> Isto porque, segundo estes autores, o teor de cálcio intracelular é maior nas células do músculo liso destes animais, reforçando a observação levantada por Fontaine *et al.*<sup>31,32</sup>

Estudos que abordaram mais diretamente a função endotelial indicam que esta pode estar prejudicada no modelo de AIA. De fato, observou-se que as respostas vasorrelaxantes à acetilcolina em aortas de ratos, totalmente dependente do endotélio,<sup>53</sup> é reduzida pela AIA.<sup>23,24,33-36</sup> Segundo estes autores, o processo inflamatório induzido por este modelo experimental de artrite promove um prejuízo no relaxamento de preparações de aorta à acetilcolina em um período de aproximadamente 21 dias após surgimento dos primeiros sinais inflamatórios. Para Haruna *et al.*,<sup>23,24</sup> este prejuízo pode ser interpretado como um estado pró-inflamatório e pró-trombótico, indicando os primeiros estágios da aterosclerose. Além disso, alguns destes estudos também relatam um aumento na expressão da eNOS nestas preparações, muito provavelmente justificando o aumento vascular de  $O_2^-$ .<sup>23,24</sup> Foi observado também que esta redução nas respostas vasorrelaxantes à acetilcolina em aortas de ratos AIA está fortemente relacionada ao estresse oxidativo promovido pelo sistema renina angiotensina local.<sup>35</sup> Prati *et al.*<sup>36</sup> por sua vez, inferiram que o aumento da arginase estaria diretamente relacionado à disfunção endotelial nestas preparações, limitando a disposição do substrato L-arginina para as NOS presentes nestes tecidos. Ademais, neste estudo observou-se também uma maior produção vascular de nitrotirosina, produto da interação entre radicais livres e NO nos animais acometidos por artrite.<sup>36</sup> Isto posto, outro estudo também realizado em AIA sugeriu que o prejuízo no relaxamento da aorta induzido pela acetilcolina está diretamente correlacionado ao aumento dos níveis séricos de homocisteína.<sup>37</sup> Neste mesmo estudo, verificou-se que o tratamento dos animais com vitamina E é capaz de reverter o aumento dos níveis séricos de homocisteína, bem como o prejuízo observado nas respostas destas preparações à acetilcolina.<sup>37</sup> Em síntese, estes trabalhos reforçam a hipótese de que a disfunção endotelial na AIA é decorrente do estresse oxidativo.

Na busca por modelos experimentais que apresentem semelhanças fisiopatológicas ainda maiores com a AR, vem sendo colocado em evidência o modelo de artrite induzida por colágeno tipo II (*collagen induced arthritis* – CIA), tanto em ratos quanto em camundongos da linhagem DBA-1J.<sup>45</sup> Como a AIA, a CIA também se caracteriza como um modelo experimental de evolução rápida e de alta reprodutibilidade. Do mesmo modo, a CIA apresenta as mesmas características clínicas e histológicas da AIA, exceto pela infiltração e destruição óssea e cartilaginosa, que na CIA ocorre em virtude da deposição de complexos imunes.<sup>26-29</sup>

Além disso, achados imunológicos como altos níveis de anticorpos contra o colágeno tipo II e produção de fatores reumatoides ocorrem somente na CIA e estão diretamente relacionados com a doença humana. Neste sentido, sabe-se que a indução da artrite neste modelo experimental é mediada pelo envolvimento de células T específicas para colágeno tipo II e células B além de ser sistema complemento dependente.<sup>38-44</sup> O surgimento tanto da CIA quanto da AR estão fortemente associadas à expressão de moléculas específicas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), onde em camundongos temos I-Aq e I-Ar, e em humanos temos HLA-DR1 e DR4. Ademais, como na doença humana, inúmeras citocinas pró e anti-inflamatórias são expressas nas articulações desses camundongos como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1ra, IL-10 e TGF- $\beta$ . Por sua vez, IL-12 e IL-23 também parecem estar envolvidas na patogênese do camundongo DBA-1J na artrite induzida por colágeno.<sup>26-29,38-44</sup>

Estudos da função endotelial realizados em camundongos da linhagem DBA-1J, acometidos pela CIA são escassos na literatura, não obstante as semelhanças deste modelo com a AR. Os poucos estudos que utilizaram este modelo experimental de artrite não mostram, de forma inequívoca, prejuízos na função endotelial. A CIA em camundongos levou a um aumento das concentrações de nitrito/nitrato tanto na urina quanto no plasma destes animais, muito provavelmente refletindo um aumento na expressão de iNOS.<sup>46</sup> Estes autores observaram também um aumento na concentração plasmática de PGE<sub>2</sub> em decorrência do processo inflamatório.<sup>52</sup> Reynolds *et al.*,<sup>47</sup> utilizando uma metodologia bastante semelhante à proposta no presente trabalho, observaram que as respostas contráteis da aorta destes animais à serotonina<sup>54</sup> e ao KCl são prejudicadas. Estes autores não encontraram qualquer sinal de prejuízo da função endotelial nestas preparações. Isto porque as respostas vasorrelaxantes à acetilcolina, diretamente relacionada à função endotelial,<sup>55</sup> não estavam reduzidas nestas preparações e a presença de inibidores tanto das NOS quanto das ciclo-oxigenases (COX) não modificou este padrão de resposta. Além disso, não houve diferença significativa entre as concentrações séricas dos metabólitos do NO entre os animais CIA e controles.

O estudo de Reynolds *et al.*<sup>47</sup> está longe de ser conclusivo, ao contrário, desperta para a necessidade de se empregar outras abordagens experimentais na investigação da função endotelial nos camundongos da linhagem DBA-1J acometidos pela CIA. Este estudo deixa algumas questões importantes em aberto.

Primeiramente pelo fato de ter sido realizado apenas 3-6 dias após surgimento dos primeiros sinais de acometimento articular, o que não exclui a possibilidade de que a disfunção endotelial venha a se concretizar em uma fase mais tardia. Isto porque, segundo Oliver e Brahn,<sup>26</sup> alguns elementos característicos da artrite como *pannus*, neoangiogênese, erosões e destruição articular estabelecem-se em um período de até 2 semanas contados a partir da instalação do processo inflamatório. Além disso, neste estudo não foram avaliadas as respostas da aorta destes animais à noradrenalina que é o principal efector do sistema nervoso simpático no controle do tônus vascular.<sup>56</sup>

**OBJETIVOS**

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar a reatividade vascular da aorta torácica de camundongo DBA-1J 15 dias após o surgimento dos primeiros sinais inflamatórios poliarticulares no modelo de poliartrite induzida por colágeno bovino tipo II (CIA).

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Determinar se, neste período, ocorrem modificações das respostas aos agentes vasoconstritores 5-HT, KCl e noradrenalina em aorta torácica.

2.2.2. Determinar a influencia que o endotélio exerce sobre as ações de agentes vasoconstritores e vasodilatadores (acetilcolina e nitroprussiato de sódio) nas aortas torácicas destes animais, com foco na participação de mecanismos endoteliais relacionados à NOS.

2.2.2 Verificar se, neste período, a poliartrite induzida por colágeno promove modificações estruturais na aorta torácicas dos animais estudados.

2.2.4 Avaliar a capacidade antioxidante plasmática destes animais, neste estágio de desenvolvimento da artrite.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem DBA-1J, adultos (10 semanas  $\pm$  2 semanas) pesando entre 18 e 22 g, provenientes do Biotério Experimental da FAMEMA. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, submetidos à dieta e água *ad libitum* em condições controladas de iluminação (fotoperíodo: 12 horas) e temperatura (20°C a 25°C). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, no dia 11 de julho de 2012 (protocolo n° 829/12).

#### 3.2 Grupos experimentais

Os 80 animais utilizados foram divididos em dois grupos: grupo controle (falso-imunizados; 35 animais) e grupo artrite (imunizados; 45 animais).

#### 3.3 Protocolo de indução da artrite

O protocolo de indução da artrite teve início com a anestesia dos animais. Para tanto, foram administrados via intraperitoneal 0,3ml de uma solução a 17% de quetamina associada a xilazina (na proporção 1:1). Quando anestesiados, os camundongos foram posicionados em decúbito ventral sobre campo cirúrgico para realização do procedimento de imunização. A primeira imunização (no dia 0) consistiu na administração de 100 $\mu$ g de colágeno bovino tipo II (CII; 4mg/ml; Sigma-Aldrich) dissolvido em 25 $\mu$ L de ácido acético (5x10<sup>-2</sup>mol/L) emulsificado com 25 $\mu$ L de adjuvante completo de Freund (CFA; 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*), por via intradérmica (na base da cauda). No 21º dia o animal recebeu um reforço (*boost*), que consistiu na administração de 100 $\mu$ g de colágeno bovino tipo II (CII; 4mg/ml; Sigma- Aldrich) dissolvidos em 25 $\mu$ L de ácido acético (5x10<sup>-2</sup>mol/L) emulsificado com 25 $\mu$ L de adjuvante incompleto de Freund (IFA; Sigma- Aldrich), também por via intradérmica. O protocolo de imunização e *boost* também foi realizado nos animais controles, falsa-imunização e falso-*boost*, porém sem a administração do colágeno bovino tipo II. Dessa forma garantiu-se que estes animais

fossem submetidos às mesmas condições experimentais dos animais do grupo artrite.<sup>45</sup>

O acometimento das articulações ocorreu geralmente entre o 26º e o 33º dia após a imunização. Os sinais destes acometimentos estão detalhadamente mencionados no item 3.5 desta seção. Uma vez constatado o acometimento articular decorrente da artrite, aguardou-se um período de 15 dias para o estudo da reatividade da aorta torácica e coleta de material para as análises bioquímicas e histológicas. O pareamento dos animais controles foi estabelecido no momento da primeira imunização, logo, todo animal pertencente ao grupo artrite tinha um correspondente que pertencia ao grupo controle. Cabe ressaltar, no entanto, que alguns animais não desenvolveram o processo inflamatório articular até o 33º dia pós-imunização, e por conta disso, foram excluídos do estudo.

### **3.4 Pesagens**

Os animais foram pesados no início do protocolo experimental, no 21º dia e no dia do sacrifício (geralmente no 45º dia). No dia do sacrifício foi realizada também a pesagem das patas. O peso das patas foi normalizado pelo peso corporal (pata em miligramas/peso corporal em gramas). Estes dados serviram como indicativo do processo inflamatório articular decorrente da artrite experimental.

### **3.5 Ectoscopia**

Esta análise centrou-se na avaliação do eritema e do edema na pata dos animais, decorrentes do processo inflamatório articular.<sup>45</sup> Esta análise foi realizada diariamente a partir da imunização inicial até o surgimento dos sinais inflamatórios acima mencionados. Para documentação, foi realizada captura das imagens das patas dos camundongos, no dia da imunização (dia 0) e no dia do experimento de reatividade vascular (15 dias após acometimento articular), em estereomicroscópio Olympus SZX7 com câmera de vídeo digital acoplada DP 25, Software DP2-BSW para Dimension, marca Olympus.

### 3.6 Protocolo de coleta do plasma

Amostras de sangue foram obtidas com o auxílio de seringas contendo heparina, pela punção da veia cava (no momento do sacrifício dos animais). Estas amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante (plasma) foi recuperado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior determinação antioxidante do plasma (FRAP- Ferric reducing activity of plasma).

### 3.7 Preparações histológicas

Após protocolo de sacrifício e coleta de sangue para obtenção do plasma, estes animais tiveram a aorta torácica e as articulações dissecadas e removidas para posterior fixação em solução de glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato Sorensen  $10^{-1}\text{mol/L}$  e pH 7,0 (APENDICE A). Nesta solução, estas amostras de tecido permaneceram por um período mínimo de 24 horas. Todo o material coletado foi desidratado em série crescente de concentração de álcool etílico: solução de álcool etílico 70% (várias trocas ao longo de um dia; 4 horas para cada troca) e solução de álcool etílico 95% (4 horas). Em seguida procedeu-se a infiltração em mistura 1:1 de álcool 95% e resina plástica por 4 horas; infiltração em resina de infiltração por 4 horas ou overnight e por fim, inclusão em metacrilato glicol (Leica Historesin – Embedding Kit). As articulações coletadas foram submetidas ao processo de descalcificação (APENDICE B) por aproximadamente 4 semanas antes da inclusão em resina metacrilato (APENDICE C). De cada bloco foram obtidos, em micrótomo Leica RM2245 equipado com navalha de vidro, quatro cortes seriados de  $5\ \mu\text{m}$  de espessura com intervalo médio de  $25\ \mu\text{m}$  entre os mesmos. Para a análise histopatológica das articulações, as lâminas foram coradas por Hematoxilina-Eosina (APENDICE D), Azul de Toluidina (APENDICE E) e Masson (APENDICE F). Por sua vez, para estudo histomorfométrico dos segmentos da aorta torácica, as lâminas foram coradas por Hematoxilina-Eosina (APENDICE D). As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em microscópio de luz Olympus, modelo BX41 acoplado à câmera de vídeo digital, marca Olympus, modelo DP 25, Software DP2-BSW, marca Olympus.<sup>58</sup>

### 3.7.1 Histopatologia das articulações

Para diagnóstico de inflamação, as lâminas foram analisadas com microscópio de luz comum, por patologista experiente que desconhecia a origem do material. A avaliação histopatológica foi feita empregando-se interpretação subjetiva dos seguintes parâmetros: intensidade do exsudato inflamatório (misto – neutrófilos e linfócitos), comprometimento do exsudato inflamatório (perivascular e sinovial), e presença de piodartrite e fibroplasia inicial, conforme quadro 1.

