
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISILOGIA E FARMACOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**EFEITO DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA ARTRITE
EXPERIMENTAL**

KÁTIA DANIELA DA SILVEIRA

BELO HORIZONTE, 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Kátia Daniela da Silveira

**EFEITO DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO
SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NA ARTRITE
EXPERIMENTAL**

*Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia do
Departamento de Fisiologia e Biofísica do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requerimento para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Biológicas com ênfase em Fisiologia e Farmacologia*

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Coorientadora: Prof. Dra. Ana Cristina Simões e Silva

BELO HORIZONTE, 2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Mauro Martins Teixeira e à minha co-orientadora Ana Cristina Simões e Silva pelos ensinamentos, disponibilidade, atenção, confiança e investimento.

Ao prof. Robson A S. Santos, profa. Rosa Arantes, profa. Tarcília A Silva, profa. Lirlândia Sousa e profa. Daniela Sachs por colaborarem de forma decisiva nos trabalhos realizados durante o doutorado.

Aos colegas de trabalho: Fernanda Matos Coelho e Angélica Thomaz Vieira pela imprescindível ajuda para execução dos experimentos ou discussões relacionadas com esta tese.

Aos colegas do grupo da Imunofarmacologia Renal - amada renal - Cristiano Xavier e Livia Barroso por todo apoio, amizade e excelente convivência em grupo.

Aos demais professores do grupo Imunofarmacologia: queridos: Antônio, Adaliene, Dani, Lucíola, Vanessa e Milene pelo apoio e amizade.

Aos amigos do LILARJ pela grande amizade, pelas discussões científicas e filosóficas sempre regadas de boas gargalhadas e excelente degustações: Angel, Caio, Dani Cisalpino, Livinha. E também à Lu e Ju, claro.

Aos colegas do laboratório de Imunofarmacologia, essa família gigante que não para de crescer: Queridos Remo, Cristiana (Cris), Flávio, Flopes, Rodrigo, Marina, Marcinha, David, Aline, Rafael Elisão, Fernando, Celso, Zélia, Thiago, Thales, Raquel, Andréa, Débora, Ciça, Thiago IC, Bárbara, Luciana e todos demais ICs. E também à Valdinéria (Valzinha) e Ilma pelo ótimo convívio e constante auxílio.

Aos professores e funcionários do departamento de Fisiologia e Biofísica e Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, em especial a querida Celinha e Adelina que tanto admiro e respeito. Aos colegas do departamento, em especial aos queridos amigos Lúcio Diniz, Priscila Silveira, Roseli Martins e Eder Moraes.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À família pelo apoio e compreensão de sempre.

Ao querido Januário por ser mais que um grande marido, por participar ativamente e apoiar minha vida profissional, por compartilhar das minhas realidades e sonhos e ajudar a ambos terem mais sentido.

A Deus, por razões que dispensam explicações.

RESUMO

A artrite reumatóide é uma doença crônica que acomete principalmente a membrana sinovial, cartilagens e ossos. Afeta cerca de 1% da população e está associada a altas taxas de mortalidade e morbidade. É uma doença inflamatória, complexa, cuja patogênese ainda é pouco esclarecida. Diversas células, mediadores inflamatórios e moléculas estão envolvidas no desenvolvimento da doença. Os tratamentos são limitados, apresentam importantes efeitos adversos e elevados custos. Devido a esses fatores, vários estudos têm buscado novos agentes terapêuticos para o tratamento da artrite.

O sistema renina-angiotensina (SRA) exerce vários efeitos além do controle de pressão arterial e balanço eletrolítico. Existem evidências de que a Angiotensina II (Ang II) estimula várias respostas pró-inflamatórias, incluindo o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e acúmulo de neutrófilos em alguns processos inflamatórios. Entretanto, o papel da ativação do receptor angiotensinérgico do tipo 1 (AT₁) no contexto inflamatório é pouco conhecido. Outro importante alvo de interesse é o eixo denominado contrarregulador do SRA, formado por enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) – Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] – receptor Mas. A ativação desse eixo promove em geral efeitos opostos àqueles decorrentes da ativação do receptor AT₁ pela Ang II, inclusive em processos inflamatórios. Assim, neste estudo, foi utilizado um antagonista do receptor de AT₁ e agonistas do receptor Mas para investigar o efeito e os mecanismos pelo quais essas intervenções farmacológicas no SRA poderiam interferir com as respostas inflamatórias presentes em dois modelos murinos de artrite.

Primeiro, foi avaliado o efeito do bloqueio do eixo clássico do SRA (ECA – Ang II - AT₁), utilizando-se o composto Losartan, antagonista de receptores AT₁, em dois modelos de artrite em murinos. Camundongos C57B/6 foram submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA) e tratados com Losartan (1, 3 e 10 mg/kg) ou veículo (NaCl 0,9%). Ratas Holtzman também foram avaliadas após indução de artrite por adjuvante (AdIA), e tratadas com Losartan (10 mg/kg) do 10^o ao 16^o dia após a indução. Os seguintes parâmetros foram avaliados em ambos os modelos: acúmulo intra-articular de neutrófilos, concentração de citocinas teciduais (TNF- α Il-1 β , CXCL1/CINC) e alterações histológicas. Os níveis de pressão arterial sistólica, hipernociceção e interações leucócito-endoteliais foram avaliados apenas no modelo de AIA, e edema periarticular foi avaliado apenas no modelo de AdIA.