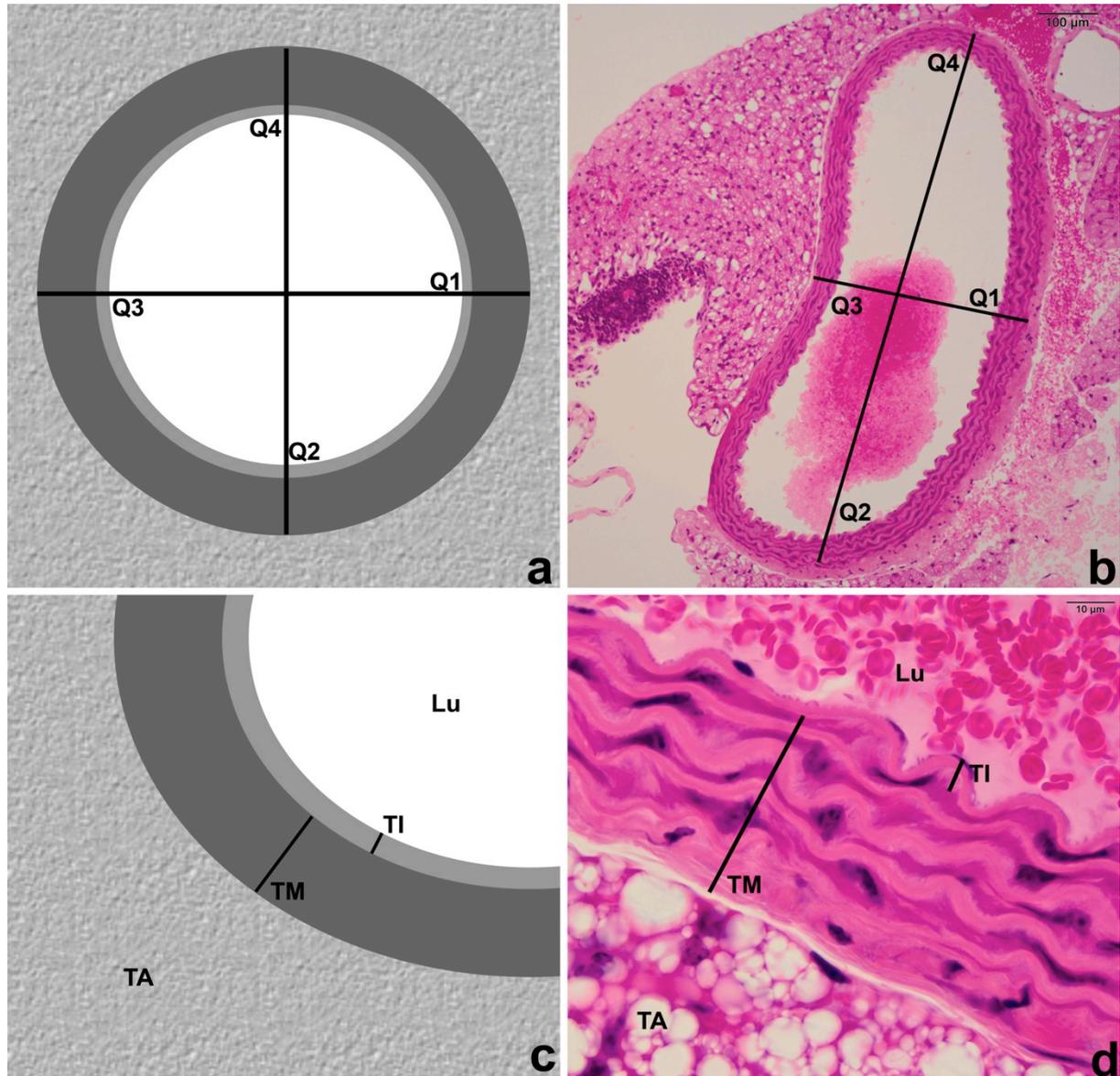
**Quadro 1: Escala de graduação do escore inflamatório (em cruzes)**

<b>Grau de inflamação</b>	<b>Escore</b>	<b>Características histopatológicas</b>
<b>Ausente</b>	0	Parâmetro ausente
<b>Leve</b>	1	Parâmetro presente com intensidade leve
<b>Moderado</b>	2	Parâmetro presente com intensidade moderada
<b>Grave</b>	3	Parâmetro presente com intensidade grave

### 3.7.2 Histomorfometria da aorta torácica

Para a realização do estudo histomorfométrico da parede dos vasos, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz comum, sendo mensuradas as espessuras das túnicas: íntima e média. De cada aorta torácica avaliada foram capturadas imagens digitais de quatro campos histológicos, por meio de programa de análise de imagens DP2-BSW, marca Olympus, como mostram as Figuras 1A e 1B. A partir destas imagens determinou-se a espessura ( $\mu\text{m}$ ) de ambas as túnicas, média e íntima, como mostram as Figuras 1C e 1D. O resultado final correspondeu à média das medidas de espessura obtidas nos quatro parâmetros, para cada uma das túnicas.

Figura 1: Imagem esquemática



**a)** Imagem esquemática da divisão dos campos histológicos; Q1=quadrante 1; Q2=quadrante 2; Q3=quadrante 3; Q4=quadrante 4; **b)** Fotomicrografia panorâmica do anel de aorta torácica de camundongo DBA-1J dividida em quadrantes (coloração com Hematoxilina-eosina; aumento de 20x); **c)** Imagem esquemática das túnica íntima (TI), média (TM) e adventícia (TA), bem como do lúmen vascular (Lu); **d)** Fotomicrografia do segmento da aorta torácica de camundongo DBA-1J com indicação dos limites das túnica (coloração com Hematoxilina-eosina; aumento de 100x).

### 3.8 FRAP- Ferric Reducing Activity of Plasma

Para determinação da capacidade antioxidante do plasma utilizou-se 60µl de plasma homogeneizado de cada animal, adicionado a 0,19 µL de água destilada e 1,8 ml do reagente FRAP (solução-tampão acetato a  $3 \times 10^{-5}$  mol/L: 2,7 g de acetato de sódio anidro + 16 ml de ácido acético glacial para 1 litro de água destilada, pH=3,6; ferritripiriltriázina (TPTZ) a  $10^{-3}$  mol/L em HCl  $4 \times 10^{-3}$  mol/L e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

$2 \times 10^{-3}$  mol/L na proporção 10:1:1). Esta composição é então incubada a  $37^{\circ}$  C durante 15 minutos. A absorvância do complexo (TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com  $\text{Fe}^{3+}$ ) de coloração azul é lido em comparação ao reagente branco (1,8 ml reagente de FRAP) a 593 nm. Soluções padrão de  $\text{Fe}^{2+}$  na faixa de 0 a  $2 \times 10^{-5}$  mol/L são preparadas a partir de sulfatos ferrosos ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em água destilada. Os dados são expressos em  $\mu\text{mol}$  íons férricos reduzidos a íons ferrosos por litro.<sup>59</sup>

### 3.9 Estudo funcional de reatividade vascular

Imediatamente após o sacrifício dos animais, segmentos da aorta torácica foram destacados dos tecidos adjacentes e removidos para uma placa de Petri recoberta com parafina. Com o auxílio de uma lupa, estas aortas foram separadas dos tecidos adjacentes e seccionadas em anéis de 2-3 mm. Em seguida, estes anéis foram montados em banhos para estudo de órgão isolado, com capacidade para 2 ml, dispostos entre 2 ganchos metal (inseridos no lúmen). Neste ambiente, os anéis foram mantidos sob tensão de 5 Mn (equivalente a  $\pm 0,5$  gf), imersos em solução nutritiva de Krebs-Henseleit (APENDICE G), com pH ajustado para 7,4, gaseificada com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ) e aquecida a  $37^{\circ}\text{C}$ . As modificações de tônus destas preparações foram registradas através de sistema Powerlab 8/30 data-acquisition system (AD Instruments, Castle-Hill, NSW, Australia). Antes da determinação das curvas concentração-resposta, as preparações foram mantidas em repouso por 60 minutos para se adaptarem a este ambiente artificial. Neste período, bem como durante todo o experimento, a solução nutritiva foi substituída a cada 20 minutos.

Para avaliação funcional da integridade endotelial, estas preparações foram pré-contraídas com fenilefrina ( $10^{-5}\text{M}$ ), e em seguida desafiadas com acetilcolina ( $10^{-5}\text{M}$ ). Em preparações cujo endotélio foi removido mecanicamente (preparações deendotelizadas), relaxamentos induzidos por acetilcolina ( $10^{-5}\text{M}$ )  $\leq 10\%$ , indicavam efetividade da remoção endotelial.

### 3.10 Curvas concentração-resposta

A reatividade vascular foi estudada a partir da obtenção de curvas concentração-resposta cumulativas para noradrenalina ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$ M), serotonina ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$ M), acetilcolina ( $10^{-8}$  -  $10^{-4}$ M), nitroprussiato de sódio ( $10^{-13}$  -  $10^{-7}$ M) ou solução despolarizante (KCl  $10^{-3}$ mol/L -  $12 \times 10^{-3}$ mol/L compensado pela redução do sódio em solução).

Algumas destas preparações foram previamente incubadas por 30 minutos com L-NAME ( $10^{-4}$ M)<sup>60</sup> e 1400W ( $10^{-6}$ M)<sup>61</sup>, inibidor não seletivo de NOS e inibidor seletivo de iNOS, respectivamente, ou por 60 minutos com o antioxidante curcumina ( $10^{-9}$ M)<sup>62</sup>, administrados diretamente no banho de órgãos. Logo após estes períodos de incubação, procedeu-se os desafios com noradrenalina ou acetilcolina. Outras preparações foram desafiadas com noradrenalina ou acetilcolina na presença de BH<sub>4</sub> ( $10^{-6}$ M)<sup>63</sup>. Contudo, para isso, a BH<sub>4</sub> foi incorporada na solução nutritiva juntamente com a noradrenalina ou acetilcolina, uma vez que a presença desta substância por longos períodos no banho pode influenciar o pH do mesmo. Assim, a cada 4 minutos, substituía-se a solução nutritiva no banho com BH<sub>4</sub> (recém incorporada à esta), com concentrações crescentes de noradrenalina ou acetilcolina.

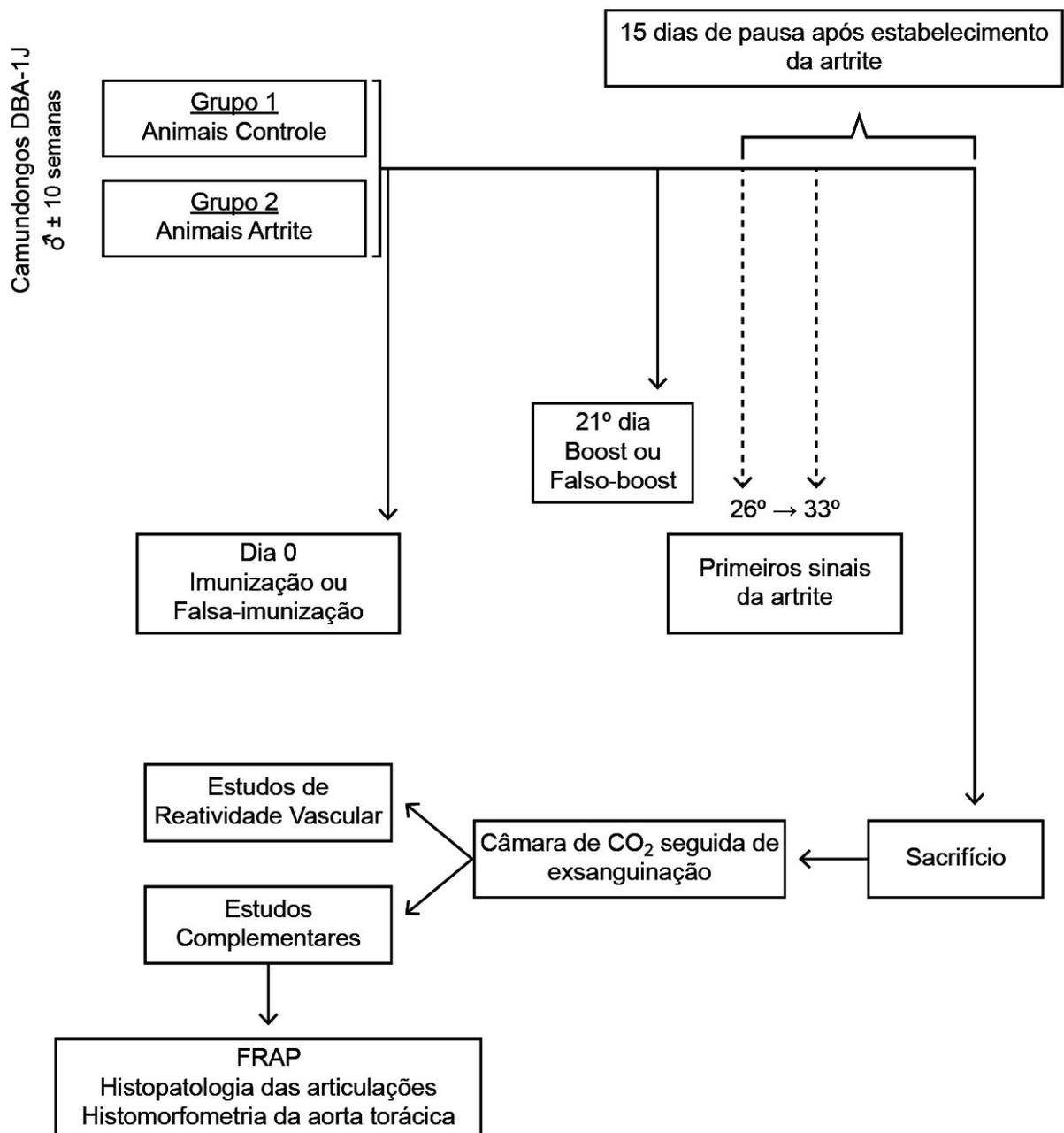
### 3.11 Análise de parâmetros farmacológicos

As respostas vasomotoras foram expressas graficamente como curvas concentração-resposta. A partir das curvas concentração-resposta, foram obtidos o pEC<sub>50</sub>, que consiste no negativo do logaritmo da concentração molar do agonista responsável por 50% do efeito máximo (EC<sub>50</sub>). Os valores de EC<sub>50</sub> foram calculados por regressão não linear através do programa Prisma (GraphPad Software Corporation). Calculou-se também o E<sub>max</sub> (efeito desencadeado pela concentração supra-máxima do agonista). O E<sub>max</sub> equivale ao último ponto das curvas concentração-resposta.

### 3.12 Análise estatística

Os parâmetros, analisados foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de 4-17 animais. A análise estatística dos resultados foi feita através do teste “t” de Student, com exceção dos pesos dos animais que foram comparados através de análise de variância (ANOVA) de duas vias. Diferenças nos valores de  $P < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas.

### 3.13 Diagrama experimental



### 3.14 Drogas e reagentes

#### 3.14.1 Indução da artrite

- Ácido acético P.A. (Synth, Brasil).
- Adjuvante completo de Freund (Complete Freund's Adjuvant, Sigma Co, E.U.A.)
- Adjuvante incompleto de Freund (Incomplete Freund's Adjuvant, Sigma Co, E.U.A.)
- Colágeno bovino tipo II (Collagen from bovine nasal septum, Sigma Co, E.U.A.)
- *Mycobacterium tuberculosis* (Killed *M. tuberculosis* H37 Ra, BD Difco <sup>TM</sup>)
- Quetamina (Cloridrato de dextrocetamina, Cristália, Brasil)
- Xilazina (Cloridrato de xilazina, Vetbrands, Brasil)

#### 3.14.2 Reatividade vascular

- 1400W (N-(3-[Aminomethyl]benzyl)acetamidine, Sigma Co, E.U.A.)
- Bicarbonato de sódio P.A. (Synth, Brasil)
- Cloreto de cálcio dihidratado P.A. (calcium chloride dihydrate , Merck, Alemanha)
- Cloreto de potássio P.A. (Synth, Brasil)
- Cloreto de sódio P.A. (Synth, Brasil)
- Curcumina (E,E)-1,7-bis(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, Sigma Co, E.U.A.)
- D-glicose anidra (dextrose) P.A. (Synth, Brasil)
- Fenilefrina ((R)- (-) –phenylephrine hydrochloride, Sigma Co, E.U.A.)
- Fosfato de potássio monobásico anidro P.A. (Synth, Brasil)
- Heparina sódica 5000UI/ml solução injetável (Cristália, Brasil)
- L-NAME (N<sub>ω</sub>-nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, Sigma Co, E.U.A.)
- Nitroprussiato de sódio ([pentacianonitrosil ferrato(III) dissódico (dihidrato)], Merck Co, Alemanha)
- Noradrenalina ((S)-(+)-norepinephrine L-bitartrate, Sigma Co, E.U.A.)
- Sulfato de magnésio P.A. (Synth, Brasil)
- Tetrahydrobiopterina ((6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin dihydrochloride, Sigma Co, E.U.A.)

### 3.14.3 Preparações histológicas

- Ácido Acético P.A. (Synth, Brasil)
- Ácido cítrico monohidratado P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Ácido fosfomolibídico P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Ácido fosfotúngstico P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Álcool etílico absoluto P.A. (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Brasil)
- Azul de toluidina (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Cloreto de sódio P.A. (Synth, Brasil)
- Eosina amarela (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Floxina B (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Formaldeído P.A. (Chemco Indústria e Comércio LTDA, Brasil)
- Fosfato dissódico (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Fosfato monossódico (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Fucsina ácida (fuchsin acid, Sigma Co, E.U.A.)
- Glutaraldeído P.S. (solução 25% em água, Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Hematoxilina (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Hidróxido de sódio P.A. (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Brasil)
- Historesin activator (Leica Co, Alemanha)
- Historesina (Leica Co, Alemanha)
- Orange G (Sigma Co, E.U.A.)
- Óxido de mercúrio (II) P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Paraformaldeído extra puro (Merck Co, Alemanha)
- Permunt (Thermo Fisher Scientific Inc, E.U.A.)
- Ponceau de xilidina (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Sulfato de alumínio e potássio P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Verde luz (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Xilol P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)

### 3.14.4 FRAP

- Acetato de sódio trihidratado P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Ácido acético P.A. (Synth, Brasil)
- Ácido clorídrico P.A. (Synth, Brasil)

- Cloreto de ferro III (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- Sulfato de ferro II (Vetec Química Fina LTDA, Brasil)
- TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine, Sigma Co, E.U.A.)

**RESULTADOS**

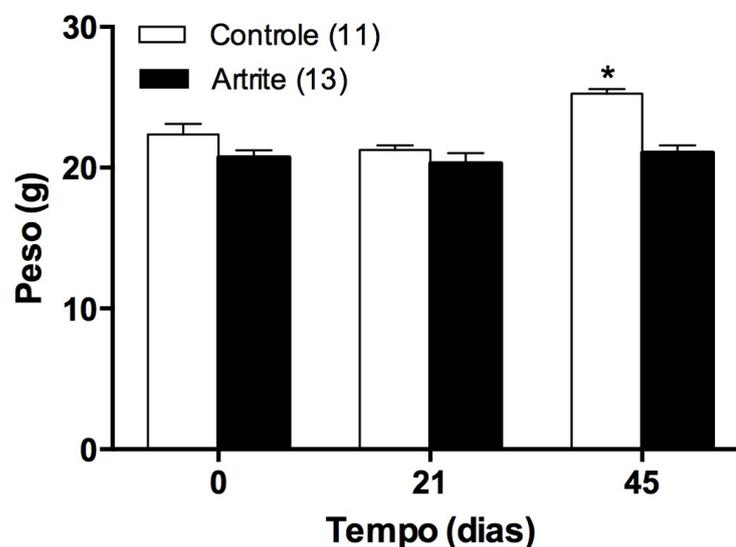
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Validação do modelo experimental CIA

#### 4.1.1 Pesagem dos animais

Nas pesagens dos animais realizadas no dia da primeira imunização/falsa-imunização (dia 0) e no 21º dia (*boost/falso-boost*), não foram constatadas diferenças significativas de peso corporal entre os animais dos grupos controle e artrite. Contudo, a terceira pesagem, realizada no dia dos experimentos de reatividade vascular, mostrou que o peso dos animais do grupo artrite eram significativamente menores em relação ao peso dos animais do grupo controle (Figura 2).

Figura 2 – Peso corporal em gramas (g) dos animais dos grupos controle e artrite, obtidos nos dias da imunização/falsa-imunização, do *boost/falso-boost* e dos experimentos de reatividade vascular



Peso corporal em gramas (g) dos animais dos grupos controle e artrite, obtidos nos dias da imunização/falsa-imunização (dia 0), do *boost/falso-boost* (21º dia) e dos experimentos de reatividade vascular (45º dia); Barras indicam média  $\pm$  erro padrão da média. \* indica diferença significativa ( $P < 0,001$ ) em relação aos animais controles (ANOVA de duas vias, peso corporal e tempo, seguida pelo pós-teste de Bonferroni). Entre parênteses, o número de amostras.

#### 4.1.2 Pesagem das patas

Na Tabela 1 são apresentados os pesos das patas (anteriores/posteriores; direita/esquerda) obtidas dos animais dos grupos controle e artrite. Observa-se um aumento significativo do peso médio de todas as patas (anterior/posterior; direita/esquerda) em decorrência da artrite induzida por colágeno.

Tabela 1 – Peso médio das patas obtidas dos animais dos grupos controle e artrite, normalizados pelo peso corporal total dos animais estudados (peso da pata em mg/peso total do animal em g).

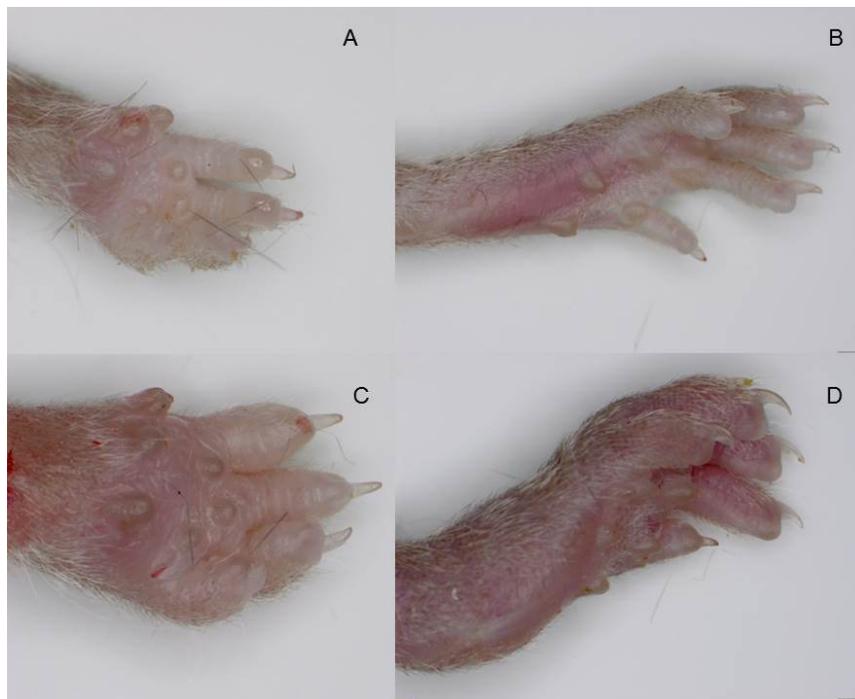
	<b>Controle</b>	<b>Artrite</b>
	<b>(n=9)</b>	<b>(n=13)</b>
<b>Pata Anterior Direita</b>	3,02±0,07	5,50±0,32 *
<b>Pata Anterior Esquerda</b>	2,85±0,07	5,03±0,41 *
<b>Pata Posterior Direita</b>	6,70±0,14	11,84±0,58 *
<b>Pata Posterior Esquerda</b>	6,74±0,09	12,04±0,62 *

\* Indica diferença significativa ( $P < 0,001$ ) em relação aos animais controles (Teste "t" de Student). Entre parênteses, o número de animais avaliados.

### 4.1.3 Ectoscopia

Na Figura 3 são apresentadas fotografias das patas obtidas dos animais dos grupos controle (3A e 3B) e artrite (3C e 3D), obtidas no dia do experimento (dia 45). Observa-se eritema e um aumento do volume das patas (edema) tanto anterior quanto posterior, em decorrência da CIA. Dos 45 animais imunizados com colágeno, 36 (80%) desenvolveram estes sinais de forma bastante característica.

Figura 3 – Imagens das patas dos animais do grupo controle e artrite.



Imagens das patas anteriores dos animais do grupo controle (3A) e artrite (3C) e posteriores dos animais dos grupos controle (3B) e artrite (3D).

#### 4.1.4 Histopatologia das articulações

A ocorrência da artrite também foi comprovada pelo escore atingido no grupo artrite. Os cortes dos animais controle avaliados (n=5) não obtiveram nenhum escore (escore 0), enquanto todos os cortes dos animais artrite (n=5) atingiram a pontuação máxima, ou seja, escore 3.