Em seguida, foi avaliado o efeito da ativação do eixo contrarregulatório ECA2 – Ang-(1-7) – Mas, através da utilização do composto AVE 0991 (1, 3 ou 10 mg/kg), agonista do receptor Mas de Ang-(1-7), ou da própria Ang-(1-7) (2 mg/kg) nos mesmos modelos murinos de artrite. A presença do receptor Mas nos tecidos periarticulares de camundongos foi avaliada por Western Blot. Além disso, a indução da artrite por mBSA (AIA) foi realizada em animais com deleção genética do receptor Mas (C57Bl/6 Mas^{-/-}) para avaliação da resposta inflamatória em comparação com os tipos selvagens (C57Bl/6 Mas^{+/+}). Os parâmetros descritos anteriormente também foram analisados.

Tanto o bloqueio do receptor AT₁ quanto a ativação do receptor Mas, apresentaram efeitos anti-inflamatórios na artrite experimental. Nos camundongos com AIA, o tratamento com Losartan, AVE 0991 ou Ang-(1-7) reduziram o recrutamento de neutrófilos, a hipernociceção e a produção de TNF- α e CXCL1. Apenas AVE 0991 e Ang-(1-7) foram capazes de reduzir a concentração de IL-1 β nos tecidos periarticulares dos camundongos.

As análises histopatológicas mostraram significativa redução da inflamação e dano tecidual nos animais tratados. Os mecanismos pelos quais o bloqueio dos receptores AT₁ e a ativação dos receptores Mas promoveram melhora da artrite, foram devidos à redução do rolamento e adesão leucocitária ao tecido articular, bem como à diminuição da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. A deleção genética do receptor Mas agravou a inflamação decorrente da AIA, conforme verificado pelo aumento do número de neutrófilos e da produção de citocinas TNF- α e IL-1 β . No modelo de AdIA, tanto o tratamento com Losartan quanto com AVE 0991 reduziram o edema articular, o influxo de neutrófilos, os danos articulares/histopatológicos e a produção de IL-1 β e CXCL1.

Em conclusão, este estudo mostra que o SRA também atua de forma bidirecional no contexto inflamatório da artrite – Ang II tem atividade pró-inflamatória e Ang-(1-7)/Mas tem atividade anti-inflamatória. Do ponto de vista do mecanismo de ação, o bloqueio de AT₁ ou ativação de Mas reduz a síntese de citocinas e impede a adesão e o recrutamento dos leucócitos. É possível que estas estratégias tenham efeito terapêutico benéfico em pacientes com artrite.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that mainly targets the synovial membrane, cartilage and bone. It affects 1% of the population and is associated with significant morbidity and increased mortality. It is an inflammatory disease and its pathogenesis is complex and not completely understood. Several cell types, mediators and molecules are involved in the inflammatory process of RA. The treatments are limited, associated to adverse effects and with high cost. Therefore, there is medical for novel therapies to treat rheumatoid arthritis.

The renin-angiotensin system (RAS) extends far beyond blood pressure control and electrolyte balance. There are evidences that Angiotensin II (Ang II) stimulates several pro-inflammatory responses, including up-regulation of pro-inflammatory cytokines and neutrophil accumulation in some inflammatory diseases. However, the role of the AT₁ receptor activation on the inflammatory context of the arthritis is poorly known. Another important target of recent studies is the new counterregulatory axis of the RAS formed by angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) – Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] – receptor Mas. The activation of this axis generally produces effects which are opposite to those of the activation of AT₁ receptor by Ang II, including in inflammatory processes. Therefore, in this study, we used an AT₁ receptor antagonist (Losartan) and Mas receptor agonists to investigate the mechanisms by which pharmacological interventions in the RAS could interfere with inflammatory responses in murine models of arthritis.

First, we evaluated the blockade of the classical axis of RAS (ACE – Ang II – AT₁), by the administration of Losartan, an AT₁ antagonist. Male C57BL/6 mice were subjected to antigen-induced arthritis (AIA) and were treated with Losartan (1, 3 and 10 mg/kg), or vehicle (NaCl 0.9%). Female Holtzman rats were subjected to adjuvant-induced arthritis (AdIA) and treated with Losartan (10 mg/kg) daily from day 10 to 16 after induction. The following parameters were evaluated in both arthritis models: neutrophil accumulation, cytokines, systolic blood pressure, and histopathological changes. The hypernociception and leukocyte-endothelium interaction were assessed only in AIA mice and paw edema only AdIA rats.

Second, we evaluated the effect of the ACE2 – Ang-(1-7) – Mas axis activation, by the administration of Mas receptor agonists: AVE 0991 (1, 3 and 10 mg/kg) or Ang-(1-7) (2 mg/kg). The presence of Mas receptor in periarticular tissues was detected by Western Blot analyses. The same AIA protocol was also carried out in mice with genetic deletion of receptor (Mas^{-/-}) and in the correspondent wild type, Mas^{+/+} C57Bl/6 mice. The same above-mentioned parameters were analyzed.