## 4.2 Repercussões vasculares da CIA

### 4.2.1 Histomorfometria da aorta torácica

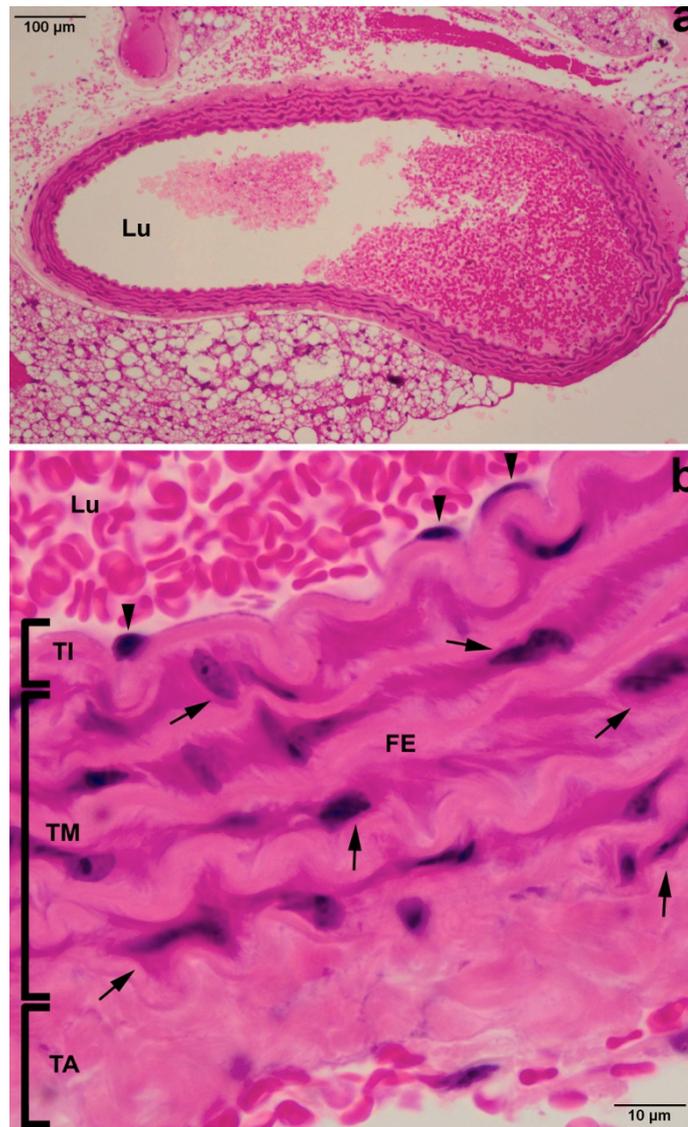
A partir de cortes histológicos de aortas obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (figuras 4) e artrite (figura 5), obteve-se as medidas de espessura das túnicas média e íntima destas preparações (Tabela 2). Observou-se que a artrite induzida por colágeno não modificou significativamente a espessura da parede das aortas, nem tampouco modificou a espessura das túnicas íntima e média destes vasos.

Tabela 2 – Valor médio das medidas da túnica íntima e túnica média da aorta torácica dos animais dos grupos controle e artrite. Valores expressos em  $\mu\text{m}$ .

	<b>Controle</b>	<b>Artrite</b>
	<b>(n=4)</b>	<b>(n=6)</b>
<b>Túnica íntima</b>	4,11±0,31	4,59±0,16
<b>Túnica média</b>	55,20±2,15	50,52±2,48

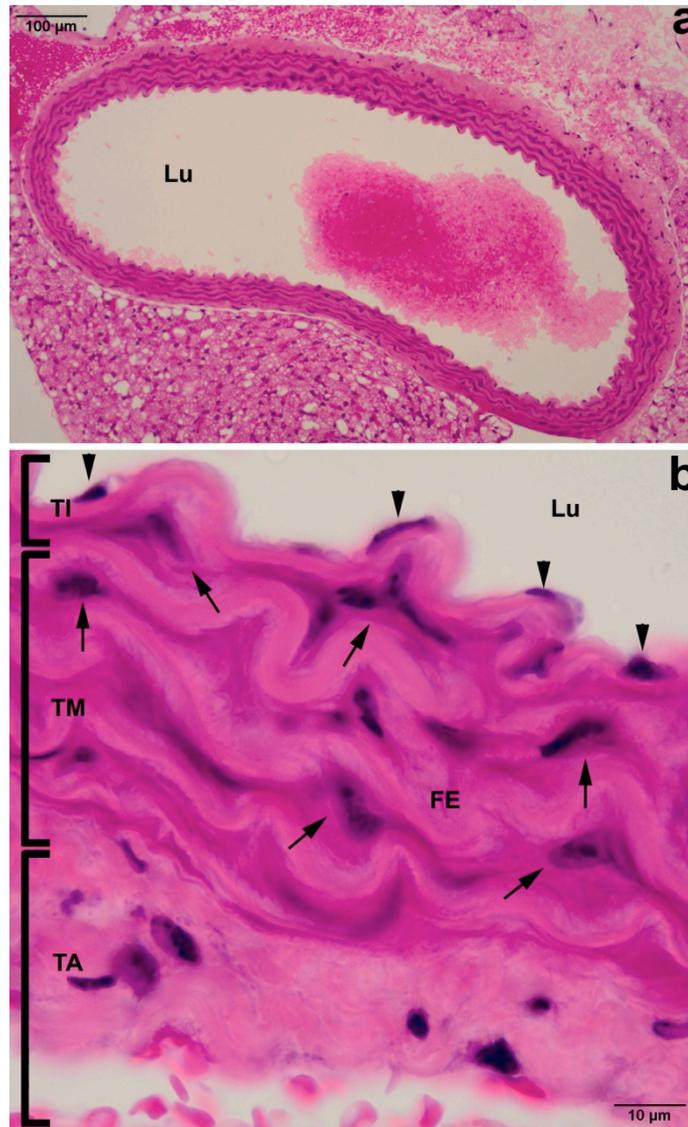
Entre parênteses, o número de amostras.

Figura 4 - Prancha histológica: grupo controle



a) Fotomicrografia panorâmica do anel da aorta torácica de camundongo DBA-1J controle; Lúmen vascular (Lu); Hematoxilina-eosina 20x; b) Fotomicrografias do segmento da aorta torácica de camundongo DBA-1J controle evidenciando: na túnica íntima (TI) as células endoteliais (▼), na túnica média (TM) as células musculares lisas (↑) entremeadas à área de fibras elásticas (FE), a túnica adventícia (TA) e o lúmen vascular (Lu); Hematoxilina-eosina 100x.

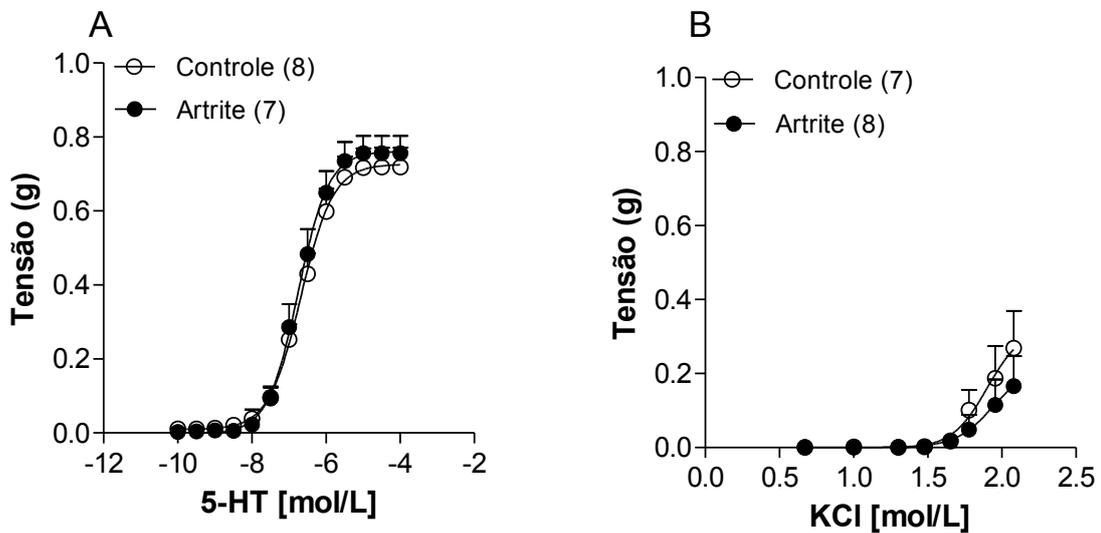
Figura 5 - Prancha histológica: grupo artrite



a) Fotomicrografia panorâmica do anel da aorta torácica de camundongo DBA-1J artrite; Lúmen vascular (Lu); Hematoxilina-eosina 20x; b) Fotomicrografias do segmento da aorta torácica de camundongo DBA-1J artrite evidenciando: na túnica íntima (TI) as células endoteliais (▼), na túnica média (TM) as células musculares lisas (↑) entremeadas à área de fibras elásticas (FE), a túnica adventícia (TA) e o lúmen vascular (Lu); Hematoxilina-eosina 100x.

#### 4.2.2 Estudo da reatividade vascular à serotonina e ao KCl

A CIA não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para serotonina (Figura 6A), nem tampouco para KCl (Figura 6B), determinadas em preparações isoladas de aorta torácica intacta. Por conta disso, nenhuma diferença significativa ocorreu em termos de  $E_{max}$ . Os valores de  $pEC_{50}$  para serotonina e para KCl, obtidos em preparações isoladas de animais do grupo artrite também não diferiram significativamente daqueles obtidos em animais do grupo controle (Tabela 3).



**Figura 6** – Curvas concentração-resposta para serotonina obtidas em preparações intactas (A) e para KCl em preparações deendotelizadas (B) de aorta torácica de animais dos grupos controle (○) e artrite (●). Pontos representam média  $\pm$  erro padrão da média. O último ponto de cada curva concentração resposta equivale ao  $E_{max}$  da resposta. Entre parênteses, o número de amostras.

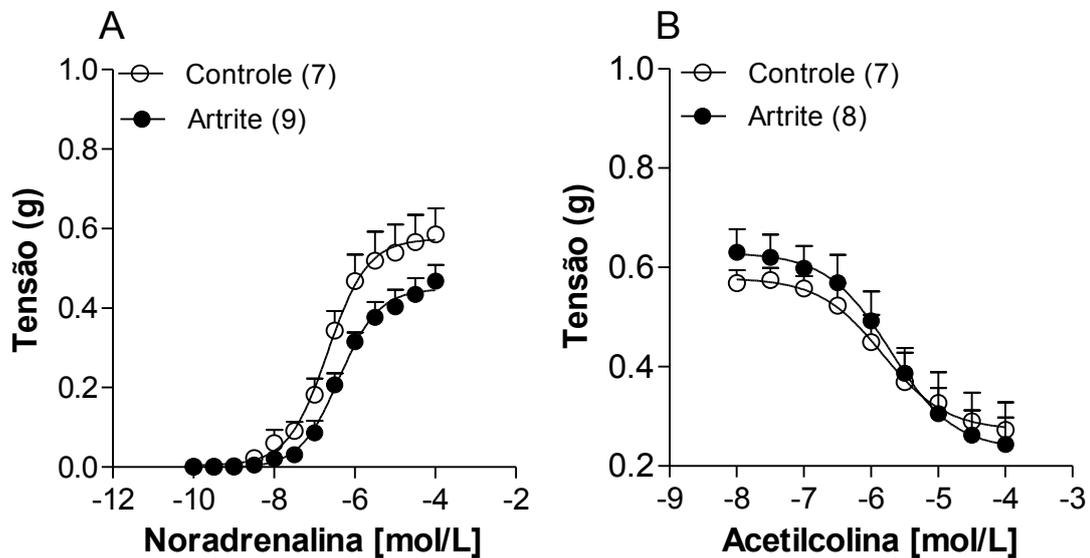
Tabela 3 – Valores de  $pEC_{50}$  para serotonina e KCl determinados em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle e artrite.

	$pEC_{50}$	
	Controle	Artrite
Serotonina	$6,70 \pm 0,11$ (8)	$6,74 \pm 0,12$ (7)
KCl	$1,90 \pm 0,20$ (7)	$1,94 \pm 0,33$ (8)

Entre parênteses, o número de amostras.

#### 4.2.3 Estudo da reatividade vascular à noradrenalina e à acetilcolina

Paralelamente, CIA também não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para noradrenalina (Figura 7A) ou acetilcolina (Figura 7B). Por conta disso, também não foram observadas diferenças significativas, em consequência da CIA, nos parâmetros de  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  para noradrenalina e acetilcolina obtidos a partir destas curvas (Tabela 4)



**Figura 7** – Curvas concentração-resposta para noradrenalina (A) e acetilcolina (B) obtidas em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle (○) e artrite (●). Pontos representam média  $\pm$  erro padrão da média. O último ponto de cada curva concentração resposta equivale ao  $E_{max}$  da resposta. Entre parênteses, o número de amostras.

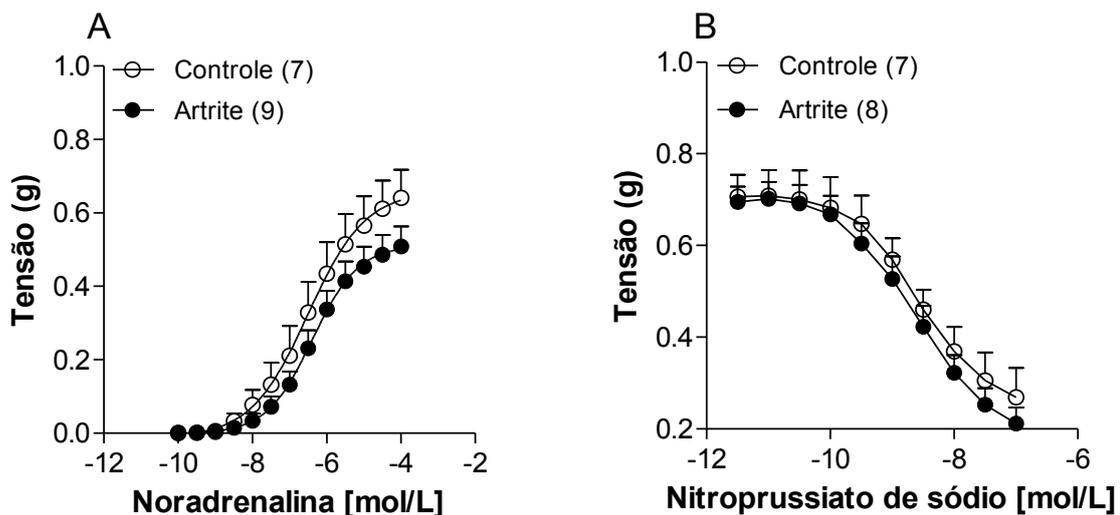
Tabela 4 – Valores  $pEC_{50}$  para noradrenalina e acetilcolina determinados em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle e artrite.

	$pEC_{50}$	
	Controle	Artrite
Noradrenalina	6,64±0,10 (7)	6,45±0,16 (9)
Acetilcolina	5,81±0,23 (6)	5,78±0,11 (8)

Entre parênteses, o número de amostras.

#### 4.2.4 Estudo da reatividade vascular em preparações de endotelizadas

A CIA também não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para noradrenalina (Figura 8A) e nitroprussiato de sódio (Figura 8B) determinadas em preparações isoladas de aorta torácica de endotelizadas. Do mesmo modo, não foram observadas diferenças significativas, em consequência da CIA, nos parâmetros de  $E_{max}$  e  $pEC_{50}$  obtidos a partir destas curvas (Tabela 5).



**Figura 8** – Curvas concentração-resposta para noradrenalina (A) e nitroprussiato de sódio (B) determinadas em preparações isoladas de aorta torácica de endotelizadas, obtidas de animais pertencentes aos grupos controle (○) e artrite (●). Pontos representam média ± erro padrão da média. O último ponto de cada curva concentração resposta equivale ao  $E_{max}$  da resposta. Entre parênteses, o número de amostras.

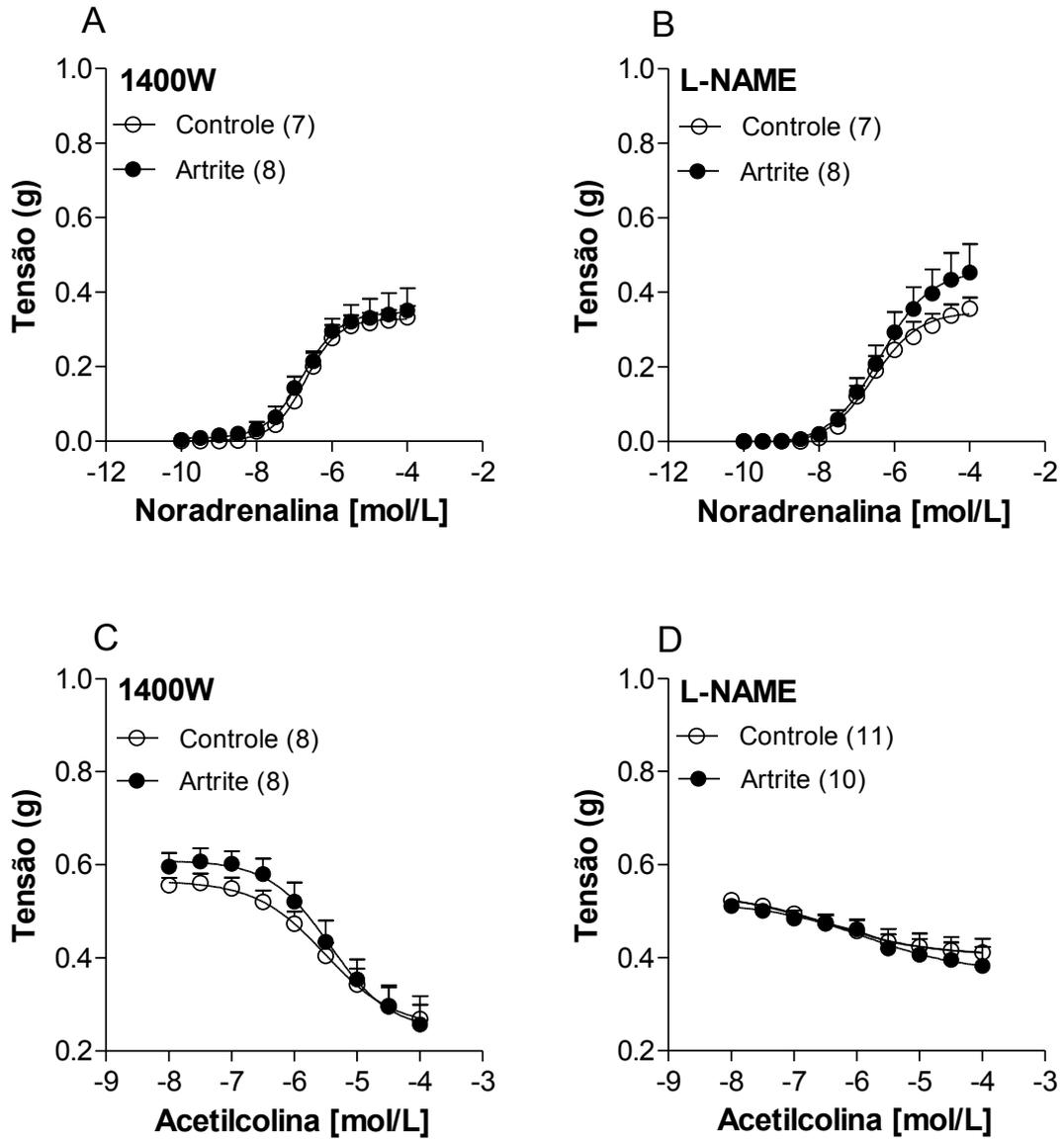
Tabela 5 – Valores pEC<sub>50</sub> para noradrenalina e nitroprussiato de sódio determinados em preparações isoladas de aorta torácica deendotelizadas de animais dos grupos controle e artrite.

	pEC <sub>50</sub>	
	Controle	Artrite
<b>Noradrenalina</b>	6,46±0,26 (7)	6,33±0,15 (9)
<b>Nitroprussiato de sódio</b>	8,42±0,19 (6)	6,58±0,16 (7)

Entre parênteses, o número de amostras.

#### 4.2.5 Estudo da reatividade vascular à noradrenalina e à acetilcolina na presença de inibidores de NOS

A CIA não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para noradrenalina na presença de 1400W 10<sup>-6</sup>M (Figura 9A) ou L-NAME 10<sup>-4</sup>M (Figura 9B), determinadas em preparações isoladas de aorta torácica. Modificações de respostas à acetilcolina também não foram observadas na presença destes inibidores de NOS (Figuras 9C e 9D). Por conta disso, também não foram observadas diferenças significativas, em consequência da CIA, nos parâmetros de E<sub>max</sub> e pEC<sub>50</sub> para noradrenalina e acetilcolina obtidos a partir destas curvas (Tabela 6).



**Figura 9** – Curvas concentração-resposta para noradrenalina e acetilcolina obtidas em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle (○) e artrite (●), na presença do 1400W 10<sup>-6</sup>M (A e C) ou L-NAME 10<sup>-4</sup>M (B e D). Pontos representam média ± erro padrão da média. O último ponto de cada curva concentração resposta equivale ao E<sub>max</sub> da resposta. Entre parênteses, o número de amostras.

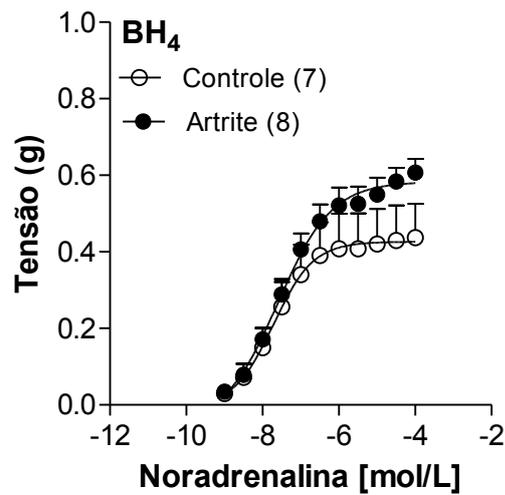
Tabela 6 – Valores  $pEC_{50}$  para noradrenalina e acetilcolina determinados em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle e artrite, pré-tratadas com 1400W  $10^{-6}M$  ou L-NAME  $10^{-4}M$ .

	$pEC_{50}$	
	Controle	Artrite
Noradrenalina		
1400W	6,68±0,14 (7)	6,73±0,12 (8)
L-NAME	6,53±0,26 (7)	6,42±0,20 (8)
Acetilcolina		
1400W	5,88±0,27 (8)	5,45±0,11 (8)
L-NAME	-	-

Entre parênteses, o número de amostras.

#### 4.2.6 Estudo da reatividade vascular à noradrenalina e à acetilcolina na presença de $BH_4$

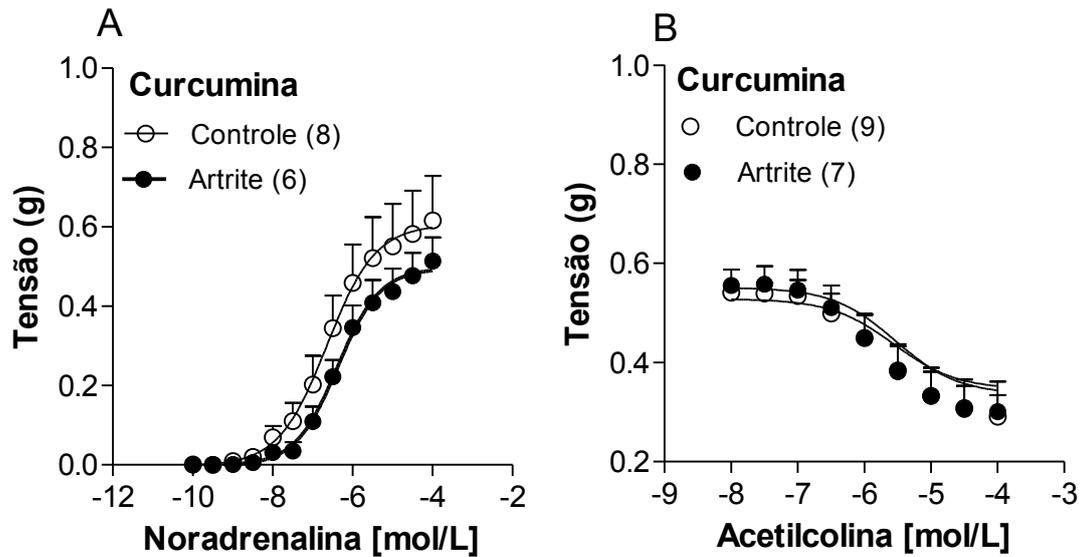
O padrão das curvas concentração-resposta para noradrenalina determinadas em preparações intactas isoladas de aorta torácica, incubadas com  $BH_4$   $10^{-6}M$ , também não sofreu modificação significativa pela CIA (Figura 8). Por conta disso, nenhuma diferença significativa ocorreu em termos de  $E_{max}$ . Os valores de  $pEC_{50}$  para noradrenalina obtidos em preparações isoladas de animais do grupo artrite ( $7,25±0,37$ ;  $n=8$ ), também não diferiram significativamente daqueles obtidos em animais do grupo controle ( $7,28±0,52$ ;  $n=7$ ). Além disso, na presença de  $BH_4$ , a acetilcolina  $10^{-5}M$  também não promoveu relaxamento de magnitude diferente em preparações obtidas nos grupos controle e artrite (26,3%;  $n=9$  e 29%;  $n=8$ , respectivamente).



**Figura 10** – Curvas concentração-resposta para noradrenalina obtidas em preparações isoladas de aorta torácica de animais pertencentes aos grupos controle (○) e artrite (●), previamente incubadas com  $\text{BH}_4$   $10^{-6}\text{M}$ . Pontos representam média  $\pm$  erro padrão da média. O último ponto de cada curva concentração resposta equivale ao  $E_{\text{max}}$  da resposta. Entre parênteses número de amostras.