Both RAS pharmacological interventions, i.e. blockade of AT₁ receptor and stimulation of receptor Mas, showed an anti-inflammatory effect in arthritis models. In AIA mice, treatment with Losartan, AVE 0991 or Ang-(1-7) decreased neutrophil recruitment, hypernociception, production of TNF- α and CXCL1. Only AVE 0991 and Ang-(1-7) reduced IL-1 β levels in periarticular tissues of AIA mice. Histopathological analysis showed significant reduction of inflammation. Mechanistically, Losartan and AVE 0991 reduced leukocyte rolling and adhesion as well diminished pro-inflammatory cytokine production, even when given after antigen challenge. Mas^{-/-} mice subjected to AIA developed more pronounced inflammation, as observed by greater neutrophil recruitment and cytokine release (TNF- α e IL-1 β). In AdIA rats, treatment with Losartan and AVE 0991 decreased articular edema, neutrophil influx, histopathological score and production of IL-1 β and CXCL1.

In conclusion, this study showed that the RAS also operates as a bidirectional system in the context of arthritis, in which its two main axes counter-regulate each other. This study

also showed additional anti-inflammatory effects due to AT₁ receptor blockade. Furthermore, the activation of the Mas receptor produced significant amelioration of arthritis in mice and rats. Both approaches (AT₁ blockade and Mas activation) proposed in this study might represent novel therapeutic opportunities for arthritis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS - INTRODUÇÃO

FIGURA 1 RECRUTAMENTO LEUCOCITÁRIO: ROLAMENTO, ADESÃO E TRANSMIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA. ADAPTADO DE LEY K ET AL (207). NATURE.....	19
FIGURA 2 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ARTICULAÇÃO SINOVIAL DURANTE A ARTRITE.	25
FIGURA 3 VISÃO ATUAL DA CASCATA DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	32
FIGURA 4 POTENCIAIS MECANISMOS PELOS QUAIS ANG II INDUZ A INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.....	39

FIGURAS - METODOLOGIA

FIGURA 5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (MBSA) EM CAMUNDONGOS.....	46
FIGURA 6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (<i>M. BUTIRICUM</i>) EM RATOS.....	47
FIGURA 7 FOTO DO EQUIPAMENTO UTILIZADO NO TESTE DE PRESSÃO CRESCENTE NA PATA DE CAMUNDONGO.	54
FIGURA 8 FOTO NO MOMENTO DO TESTE DE PRESSÃO CRESCENTE NA PATA DE CAMUNDONGO.	54
FIGURA 9 PLETISMOGRAFIA DE CAUDA PARA MENSURAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA DE CAMUNDONGOS.	56
FIGURA 10 FOTO DA MICROSCOPIA INTRAVITAL DA MICROVASCULATURA DO JOELHO.....	58

FIGURAS - RESULTADOS

FIGURA 11. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).....	61
FIGURA 12. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS TECIDUAIS EM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA)..	62
FIGURA 13 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN SOBRE A PERDA DE PROTEOGLICANOS NAS ARTICULAÇÕES DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA)..	63
FIGURA 14 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN SOBRE A HISOLOGIA DAS ARTICULAÇÕES DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).	64
FIGURA 15. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN SOBRE O LIMIAR DE HIPERNOCICEPÇÃO E NÍVEIS DE PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).	65
FIGURA 16. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN SOBRE A INTERAÇÃO LEUCÓCITO-ENDOTÉLIO NA MICROVASCULATURA SINOVIAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).	67
FIGURA 17 EFEITO DO TRATAMENTO COM LOSARTAN SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS TECIDUAIS PERI-ARTICULARES DE RATAS SUBMETIDAS A ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (<i>ADIA</i>).....	68

FIGURA 18. EFEITO DO TRATAMENTO COM LOSARTAN SOBRE O PERFIL HISTOPATOLÓGICO DAS ARTICULAÇÕES DE RATAS SUBMETIDAS À ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (ADIA).....	70
FIGURA 19 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LOSARTAN SOBRE A PERDA DE PROTEOGLICANOS NAS ARTICULAÇÕES DE RATOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (ADIA).....	71
FIGURA 20 EXPRESSÃO DO RECEPTOR MAS NO TECIDO PERI-ARTICULAR DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).....	72
FIGURA 21 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE AGONISTAS DO RECEPTOR MAS SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).....	73
FIGURA 22 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE AGONISTAS DO RECEPTOR MAS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS TECIDUAIS EM UM MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).	74
FIGURA 23 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE AGONISTA DO RECEPTOR MAS, AVE 0991, SOBRE O PERFIL HISTOPATOLÓGICO DAS ARTICULAÇÕES DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).	75
FIGURA 24 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE AGONISTAS DO RECEPTOR MAS SOBRE O LIMIAR DE HIPERNOCICEPÇÃO E NÍVEIS DE PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).....	77
FIGURA 25 ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA) EM CAMUNDONGOS COM DELEÇÃO GÊNICA DO RECEPTOR MAS DE ANG-(1-7).....	79
FIGURA 26. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO AGONISTA DO RECEPTOR MAS, AVE 0991, SOBRE A INTERAÇÃO LEUCÓCITO-ENDOTÉLIO NA MICROVASCULATURA SINOVIAL DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO (AIA).	81
FIGURA 27 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGONISTA DO RECEPTOR MAS, AVE 0991, SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS, CONCENTRAÇÃO DE CITOCINAS E EDEMA TECIDUAIS PERIARTICULARES DE RATAS SUBMETIDAS A ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (ADIA).....	83
FIGURA 28 EFEITO DO TRATAMENTO COM AGONISTA DO RECEPTOR MAS, AVE 0991, SOBRE O PERFIL HISTOPATOLÓGICO DAS ARTICULAÇÕES DE RATAS SUBMETIDAS À ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (ADIA).....	84

FIGURAS - DISCUSSÃO

FIGURA 29 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PRINCIPAIS RESULTADOS OBSERVADOS NO ESTUDO DO EFEITO DA MODULAÇÃO FARMACOLÓGICA DO SRA NA ARTRITE EXPERIMENTAL.	85
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

A779	Antagonista do Receptor Mas da Angiotensina-(1-7)
AdIA	Artrite Induzida por Adjuvante
AIA	Artrite Induzida por Antígeno
ANOVA	Análise de Variância
Ang	Angiotensina
AR	Artrite Reumatóide
ARBs	Antagonistas de Receptores do Tipo 1 de Angiotensina II
AT ₁	Receptor Angiotensinérgico do Tipo 1
AT ₂	Receptor Angiotensinérgico do Tipo 2
ATPase	Enzima que hidrolisa a adenosina trifosfato
AVE 0991	Agonista do Receptor Mas de Angiotensina-(1-7)
BSA	Albumina Sérica Bovina
C	Determinada Família de Quimiocinas
C57Bl/6	Linhagem de Camundongos
CAMs	Moléculas de Adesão de Células Endoteliais
CC	Determinada Família de Quimiocinas
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CHO	Células Ovarianas de Hamster Chinês
CIA	Artrite Induzida por Colágeno
CT	Controle
CV11974	Antagonista de Receptor AT ₁ de Angiotensina
CVLM	Região Ventrolateral Caudal da Medula
CXC	Quimiocina

CX3C	Determinada Família de Quimiocinas
CXCL1 / CINC-1	Proteína Químioatraente de Neutrófilos
CXCR	Receptor de Quimiocina do tipo CXC
DMARD	Drogas Anti-Reumáticas Modificadoras da Doença
DCV	Doenças Cardiovasculares
D-Pro7-Ang-(1-7)	Antagonista do Receptor de Ang-(1-7)
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
ECA2	Enzima Conversora da Angiotensina 2
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EPM	Erro Padrão da Média
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio/Água Oxigenada
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina e Eosina
HETAB	Brometo de Hexadecil-trimetil-amônio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICC	Insuficiência Cardíaca Congestiva
iECA	Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina
i.d.	Intradérmica
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
INF-γ	Interferon Gama
i.p.	Intraperitoneal
kDa	Quilodaltons

KOH	Hidróxido de Potássio
LOS	Losartan
<i>M. butiricum</i>	<i>Micobacterium butiricum</i>
Mas	Receptor da Angiotensina-(1-7) acoplado à proteína G
Mas ^{-/-}	Camundongos com deleção genética do receptor Mas
Mas ^{+/+}	Camundongos com presença do receptor Mas, tipo selvagem
mBSA	Albumina Bovina Metilada
MPO	Mieloperoxidase
MPP	Metaloproteinases
Na ₃ PO ₄	Fosfato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH (NOX2)	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P
NaF	Fluoreto de Sódio
NF-κβ	Fator de Transcrição Nuclear kapa B
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
NSAIDS	Anti-inflamatórios não-esteroidais
O ₂ ⁻	Superóxido
OPD	Di-hidroclorido de o-fenilenodiamino
PADI4	Enzima deiminase peptidil-arginina 4
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PBS	Tampão Fosfato Salino
PD123391	Antagonista do Receptor AT ₂ de Ang
PGA	Substância Cinza Periaquedutal
PGE2	Prostaglandina E2
PMSF	Fluoreto de Fenilmetisulfonil
RANKL	Receptor Ativador de Ligante do NF-κβ

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TT	Tratados
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VE	Veículo
VS	Versus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 ARTRITE REUMATÓIDE: ASPECTOS GERAIS	16
1.1.1 ARTRITE REUMATÓIDE: MECANISMOS PATOGÊNICOS	17
1.1.1.1 Recrutamento Leucocitário	17
1.1.1.2 Papel dos neutrófilos	19
1.1.1.3 Papel das citocinas pró-inflamatórias	22
1.1.1.4 Dor Inflamatória	26
1.1.2 ARTRITE REUMATÓIDE: ABORDAGEM TERAPÊUTICA	27
1.1.3 ARTRITE REUMATÓIDE E DOENÇAS CARDIOVASCULARES	29
1.2 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA	30
1.2.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA: ASPECTOS GERAIS	30
1.2.2 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: PAPEL DA ANGIOTENSINA-(1-7)	32
1.2.3 MODULAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA	34
1.2.3.1 Antagonistas do receptor AT ₁	34
1.2.3.2 Agonistas do receptor Mas	34
1.2.4 ANG II X ANG-(1-7): PAPEL NA INFLAMAÇÃO	37
1.3 JUSTIFICATIVA	40
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 ANIMAIS	43
3.2 MODELOS MURINO DE INDUÇÃO DE ARTRITE REUMATÓIDE.	43
3.2.1 INDUÇÃO DE ARTRITE POR ANTÍGENO (AIA): IMUNIZAÇÃO E DESAFIO COM ALBUMINA BOVINA METILADA (MBSA)	43
3.2.2 INDUÇÃO DE ARTRITE POR ADJUVANTE (ADIA): IMUNIZAÇÃO E DESAFIO COM MICOBACTERIUM BUTIRICUM	44
3.3 PROTOCOLOS DE TRATAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS:	44
3.3.1 MODELO DE ARTRITE EM CAMUNDONGOS (AIA)	44
3.3.2 MODELO DE ARTRITE EM RATAS (ADIA)	46
3.3.3 PREPARAÇÃO DAS DROGAS:	48
3.4 PARÂMETROS AVALIADOS	48
3.4.1 MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE ARTICULAR	48
3.4.1.1 Contagem total dos leucócitos	49
3.4.1.2 Contagem diferencial dos leucócitos	49
3.4.2. CITOCINAS POR ENSAIO IMUNO-ENZIMÁTICO (ELISA)	49
3.4.3 ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE (MPO)	50
3.4.4 HISTOLOGIA	52