#### 4.2.7 Estudo da reatividade vascular à noradrenalina e à acetilcolina na presença de curcumina

A CIA também não modificou significativamente o padrão das curvas concentração-resposta para noradrenalina (Figura 9A) e acetilcolina (Figura 9B), determinadas em preparações isoladas de aorta torácica incubadas com curcumina  $10^{-9}\text{M}$ . Neste sentido, as preparações obtidas de animais dos grupos controle e artrite também não apresentaram diferença significativa nos parâmetros  $E_{\text{max}}$  e  $\text{pEC}_{50}$  para noradrenalina e acetilcolina na presença de curcumina (Tabela 5).



**Figura 11** – Curvas concentração-resposta para noradrenalina (A) e acetilcolina (B) obtidas em preparações isoladas de aorta torácica intactas de animais dos grupos controle (○) e artrite (●), previamente incubadas com curcumina  $10^{-9}$ M. Pontos representam média  $\pm$  em padrão da média. O último ponto de cada curva concentração resposta equivale ao  $E_{max}$  da resposta. Entre parênteses, o número de amostras.

Tabela 7 – Valores de  $pEC_{50}$  para noradrenalina e acetilcolina determinados em preparações isoladas de aorta torácica de animais dos grupos controle e artrite, pré-tratadas com curcumina  $10^{-9}$ M.

	$pEC_{50}$	
	Controle	Artrite
Noradrenalina		
Curcumina $10^{-9}$ M	6,66 $\pm$ 0,22 (7)	6,43 $\pm$ 0,20 (6)
Acetilcolina		
Curcumina $10^{-9}$ M	5,80 $\pm$ 0,20 (9)	5,82 $\pm$ 0,09 (7)

Entre parênteses, o número de amostras.

### **4.3 Avaliação da capacidade antioxidante do plasma**

A artrite induzida por colágeno não modificou significativamente a capacidade antioxidante total do plasma (FRAP). Com efeito, os valores de FRAP no grupo controle e artrite foram  $762,6 \pm 47,2 \mu\text{mol/L}$  ( $n=14$ ) e  $835,2 \pm 66,8 \mu\text{mol/L}$  ( $n=17$ ), respectivamente.

**DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

As manifestações da AR vão além de alterações centradas na sinóvia e articulações, visto que tecidos e órgãos como pele, vasos sanguíneos, coração, pulmões e músculos podem ser acometidos, principalmente naqueles pacientes com doença articular mais grave.<sup>1,5,8,9</sup> Com efeito, acredita-se que pacientes artríticos com altos níveis de atividade inflamatória, provavelmente em decorrência da inflamação sistêmica, podem desenvolver disfunção endotelial, o que resulta em aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares.<sup>11-13</sup>

Diversos estudos têm sido propostos visando compreender melhor a disfunção endotelial que ocorre associada a AR. Boa parte destes estudos exploram mecanismos fisiopatológicos característicos da AR em modelos animais. Isto porque, em modelos experimentais, o pesquisador pode abordar os mecanismos inflamatórios de forma mais direta, além de ter mais possibilidades de intervenção sobre os mesmos. Contudo, como já foi dito, pelo fato dos modelos experimentais de artrite serem condições fisiopatológicas distintas da AR, os dados obtidos nestes estudos não podem ser extrapolados de forma precipitada para o ser humano. Antes de se fazer qualquer inferência sobre a AR com base nos modelos experimentais é prudente empregar diferentes modelos para o estudo de um mesmo mecanismo fisiopatológico. O acúmulo de evidências em diferentes modelos experimentais dá mais subsídios para que uma extrapolação de dados para o ser humano seja feita de forma racional e segura.

No entanto, para desenvolvimento do presente estudo, foi preciso validar este modelo experimental, ou seja, confirmar que de fato o protocolo utilizado havia promovido um processo inflamatório poliarticular. Neste sentido, o processo inflamatório poliarticular foi primeiramente comprovado pela ectoscopia e pela pesagem das patas dos animais. Tratam-se de parâmetros simples, porém, bem aceitos para este fim. Assim, todos os animais que foram incluídos no estudo desenvolveram sinais inequívocos de um processo inflamatório (eritema e edema). A instalação do processo inflamatório foi também comprovada pelo aumento significativo do peso das patas dos animais do grupo artrite quando comparado ao peso das patas dos animais do grupo controle. Considerando que este modelo experimental de artrite (CIA) reproduz muitos mecanismos fisiopatológicos da AR, essas manifestações articulares provavelmente decorram da deposição de fibrina,

hiperplasia de células sinoviais, infiltração mononuclear, formação de *pannus*, destruição óssea e cartilaginosa.<sup>26-29,38-44</sup>

Por sua vez, a comprovação final de condroagressão foi realizada através de análise histopatológica das articulações destes animais. Cabe ressaltar que esta análise é um dos parâmetros mais diretos para confirmar a instalação do processo artrítico. Isto porque é capaz de descrever as alterações celulares ocorridas, bem como fornecer informações passíveis de serem documentadas para fins de comparação.<sup>28</sup> Com efeito, corroborando com as expectativas, a análise das lâminas dos animais do grupo artrite revelou características próprias de um processo inflamatório compatível com o modelo de artrite utilizado. Por outro lado, estas mesmas características não foram detectadas nas lâminas dos animais do grupo controle.

No presente estudo, observamos também que no momento da indução da artrite e do *boost* não houve diferença significativa de peso corporal entre os grupos estudados. Contudo, o ganho de peso entre o 21º e o 45º dia (período de instalação da artrite) foi menor nos animais do grupo artrite. Para justificar este ganho de peso menor, inferimos com reservas a ocorrência da sarcopenia relacionada à caquexia reumatoide. Na AR, este importante fator de comorbidade é resultado de diversas modificações fisiopatológicas como: anorexia, fadiga, mal-estar, alterações do sono, aumento da temperatura corporal, maior gasto energético em repouso, “supressão” medular, aumento das proteínas de fase aguda, balanço de nitrogênio negativo, hipoalbuminemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, entre outras, mediadas diretamente pelas citocinas pró-inflamatórias.<sup>64,65</sup> Além disso, acredita-se que o grau de caquexia esteja diretamente relacionado com a intensidade da sinovite, o que leva a um círculo vicioso.<sup>64</sup> Assumindo que o menor peso detectado no final do protocolo seja de fato um fenômeno relacionado à caquexia reumatoide, esta é mais uma evidência de que o modelo experimental é válido.

Uma vez confirmado que os animais desafiados com colágeno de fato desenvolveram artrite poliarticular, passamos a investigar as repercussões vasculares desta condição fisiopatológica. Realizamos inicialmente um estudo histomorfométrico das aortas destes animais pois o processo inflamatório sistêmico pode levar à aterosclerose e, conseqüentemente, ao remodelamento vascular. Para tanto, determinou-se as espessuras das túnicas íntima e média conforme metodologia padrão para investigação das primeiras alterações vasculares em

pacientes artríticos.<sup>15-19,66</sup> Contudo, não foram encontradas diferenças significativas de espessura destas túnicas entre animais pertencentes aos grupos controle e artrite. Estes resultados, de certa forma, coincidem com a literatura uma vez que embora alguns estudos evidenciam um aumento na espessura das túnicas íntima e média em pacientes portadores de AR,<sup>16,66</sup> outros não relatam estas diferenças<sup>17,18</sup>. Provavelmente, embora o processo inflamatório articular esteja bem estabelecido nestes pacientes, e possivelmente também nos animais do presente estudo, o aparecimento de alterações morfológicas é mais tardio, sendo comumente precedido por modificações funcionais.<sup>14</sup>

Não tendo sido constatadas modificações morfológicas induzidas pela artrite nos animais estudados, passou-se então ao estudo das respostas funcionais nestes vasos. Constatou-se primeiramente que as aortas provenientes de animais acometidos pela CIA não apresentaram uma redução significativa de resposta à serotonina e ao KCl. Estes resultados diferem daqueles relatado por Reynolds *et al.*<sup>47</sup> que mostravam redução das respostas de aorta proveniente de camundongos artrite tanto à serotonina quanto ao KCl, possivelmente em decorrência do aumento da metaloproteinase-9 de matriz (MPP-9). Todavia, cabe ressaltar que Reynolds *et al.*<sup>47</sup> que avaliou as respostas da aorta a estes agentes contráteis em um período de aproximadamente 3 a 6 dias após aparecimento dos primeiros sinais da artrite, momento em que o processo inflamatório articular está em sua fase inicial. Já o presente estudo aborda uma fase mais tardia do desenvolvimento da artrite (15 dias após estabelecimento do comprometimento das articulações). Isto sugere que a disfunção contrátil relatada por Reynolds *et al.*<sup>47</sup> é um fenômeno transitório. Não podemos descartar, todavia, que estes resultados discrepantes decorram de diferenças metodológicas. Isto porque Reynolds *et al.*<sup>47</sup> não procederam a falsa-imunização nos animais do grupo controle conforme é preconizado pela técnica de indução da CIA.<sup>45</sup>

No presente estudo considerou-se também que eventuais modificações nas respostas da aorta dos camundongos DBA-1J poderiam ser agonista-específicas. Assim, estudou-se as respostas destas preparações à noradrenalina que é o principal neurotransmissor do sistema nervoso simpático envolvido na manutenção do tônus vascular.<sup>56,57</sup> Esta avaliação das respostas vasculares à noradrenalina foi realizada também em estudos que investigaram a disfunção endotelial no modelo AIA, corroborando a pertinência desta investigação.<sup>31,36</sup> Porém, contrariando nossas

expectativas, os resultados obtidos mostram que a CIA não promoveu nenhuma alteração significativa de resposta destas aortas à noradrenalina.

Uma vez que a função endotelial pode ser acometida em decorrência do processo inflamatório relativo à artrite, conforme mencionado anteriormente, estudou-se também as respostas destas preparações à acetilcolina. Como se sabe, o relaxamento promovido pela acetilcolina em aorta é totalmente dependente do endotélio e, por conta disso, é considerado um dos principais parâmetros para a estimativa da função endotelial.<sup>55</sup> Também motivou esta investigação o fato de ter sido relatado previamente que a AIA pode não modificar as respostas da aorta de rato à noradrenalina, mas sim à acetilcolina.<sup>36</sup> Contudo, as respostas à acetilcolina detectadas nas aortas também não foram significativamente diferentes entre os animais pertencentes aos grupos controle e artrite. Assim, estes resultados sugerem que na fase em que os animais foram estudados (15 dias após acometimento articular) o processo inflamatório decorrente da CIA não promove modificações detectáveis na função endotelial destas preparações. O fato do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio não diferir entre os dois grupos estudados afasta a hipótese de que modificações na sensibilidade destas preparações ao NO possam estar mascarando uma eventual disfunção endotelial decorrente da CIA.

No que se refere à função endotelial, estes resultados assemelham-se aos observados por Reynolds *et al.*<sup>47</sup> na fase mais precoce do modelo, uma vez que estes autores também não observaram modificações de resposta à acetilcolina. A ausência de modificações de resposta à serotonina e à noradrenalina induzidas pela CIA, também enfraquecem a hipótese de disfunção endotelial nas preparações estudadas uma vez que a ação destes agonistas na aorta também é modulada pelo endotélio.<sup>54,56,57</sup>

Neste mesmo modelo experimental observou-se um aumento das concentrações de nitrito/nitrato tanto na urina quanto no plasma, 12 semanas após a primeira imunização.<sup>46</sup> Estes autores, contudo, não verificaram a função endotelial diretamente. Este aumento de nitrito/nitrato não ocorreu em animais tratados simultaneamente com inibidor de COX e inibidor seletivo de iNOS. Por conta disso, os autores inferiram que nesses animais ocorre um aumento da expressão de iNOS. Com efeito, o aumento exagerado da atividade da iNOS pode levar ao consumo da BH<sub>4</sub> resultado no desacoplamento das eNOS e consequente produção endotelial de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, o que compromete a função endotelial. Com base nisto, é possível inferir que,

nos animais avaliados no presente estudo, uma disfunção endotelial pode estar em curso. Entretanto, avaliações em fases posteriores são necessárias para confirmar esta inferência.