3.4.5 HIPERNOCICEPÇÃO (TESTE DE PRESSÃO CRESCENTE)	53
3.4.6 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	55
3.4.7 INTERAÇÃO LEUCÓCITO-ENDOTÉLIO (MICROSCOPIA INTRAVITAL)	57
3.4.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR MAS DE ANG-(1-7) NO TECIDO PERIARTICULAR DE CAMUNDONGOS POR WESTERN BLOT	58
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4 RESULTADOS	60
4.1 EFEITOS DO BLOQUEIO DO RECEPTOR AT₁ NA ARTRITE EXPERIMENTAL.	60
4.1.1 EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO ANTAGONISTA DE AT ₁ , LOSARTAN EM CAMUNDONGOS COM ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO - AIA.	60
4.1.2 EFEITOS DO BLOQUEIO DO RECEPTOR AT ₁ SOBRE A HIPERALGESIA E PRESSÃO ARTERIAL DOS CAMUNDONGOS COM AIA.	65
4.1.3 MECANISMOS ANTI-INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO BLOQUEIO DO RECEPTOR AT ₁ NA AIA.	66
4.1.4 EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DO ANTAGONISTA DE RECEPTORES AT ₁ , LOSARTAN, EM RATAS COM ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE.	67
4.2- EFEITOS DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR MAS NA ARTRITE EXPERIMENTAL	72
4.2.1 – EXPRESSÃO DO RECEPTOR MAS NO TECIDO PERIARTICULAR	72
4.2.2 – EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DE AGONISTAS DO RECEPTOR MAS EM UM MODELO DE AIA	72
4.2.3- EFEITOS DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR MAS SOBRE A HIPERNOCICEPÇÃO E PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA DE CAMUNDONGOS COM AIA	76
4.2.4- AIA EM CAMUNDONGOS COM DELEÇÃO GÊNICA DO RECEPTOR MAS DE ANG-(1-7)	78
4.2.5- MECANISMOS ANTI-INFLAMATÓRIOS DA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR MAS NA AIA	80
4.2.6- EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DOS AGONISTAS DO RECEPTOR MAS, AVE 0991, EM RATOS SUBMETIDOS À ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE (ADIA).	81
5 DISCUSSÃO	85
6 SUMÁRIO E CONCLUSÃO	92
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite Reumatóide: aspectos gerais

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença que acomete cerca de 0,5 a 1% da população adulta mundial (American College of Rheumatology (2002); Firestein, (2003). Os números no Brasil são similares, atingindo aproximadamente um milhão e oitocentas mil pessoas (Dunlop et al., 2003; Marques Neto, 1993). A AR está diretamente relacionada à dor e à perda de função articular, que são as principais causas de morbidade e fatores limitantes para o trabalho e execução das atividades de vida diária (Alamanos and Drosos, 2005; Minaur et al., 2004). Conseqüentemente, a doença também está associada a uma taxa mortalidade considerável, principalmente em decorrência de eventos cardiovasculares (Gonzalez-Gay et al., 2005; Snow and Mikuls, 2005).

Do ponto de vista clínico, a AR é uma doença inflamatória crônica, poliarticular, que acomete primariamente pequenas articulações diartrodiais, ou seja, constituídas por duas extremidades ósseas adjacentes, recobertas por cartilagem e limitadas por uma membrana sinovial e cápsula articular, presentes nas mãos e nos pés (Firestein, 2003). Em relação à histologia, observa-se inflamação na membrana sinovial e formação de *pannus* (crescimento excessivo de tecido conjuntivo sobre a superfície articular), com invasão e destruição das estruturas articulares (Gravallese et al., 2000; Shiozawa et al., 1983) A cavidade sinovial que, em condições normais, se apresenta como uma estrutura acelular delimitada por uma delicada membrana conjuntiva, torna-se hiperplásica em decorrência de aumento dos sinoviócitos. Esta região intersticial passa a ser preenchida por infiltrado celular, contendo: fibroblastos sinoviais, macrófagos, mastócitos, células T CD4+, CD8+, natural killer (NK), células B e células plasmáticas. O infiltrado sinovial invade a cartilagem adjacente e promove destruição articular, que é mediada por osteoclastos ativados, condrócitos e fibroblastos sinoviais (Gravallese et al., 2000). Além disso, o aumento da expressão de enzimas proteolíticas também contribui para a destruição da articulação por meio da digestão da matriz extracelular (Firestein, 2003; Martel-Pelletier et al., 1994; McInnes and Schett, 2007). A articulação lesada expõe novos sítios antigênicos que promovem a reatividade auto-imune (Firestein, 2003).

Apesar de inúmeros estudos experimentais e clínicos terem sido realizados nos últimos anos, a patogênese da AR ainda permanece obscura. Trata-se de uma doença complexa e multifatorial da qual fazem parte auto-imunidade, inflamação crônica, destruição articular, fatores ambientais e genéticos. Associado à auto-imunidade, observa-se a produção de anticorpos específicos para imunoglobulinas G (IgG), conhecidos como “*fatores reumatóides*” e alguns peptídeos contendo citrulina (Firestein, 2003). Além disso, é expressiva a participação de linfócitos (Th1 e Th17) com sua grande produção de citocinas e quimiocinas (Esensten et al., 2009; Lubberts et al., 2005; Schulze-Koops and Kalden, 2001). Da mesma forma, os linfócitos B produzem várias citocinas, tais como (IL-6, IL-10 e LTB), além de autoanticorpos com conseqüente formação de complexos imunes (Takemura et al., 2001). Alguns *loci* gênicos estão associados com a susceptibilidade e gravidade da AR tais como os alelos HLA-DR4 (van der Helm-van Mil et al., 2005). Várias citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL-1 β , IL-10 e IL-18, também estão envolvidas no processo inflamatório e na lesão articular característicos da AR (Brennan and McInnes, 2008; McInnes and Schett, 2007) Além dos fatores genéticos e imuno-inflamatórios, fatores ambientais também contribuem para a indução, intensidade e progressão da doença, como, por exemplo, o hábito de fumar, que promove a adição do aminoácido citrulina proteínas do organismo, tornando-as antigênicas (Klareskog et al., 2007), o que apresenta um impacto mais significativo em pacientes HLA-DR4 positivos (Klareskog et al., 2007).

1.1.1 Artrite Reumatóide: mecanismos patogênicos

1.1.1.1 Recrutamento Leucocitário

O recrutamento leucocitário para o foco da lesão, ou seja, para as articulações acometidas, é uma das etapas essenciais da resposta inflamatória. Os neutrófilos são os primeiros tipos celulares a chegarem ao sítio de inflamação, (Nathan, 2006), e constituem as células mais abundantes presentes neste local, na presença de artrite (Wipke and Allen, 2001).

O processo de migração dos neutrófilos, bem como os demais leucócitos, inicia-se pelo rolamento seguido de adesão firme do leucócito ao endotélio vascular

e finalmente transmigração. O aumento da aderência entre os leucócitos e o endotélio vascular é mediado pela expressão de um conjunto de proteínas de membrana denominadas coletivamente de moléculas de adesão. Dentre as moléculas envolvidas no rolamento de neutrófilos sobre as células endoteliais, podemos destacar as selectinas (L-, E- e P-selectina) e seus respectivos ligantes (carboidratos). As β 2-integrinas se ligam às moléculas da superfamília das imunoglobulinas, como o VCAM-1, PECAM-1 e ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, mediando a adesão firme e transmigração dos neutrófilos (Zimmerman et al., 1992).

Uma vez aderidos, os neutrófilos ultrapassam a barreira endotelial por aberturas entre as células endoteliais, ou através destas (diapedese e migração transendotelial, respectivamente) e se dirigem ao foco de lesão. A liberação de mediadores quimiotáticos, como a IL-1 β , TNF- α , LTB₄, fator de agregação plaquetário, histamina, C5a (componente do sistema complemento) e quimiocinas (IL-8/CXCL8, por exemplo) (Cotran, 1987; Fricke et al., 1985; Lehrer et al., 1988; Mantovani and Dejana, 1987; McIntyre et al., 1986; McMillan and Foster, 1988) no sítio inflamatório, forma um gradiente de concentração dessas substâncias que é fundamental para o correto direcionamento dos leucócitos para o foco inflamatório.

No local da lesão, os neutrófilos irão desempenhar importantes papéis, dentre eles: 1) a liberação de espécies reativas do oxigênio e produtos lipídicos. 2) liberação de enzimas pré-formadas e proteínas que estavam armazenadas dentro de vesículas e, finalmente, 3) a ativação da transcrição de genes resulta na produção e secreção proteínas pró-inflamatórias, tais como das citocinas (Berton and Lowell, 1999).