Os resultados obtidos divergem dos estudos anteriormente desenvolvidos em modelo experimental AIA, nos quais a relação entre disfunção endotelial e artrite é corroborada.<sup>23-24,32,36,37,46,47</sup> Isto posto, é possível inferir que o modelo de artrite induzida por colágeno em camundongos não reproduz a disfunção endotelial observada na AR ou, se reproduz, isto não ocorre nas aortas destes animais no momento em que estas foram por nós estudadas. De fato, no levantamento da literatura realizado, não foram encontrados estudos que mostram disfunção endotelial em preparações de aorta de camundongos DBA-1J. Com efeito, a ausência de disfunção endotelial na aorta não descarta a ocorrência deste fenômeno em outros leitos vasculares. Vale pontuar que o modelo CIA promoveu alterações endoteliais nos vasos da microcirculação cerebral de camundongos que culminaram no aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica nestes animais.<sup>67,68</sup>

No presente estudo, considerou-se também a hipótese do endotélio, ao invés de modificar as respostas da aorta nos camundongos acometidos pela CIA, ocultá-las. Por conta disso, estudou-se as respostas de aortas deendotelizadas à noradrenalina. Contudo, nenhuma modificação de resposta à noradrenalina decorrente da CIA foi detectada nas preparações, afastando esta hipótese. Averiguou-se também se outros mecanismos moduladores endoteliais poderiam estar atuando de forma compensatória à redução da biodisponibilidade de NO promovida pelo estresse oxidativo nestas preparações. Conforme foi mencionado anteriormente, a liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias pode levar um estresse oxidativo possivelmente decorrente da superexpressão de iNOS no endotélio vascular e conseqüente consumo das reservas de BH<sub>4</sub> nestes tecidos.<sup>20,23</sup> Por conta disso, decidiu-se estudar a reatividade das aortas à noradrenalina e à acetilcolina também na presença de 1400W e L-NAME, inibidor seletivo da iNOS e inibidor não seletivo da NOS, respectivamente, bem como da BH<sub>4</sub>. Havia a expectativa de que, caso algum mecanismo endotelial estivesse compensando algum prejuízo da função endotelial decorrente do consumo de BH<sub>4</sub> pela iNOS superexpressa, uma diminuição das respostas à noradrenalina ou um aumento das respostas à acetilcolina seriam detectados nestas preparações após os tratamentos acima mencionados. Contudo, nenhum destes tratamentos realizados evidenciou

modificações significativas das respostas das preparações estudadas à noradrenalina ou à acetilcolina.

Nesta investigação, utilizou-se também a curcumina que, segundo a literatura, tem propriedades antioxidantes<sup>69,70</sup> e tem demonstrado eficácia no tratamento tanto da AR<sup>70</sup> quanto de artrite em modelos experimentais<sup>72-74</sup>. A curcumina é capaz de inibir a atividade dos fatores de transcrição c-jun/AP-1<sup>75</sup>, bem como inibir a indução e suprimir a expressão dos fatores de transcrição AP-1 e kappa – beta (NF- $\kappa$ β).<sup>76-78</sup> Cabe ressaltar, que o aumento da expressão e da atividade destes fatores de transcrição pode ser o mecanismo central pelo qual as citocinas inflamatórias produzidas na artrite levem à disfunção endotelial. Dando suporte a esta hipótese, a curcumina inibiu a indução da expressão de iNOS e da GTP ciclohidrolase I (enzima que atua na etapa limitante de produção do cofator BH<sub>4</sub>) induzida por uma mistura de IL-1β, TNF-α e INF-γ.<sup>79</sup> De acordo com estes autores, esta ação da curcumina deveu-se à ação inibitória desta substância sobre o fator de transcrição AP-1. Contudo, os resultados obtidos também não revelaram modificações de respostas à noradrenalina ou à acetilcolina, decorrentes da CIA, em preparações pré-tratadas com curcumina. Estes resultados enfraquecem ainda mais a hipótese de uma compensação exercida por mecanismos endoteliais sobre uma eventual disfunção endotelial decorrente do estresse oxidativo nos animais acometidos por artrite.

Este estudo foi complementado pela investigação da capacidade antioxidante plasmática (FRAP) dos animais controles e submetidos à CIA. Esta técnica consiste em avaliar a capacidade antioxidante total do plasma através da determinação de íons férricos reduzidos a íons ferrosos. Um plasma rico em substâncias antioxidantes reage com os íons férricos presentes no meio, reduzindo-os a íons ferrosos. Do mesmo modo, um plasma carente de substâncias antioxidantes pouco reage com os íons férricos do meio.<sup>59</sup> Estudos anteriores observaram uma redução na capacidade antioxidante plasmática de indivíduos artríticos<sup>80,81</sup> fenômeno este não detectado em outros estudos<sup>82</sup>. Os resultados obtidos mostram que o modelo experimental CIA não promoveu nenhuma diferença significativa nos valores de FRAP entre os animais dos grupos controle e artrite. Com efeito, pelo fato de não ter havido uma perceptível redução dos valores de FRAP nos animais do grupo artrite, é possível que o estresse oxidativo destes animais não seja suficientemente elevado para consumir suas defesas antioxidantes plasmáticas.

Por fim, os resultados obtidos permitem supor que os mecanismos moduladores do tônus vascular podem ser influenciados de forma diferente na AR, CIA e artrite induzida por adjuvante. Assim, a extrapolação de dados obtidos em modelos animais o ser humano portador de RA deve ser feito com cuidado. Neste sentido, o emprego de diferentes abordagens experimentais pode melhorar o conhecimento das consequências sistêmicas de artrite, garantindo assim uma maior aplicabilidade dos resultados obtidos nestes modelos.

**CONCLUSÃO**

## 6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos nos permitem afirmar que na CIA, 15 dias após o surgimento dos primeiros sinais inflamatórios articulares, não ocorre modificações das respostas contráteis das aortas de camundongos DBA-1J à serotonina, KCl ou noradrenalina. Além disso, neste período do modelo CIA, não ocorre uma disfunção endotelial significativa, nem tampouco modificações perceptíveis nos mecanismos antioxidantes plasmáticos destes animais. Neste período também não ocorrem modificações morfológicas perceptíveis nas aortas destes animais. Por fim, o presente estudo ressalta a importância do emprego de diferentes modelos experimentais para a uma adequada compreensão dos acometimentos vasculares relacionados à artrite.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

1. Skare TL. Reumatologia: princípios e práticas. 2a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2007.
2. Sato EI. Guia de reumatologia. 2a ed. Barueri (SP): Manole; 2010.
3. Mota LM, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Fronza LS, Bertolo MB, et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol.* 2011;51(3):199-219.
4. Goeldner I, Skare TL, Reason IT, Utiyama SR. Artrite reumatoide: uma visão atual. *J Bras Patol Med Lab.* 2011;47(5):495-503.
5. Carvalho MA, Lanna CC, Bertolo MB. Reumatologia: diagnóstico e tratamento. 3a ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2008.
6. Mota LM, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(2):152-74.
7. Louzada-Junior P, Souza BD, Toledo RA, Ciconelli RM. Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Reumatol.* 2007;47(2):84-90.
8. Moreira C, Carvalho MA. Noções práticas de reumatologia. Belo Horizonte (MG): Livr. e Edit. Health; 1996. v. 1.
9. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças. 8a ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier; 2010.
10. Levy RA, Pacheco MS. Artrite reumatoide: como eu trato. *Rev Bras Reumatol.* 2009;96(5):32-6.
11. Gabriel SE. Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. *Am J Med.* 2008;121(10 Suppl 1):S9-14.
12. Torigoe DY, Laurindo IM. Artrite reumatóide e doenças cardiovasculares. *Rev Bras Reumatol.* 2006;46(supl 1):60-6.
13. Lima MC, Massabki PS. Fatores de risco para doenças cardiovasculares na artrite reumatoide: tabagismo e aterosclerose. *Rev Soc Bras Clin Med.* 2009;7(5):343-7.
14. Khan F, Galarraga B, Belch JJ. The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(5):253-61.

15. Heiss G, Sharrett AR, Barnes R, Chambless LE, Szklo M, Alzola C. Carotid atherosclerosis measured by B-mode ultrasound in populations: associations with cardiovascular risk factors in the ARIC study. *Am J Epidemiol.* 1991;134(3):250-256.
16. Bots ML, Hofman A, De Jong PT, Grobbee DE. Common carotid intima-media thickness as an indicator of atherosclerosis at other sites of the carotid artery. The Rotterdam study. *Ann Epidemiol.* 1996;6(2):147-53.
17. Kumeda Y, Inaba M, Goto H, Nagata M, Henmi Y, Furumitsu Y, et al. Increased thickness of the arterial intima-media detected by ultrasonography in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(6):1489-97.
18. Park YB, Ahn CW, Choi HK, Lee SH, In BH, Lee HC, et al. Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: morphologic evidence obtained by carotid ultrasound. *Arthritis Rheum.* 2002;46(7):1714-19.
19. Alkaabi JK, Ho M, Levison R, Pullar T, Belch JJ. Rheumatoid arthritis and macrovascular disease. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42(2):292-7.
20. Mäki-Petäjä KM, Cheriyan J, Booth AD, Hall FC, Brown J, Wallace SM, et al. Inducible nitric oxide synthase is increased in patients with rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction. *Int J Cardiol.* 2008;129(3):399-405.
21. Yki-Järvinen H, Bergholm R, Leirisalo-Repo M. Increased inflammatory activity parallels increased basal nitric oxide production and blunted response to nitric oxide in vivo rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(7):630-4.
22. 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(10):1637-41.
23. 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.
24. 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.
25. Alkaitis MS, Crabtree MJ. Recoupling the cardiac nitric oxide synthases: tetrahydrobiopterin synthesis and recycling. *Curr Heart Fail Rep.* 2012;9(3):200-210.
26. Oliver SJ, Brahn E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. *J Rheumatol Suppl.* 1996;44:56-60.

27. Bendele A, McComb J, Gould T, McAbee T, Senello G, Chlipala E, et al. Animal models of arthritis: relevance to human disease. *Toxicol Pathol.* 1999;27(1):134-42.
28. Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Interact.* 2001;1(4):377-85.
29. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(11):1505–15.
30. Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MV. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir Bras.* 2005;20(Suppl 2):28-34.
31. Fontaine J, Herchuelz A, Famaey JP. A pharmacological analysis of the responses of isolated aorta from rats with adjuvant arthritis. *Agents Actions.* 1984;14(5-6):684-7.
32. Cinar 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.
33. Fang ZY, Fontaine J, Unger P, Berkenboom G. Alterations of the endothelial function of isolated aortae in rats with adjuvant arthritis. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1991;311:122-30.
34. Nozaki K, Goto H, Nakagawa T, Hikiami H, Koizumi K, Shibahara N, et al. Effects of keishibukuryogan on vascular function in adjuvant-induced arthritis rats. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(6):1042-7.
35. 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(5):1319-28.
36. Prati C, Berthelot A, Wendling D, Demougeot C. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: up-regulation of the vascular arginase pathway. *Arthritis Rheum.* 2011;63(8):2309-17.
37. Can C, Cinar MG, 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):401-10.
38. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med.* 1977;146(3):857-68.
39. Wooley PH, Lutran HS, Stewart J, David CS. Collagen arthritis in mice: an MHC linked disease. *Fed Pro.* 1981;40:971.

40. Brunsberg U, Gustafsson K, Jansson L, Michaëlsson E, Ahrlund-Richter L, Pettersson S, et al. Expression of a transgenic class II Ab gene confers susceptibility to collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol.* 1994;24(7):1698-702.
41. Holmdahl R, Bailey C, Enander I, Mayer R, Klareskog L, Moran T, et al. Origin of the autoreactive anti-type II collagen response II specificities, Ab isotypes and usage of V gene families of anti-type II collagen B cells. *J Immunol.* 1989;142(6):1881-6.
42. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol.* 1998;111(3):521-6.
43. Bukhardt H, Holmdahl R, Deutzmann R, Wiedemann H, von der Mark H, Goodman S, et al. Identification of a major antigenic epitope on CNBr-fragment 11 of type II collagen recognized by murine autoreactive B cells. *Eur J Immunol.* 1991;21(1):49-54.
44. Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol.* 1992;148(7):2103-8.
45. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1269-75.
46. 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.
47. 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):505-14.
48. Brenner M, Gulko PS. The arthritis severity locus *Cia5a* regulates the expression of inflammatory mediators including Syk pathway genes and proteases in pristane-induced arthritis. *Genomics.* 2012;13:710.
49. Vingsbo C, Jonsson R, Holmdahl R. Avidine-induced arthritis in rats; a T cell-dependent chronic disease influenced both by MHC genes and by non-MHC genes. *Clin Exp Immunol.* 1995;99(3):359-63.
50. Rivera A, Yáñez A, León-Tello G, Gil C, Giono S, Barba E, et al. Experimental arthritis induced by a clinical mycoplasma fermentans isolate. *BMC Musculoskelet Disord (Online).* 2002;3(15).
51. Schalwijk J, van den Berg WB, van de Putte LB, Joosten LA, van der Sluis M. Effects of experimental joint inflammation on bone marrow and periarticular bone. A study of two types of arthritis, using variable degrees of inflammation. *Br J Ex Pathol.* 1985;66(4):435-44.