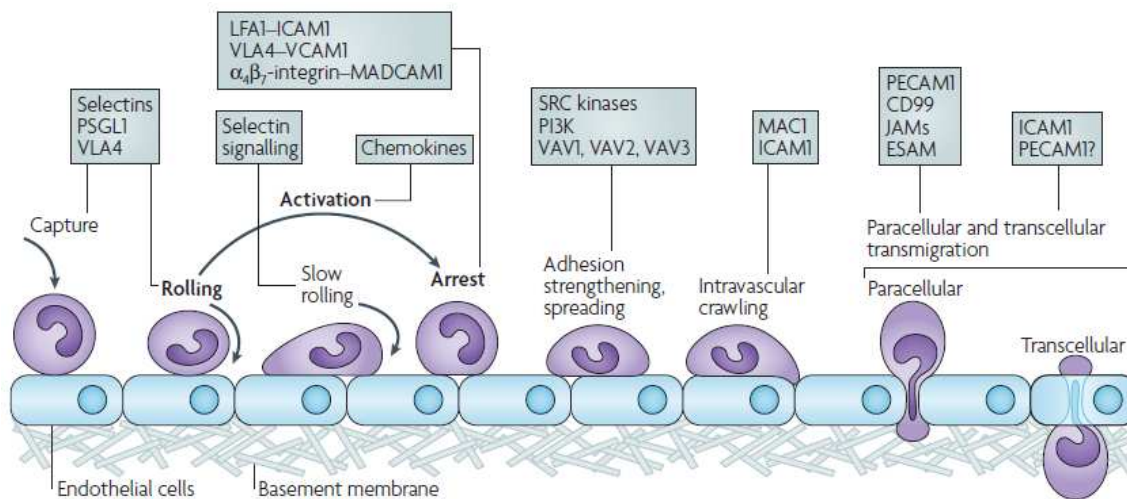


Figura 1 Recrutamento Leucocitário: rolamento, adesão e transmigração leucocitária. Adaptado de Ley K et al (2007). Nature.

1.1.1.2 Papel dos neutrófilos

A artrite reumatóide é uma doença mediada principalmente por células T. No entanto, outros tipos celulares também desempenham importante papel na sua patogênese (Cascao et al.; 2010, Firestein, 2003; 2005; McInnes and Schett, 2007). Além das células T, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos sinoviais e células B estão envolvidos nos mecanismos que iniciam a AR (Cascao et al.; 2010, Esensten et al., 2009; Lubberts et al., 2005; Schulze-Koops and Kalden, 2001; Takemura et al., 2001). Macrófagos, células T e B infiltram na sinóvia e formam agregados linfóides e, algumas vezes, centros germinativos epitópicos (Cascao et al., 2010). Além disso, os macrófagos e fibroblastos sinoviais se acumulam na sinóvia, causando hiperplasia e secreção de enzimas proteolíticas (Cascao et al., 2010). Entretanto, antes desses eventos ocorrerem, os neutrófilos migram para o fluido sinovial, onde fagocitam complexos imunes e liberam proteases (Cascao et al., 2010; Eyles et al., 2006; Nathan, 2006; Nathan, 1987), iniciando assim, sua importante atuação na resposta inflamatória induzida na artrite.

Tem sido mostrado que os neutrófilos desempenham um papel crucial na patogênese da doença, sendo o primeiro tipo celular a atingir o sítio de inflamação, seguidos pelos monócitos (Nathan, 2006). Além disso, são os leucócitos mais abundantes nas articulações de pacientes com AR ativa (Wipke and Allen, 2001). Em uma resposta inflamatória normal, e sob estímulo apropriado, os neutrófilos são capazes de liberar mediadores citotóxicos, como espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), além das proteases no espaço extracelular. Portanto, os neutrófilos são as principais células efetoras, capazes de causar danos articulares, diretamente à cartilagem e ossos (Cascao et al., 2010), onde o seu papel está associado tanto às fases iniciais quanto tardias da doença (Wipke and Allen, 2001).

Os neutrófilos são capazes de produzir uma grande variedade de citocinas e quimiocinas durante o processo inflamatório tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL)-1, IL-18, IL-15 e IL-6 (Cascao et al.; 2010, McInnes and Gracie, 2005; McInnes and Liew, 2005; McInnes and Schett, 2007). As citocinas e quimiocinas são fundamentais para amplificar a inflamação, por recrutarem mais neutrófilos, além de outras células imunes para o sítio inflamatório e, além disso, por modularem o seu estado de ativação (Brennan and McInnes, 2008; Gaston, 2008; McInnes and Schett, 2007; Nathan, 2002).

Uma vez recrutados para as articulações inflamadas, os neutrófilos entram em contato com as células endoteliais e apresentam uma alta capacidade de induzir a liberação de TNF- α , juntamente com IL-10. O TNF- α estimula a produção de outras citocinas, como a CCL18, importante quimiocina que atrai células T. Outra observação verificada por Auer e cols (2007) é que os neutrófilos presentes no fluido sinovial passam a expressar novos receptores de citocinas e quimiocinas (Auer et al., 2007).

Os neutrófilos também têm importante papel na produção de autoanticorpos, uma vez que, infiltrados na articulação inflamada, expressam a enzima deiminase peptidil-arginina 4 (PADI)4 que é responsável pela conversão da arginina em citrulina (Vossenaar et al., 2003), contribuindo, portanto, para a geração de autoanticorpos, que são elementos essenciais para o início da AR (Anzilotti et al.;

Eyles et al., 2006). Os neutrófilos também podem secretar proteases que têm um papel relevante no metabolismo das citocinas pró-inflamatórias, podendo tanto degradá-las quanto ativarem seus precursores. Tais proteases também atuam sobre o metabolismo das quimiocinas, sugerindo a existência de um processo de retroalimentação para sua ativação (Eyles et al., 2006).