52. Xavier CA. Efeito do Fucoidam de *Fucus vesiculosos* em um modelo experimental de artrite reumatóide [dissertação na internet]. Natal (RN): Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2005. 83 p. [citado em: 4 jul 2011]. Disponível em: <http://repositorio.ufrn.br:8080/jspui/bitstream/1/7717/1/CarolineACX.pdf>
53. Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*. 1983 Mar;52(3):352-7.
54. McKune CM, Watts SW. Characterization of the serotonin receptor mediating contraction in the mouse thoracic aorta and signal pathway coupling. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;297(1):88-95.
55. Cacanyiova S, Dovinova I, Kristek F. The role of oxidative stress in acetylcholine-induced relaxation of endothelium-denuded arteries. *J Physiol Pharmacol*. 2013;64(2):241-7.
56. Kamata K, Kojima S. Characteristics of contractile responses of aorta to norepinephrine in db/db mice. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1997;96(3):319-28.
57. Kanie N, Kamata K. Contractile responses in spontaneously diabetic mice. I. Involvement of superoxide anion in enhanced contractile response of aorta to norepinephrine in C57BL/KsJ(db/db) mice. *Gen Pharmacol*. 2000;35(6):311-8.
58. Tolosa EM, Rodrigues CJ, Behner OA, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2a ed. Barueri: Manole; 2003.
59. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6.
60. Gurpinar T, Gok S. Vasodilator effects of cromakalim and HA 1077 in diabetic rat aorta. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13558.
61. El-Awady MS, Smirnov SV, Watson ML. Desensitization of the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway by lipopolysaccharide in rat isolated pulmonary artery but not aorta. *Br J Pharmacol*. 2008;155(8):1164-73.
62. Fang XD, Yang F, Zhu L, Shen YL, Wang LL, Chen YY. Curcumin ameliorates high glucose-induced acute vascular endothelial dysfunction in rat thoracic aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(12):1177-82.
63. Guerrero F, Thioub S, Goanvec C, Theunissen S, Feray A, Balestra C, Mansourati J. Effect of tetrahydrobiopterin and exercise training on endothelium-dependent vasorelaxation in SHR. *J Physiol Biochem*. 2013;69(2):277-87.
64. 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.

65. Teixeira VO, Filippini LI, Xavier RM. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(2):247-59.
66. Gerli R, Schillaci G, Giordano A, Bocci EB, Bistoni O, Vaudo G, et al. CD4+CD28- T lymphocytes contribute to early atherosclerotic damage in rheumatoid arthritis patients. *Circulation.* 2004;109(22):2744-8.
67. Nishioku T, Yamauchi A, Takata F, Watanabe T, Furusho K, Shuto H, et al. Disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritic mice. *Neurosci Lett.* 2010;482(3):208-11.
68. Nishioku T, Furusho K, Tomita A, Ohishi H, Dohgu S, Shuto H, et al. Potential role for S100A4 in the disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritic mice, an animal model of rheumatoid arthritis. *Neuroscience.* 2011;189:286-92.
69. Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, Manohar BM, Lokanadam B, Puvanakrishnan R. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(10):1967-80.
70. Nirmala C, Puvanakrishnan R. Effect of curcumin on certain lysosomal hydrolases in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Biochem Pharmacol.* 1996;51(1):47-51.
71. Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC. Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res.* 1980;71:632-4.
72. Banerjee M, Tripathi LM, Srivastava VM, Puri A, Shukla R. Modulation of inflammatory mediators by ibuprofen and curcumin treatment during chronic inflammation in rat. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2003;25(2):213-24.
73. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1 and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res.* 2003;288(1):208-17.
74. Park C, Moon DO, Choi IW, Choi BT, Nam TJ, Rhu CH, et al. Curcumin induces apoptosis and inhibits prostaglandin E(2) production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med.* 2007;20(3):365-72.
75. Huang TS, Lee SC, Lin JK. Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(12):5292-6.
76. Chen YR, Tan TH. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by curcumin. *Oncogene.* 1998;17(2):173-8.
77. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B is suppressed by curcumin (diferulolylmethane). *J Biol Chem.* 1995;270(42):24995-5000.

78. Brennan P, O'Neill LA. Inhibition of nuclear factor kappaB by direct modification in whole cells--mechanism of action of nordihydroguaiaritic acid, curcumin and thiol modifiers. *Biochem Pharmacol.* 1998;55(7):965-73.
79. Togari A, Arai M, Mogi M, Kondo A, Nagatsu T. Coexpression of GTP cyclohydrolase I and inducible nitric oxide synthase mRNAs in mouse osteoblastic cells activated by proinflammatory cytokines. *FEBS Lett.* 1998;428(3):212-16.
80. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem.* 2005;38(11):981-6.
81. Sharma SL, Shobha AC, Desai D, Mewada H, Singh A. Non-enzymatic antioxidants, malondialdehyde, and total antioxidant activity as markers of oxidative-stress in arthritis and rheumatoid arthritis. *NHL Journal of Medical Sciences.* 2013;2(1):57-60.
82. Firuzi O, Fuksa L, Spadaro C, Bousová I, Riccieri V, Spadaro A, et al. Oxidative stress parameters in different systemic rheumatic diseases. *J Pharm Pharmacol.* 2006;58(7):951-7.

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE A**  
**Fixador de Karnovsky (modificado)**

- Preparar somente o necessário. Armazenar em geladeira por até dois dias ou estocar congelado no freezer.

TAMPÃO FOSFATO DE SORENSEN

Solução A ..... 28 mL

Solução B ..... 72 mL

SOLUÇÃO A (0,2 M)

Fosfato monossódico ..... 53,60 g

Água destilada q.s.p. .... 1000 mL

SOLUÇÃO B (0,2 M)

Fosfato dissódico..... 27,80 g

Água destilada q.s.p. .... 1000 mL

**APÊNDICE B**  
**Solução descalcificante**

Cloreto de sódio .....	2,16 g
Ácido acético .....	30 mL
Formaldeído .....	30 mL
Água destilada .....	240 mL

- Trocar solução descalcificante das amostras semanalmente.

**APÊNDICE C**  
**Inclusão em resina**

- 1) Fixar o material em Karnovsky por um período mínimo de 24 horas;
- 2) Acondicionar em álcool 70% por um período mínimo de 24 horas. É aconselhável a troca desta solução a cada 4 horas;
- 3) Desidratar em álcool 95 % por 4 horas;
- 4) Infiltrar em resina + álcool (95%) por 4 horas;
- 5) Infiltrar em resina por 12 horas ou *overnight*;
- 6) Inclusão em resina

ÁLCOOL 70%

Álcool absoluto .....	70 mL
Água destilada .....	30 mL

ÁLCOOL 95 %

Álcool absoluto .....	95 mL
Água destilada .....	5 mL

RESINA DE INCLUSÃO

Historesin activator .....	0,5 g ou 1 pacote
Historesina (Leica Historesin – Basic Resin).....	50 mL

**APÊNDICE D**  
**Hematoxilina-Eosina (resina)**

- 1) Tirar os cortes da estufa e acondiciona-los em cuba para coloração;
- 2) Lavar os cortes em água filtrada;
- 3) Hematoxilina de Harris por 20 minutos;
- 4) Lavar em água corrente por 10 minutos;
- 5) Álcool 90% por 30 segundos;
- 6) Eosina por 15 minutos;
- 7) Lavar algumas vezes com água filtrada até retirar o excesso de corante;
- 8) Álcool 90% por 30 segundos;
- 9) Álcool absoluto I por 30 segundos;
- 10) Álcool absoluto II por 30 segundos;
- 11) Álcool absoluto III por 30 segundos;
- 12) Álcool + xilol por 30 segundos;
- 13) Xilol I por 30 segundos;
- 14) Xilol II por 30 segundos;
- 15) Xilol III
- 16) Montar em permount

**HEMATOXILINA DE HARRIS – SOLUÇÃO ESTOQUE**

Hematoxilina .....	10 g
Óxido de mercúrio .....	5 g
Sulfato de alumínio e potássio .....	200 g
Água destilada .....	1900 mL
Álcool absoluto .....	100 mL

**Técnica:**

- 1) Dissolver a hematoxilina em álcool absoluto;
- 2) Dissolver o sulfato de alumínio e potássio em água quente;
- 3) Juntar a hematoxilina já dissolvida no sulfato em água quente;
- 4) Aquecer a solução rapidamente;

5) Colocar o óxido de mercúrio lentamente.

Observação: Para simplificar a solução basta deixar a hematoxilina no álcool absoluto por aproximadamente 15 dias antes de preparar o corante. Depois de pronta, deixa-la na estufa a 58 °C por 24 horas. Adicionar 4 g de timol para cada 1000 mL.

#### HEMATOXILINA – SOLUÇÃO DE USO

Solução estoque de hematoxilina..... 200 mL  
 Ácido acético..... 4 mL

#### EOSINA – SOLUÇÃO ESTOQUE

##### SOLUÇÃO ESTOQUE EOSINA 1%

Eosina ..... 1 g  
 Água destilada..... 100 mL

##### SOLUÇÃO ESTOQUE FLOXINA B 1%

Floxina B..... 1 g  
 Água destilada..... 100 mL

#### EOSINA – SOLUÇÃO DE USO

Eosina 1%..... 100 mL  
 Floxina B 1%..... 10 mL  
 Álcool 95%..... 780 mL  
 Ácido acético..... 4 mL

**APÊNDICE E**  
**Azul de toluidina**

- 1) Tirar os cortes da estufa e acondiciona-los em cuba para coloração;
- 2) Lavar os cortes em água filtrada;
- 3) Azul de toluidina 1% (Ph 4,0) por 15 minutos
- 4) Lavar algumas vezes com água filtrada até retirar o excesso de corante;
- 5) Álcool 90% por 30 segundos;
- 6) Álcool absoluto I por 30 segundos;
- 7) Álcool absoluto II por 30 segundos;
- 8) Álcool absoluto III por 30 segundos;
- 9) Álcool + xilol por 30 segundos;
- 10) Xilol I por 30 segundos;
- 11) Xilol II por 30 segundos;
- 12) Xilol III
- 13) Montar em permount.

AZUL DE TOLUIDINA 1%

Azul de toluidina .....	1 g
Tampão McIlvaine.....	100 mL

TAMPÃO MCLLVINE pH 4,0

Solução A.....	38,50 mL
Solução B.....	61,50 mL

- Corrigir pH do tampão se necessário.

SOLUÇÃO A

Fosfato dissódico .....	28,396 g
Água destilada.....	1000 mL

## SOLUÇÃO B

Ácido cítrico ..... 19,212 g

Água destilada..... 1000 mL

## APÊNDICE F

### Masson

- 1) Tirar os cortes da estufa e acondiciona-los em cuba para coloração;
- 2) Lavar os cortes com álcool 90%;
- 3) Hematoxilina de Harris por 15 minutos
- 4) Lavar em água corrente por 10 minutos;
- 5) Solução Masson por 30 minutos;
- 6) Três trocas em água acidificada 0,2%;
- 7) Diferenciar em solução AFO por 2 minutos;
- 8) Três trocas em água acidificada 0,2%;
- 9) Verde luz por 5 minutos;
- 10) Água acidificada por 5 minutos
- 11) Álcool 90% por 30 segundos;
- 12) Álcool absoluto I por 30 segundos;
- 13) Álcool absoluto II por 30 segundos;
- 14) Álcool absoluto III por 30 segundos;
- 15) Álcool + xilol por 30 segundos;
- 16) Xilol I por 30 segundos;
- 17) Xilol II por 30 segundos;
- 18) Xilol III
- 19) Montar em permount.

#### MASSON – SOLUÇÃO ESTOQUE

Ponceau de xilidina ou azul de anilina.....	2 g
Fucsina ácida.....	1 g
Orange G .....	2 g
Ácido acético.....	0,2 mL
Água destilada.....	100 mL

#### MASSON – SOLUÇÃO DE USO

Solução Masson estoque.....	10 mL
Ácido acético 0,2 %.....	90 mL

ÁGUA ACIDIFICADA 0,2%

Ácido acético.....	2 mL
Água destilada.....	1000 mL

SOLUÇÃO AFO

Ácido fosfomolibdico.....	5 g
Ácido fosfotúngstico.....	5 g
Água destilada.....	200 mL

VERDE LUZ

Verde luz.....	1 g
Água destilada.....	100 mL

## APÊNDICE G

### Solução nutritiva Krebs-Henseleit (modificado)

Para preparo de 1L de solução nutritiva de Krebs-Henseleit (Modificado)

- 1) Pesar todos os sais, exceto o  $\text{CaCl}_2$ ;
- 2) Juntar todos os sais, previamente pesados, em balão volumétrico de 1L
- 3) Completar volume aproximado ao que se deseja com água destilada;
- 4) Homogeneizar no agitador magnético;
- 5) Pesar  $\text{CaCl}_2$ ;
- 6) Completar com água destilada balão volumétrico de 1L até marcação;
- 7) Homogeneizar no agitador magnético;
- 8) Medir pH: ideal 7,4
  - se estiver acima corrigir com solução de HCl 1M
  - se estiver abaixo corrigir com solução de NaOH 1M

Sais	Peso (g)	Molaridade ( $\mu\text{M}$ )
NaCl	7,61	130
KCl	0,35	4,7
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,16	1,18
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25	1,17
$\text{NaHCO}_3$	1,25	14,9
$\text{CaCl}_2$	0,18	1,6
Glicose	2,00	11,1