Além disso, os neutrófilos possuem potentes armas microbidas, tal como o complexo NADPH oxidase (NOX2). Esta enzima produz grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ser formadas intracelularmente, a fim de destruírem os patógenos fagocitados, ou liberados no fluido extracelular e causar danos a células adjacentes e tecidos (Bjorkman et al., 2008; Bylund et al., 2007; Cascao et al., 2010). Especificamente na AR, na fase ativa da doença, os neutrófilos produzem menor quantidade de ROS em relação aos neutrófilos de indivíduos saudáveis ou de pacientes em remissão (Cedergren et al., 2007), que é um indicativo de uma maior susceptibilidade para doenças autoimunes (Bjorkman et al., 2008).

Nas fases iniciais da AR, os neutrófilos sinoviais apresentam uma menor taxa de apoptose (Andersson et al., 2008; Li et al., 2004) aumentando a liberação de enzimas proteolíticas e modulando outros tipos celulares. Esta alteração da sobrevivência dos neutrófilos no sítio inflamatório é devida a alterações nos seus mecanismos intrínsecos de apoptose ou à influência de mediadores inflamatórios de sobrevivência no ambiente, e certamente têm um papel importante para a manutenção da inflamação. A apoptose do neutrófilo é um processo essencial para a renovação de seu repertório e para a resolução da inflamação (Akgul et al., 2001). Ocorrendo uma falha no *clearance* dessas células, ocorre necrose seguida pela fagocitose dos restos celulares pelos macrófagos, o que aumenta ainda mais a produção de citocinas pró-inflamatórias, ampliando a inflamação (Sweeney and Firestein, 2004).

Os estudos também têm mostrado o envolvimento dos neutrófilos no remodelamento ósseo. (Cascao et al.; 2010, Poubelle et al., 2007) Essas células apresentam um receptor ativador de ligante do fator nuclear- $\kappa\beta$ (RANKL) em sua membrana (Poubelle et al., 2007), que está envolvido na regulação da reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Tal receptor encontra-se aumentado em pacientes

com AR (Ziolkowska et al., 2002). Além disso, há evidências de que os neutrófilos têm um alto potencial para se diferenciarem e adquirirem características de osteoclastos, passando a expressar integrinas, anidrase carbônica II e ATPase vacuolar (Poubelle et al., 2007).

1.1.1.3 Papel das citocinas pró-inflamatórias

As citocinas constituem um grupo de proteínas produzidas por células de vários tecidos, com propriedades sinalizadoras, que atuam na comunicação intercelular, enquanto as quimiocinas constituem um grupo de citocinas de baixo peso molecular, cuja principal ação é o recrutamento e ativação de leucócitos em vários processos inflamatórios – daí a denominação “quimiocina”, derivada da associação dos termos “quimiotaxia” e “citocina” (Janeway, 2005). As citocinas estão diretamente implicadas na maioria dos processos imunes relacionados à patogênese da AR. Várias citocinas são expressas e funcionalmente ativas nos tecidos sinoviais, participando de todas as fases da doença, contribuindo com a manutenção de uma sinovite crônica e direcionando a destruição dos tecidos adjacentes (Brennan and McInnes, 2008; McInnes and Schett, 2007).

O líquido sinovial de pacientes com artrite contém grandes quantidades de citocinas secretadas por macrófagos e neutrófilos (ex. IL-1 β , IL-6, TNF- α , e IL-8), além de outras derivadas de outros tipos celulares como a célula T (IL-2, IL-3 IL-4, IFN- γ) (Edwards et al., 2004), e T regulatória (IL-10, TGF- β) (Boissier et al., 2009).

Dentre as citocinas envolvidas na AR, o **TNF- α** merece destaque. Trata-se de uma citocina pró-inflamatória que apresenta papel chave na inflamação, imunomodulação, crescimento, angiogênese e citotoxicidade (Aggarwal and Natarajan, 1996; Taylor et al., 2004). Essa citocina estimula a expressão de moléculas de adesão tanto em neutrófilos circulantes, quanto em células endoteliais. Promove também a síntese de outras citocinas, ativando células endoteliais, fibroblastos, osteoclastos e condrócitos (Aggarwal, 2003; Feldmann et al., 1996a; b). Diversos estudos demonstraram a participação do TNF- α na migração de neutrófilos em modelos de reação inflamatória, tais como artrite induzida por colágeno, e em

doenças inflamatórias humanas, como a doença inflamatória intestinal e a AR (Canetti et al., 2001; Feldmann et al., 1996a; b; Kuwabara et al., 2000). O TNF- α apresenta papel primordial na patogênese da AR (Feldmann et al., 1996a; b). Sua presença na sinóvia de pacientes com AR é frequente e a sua inibição mostrou-se capaz de suprimir a doença, como verificado em alguns modelos de artrite (McInnes and Schett, 2007). O TNF- α induz ativação leucocitária e endotelial, ativação e sobrevida de fibroblastos sinoviais, sensibilização de receptores nociceptivos e angiogênese (Feldmann et al., 1996a; b; McInnes and Liew, 2005; McInnes and Schett, 2007). Outra ação do TNF- α é o direcionamento da formação de osteoclastos, mobilizando seus precursores da medula óssea (Li et al., 2004; Ritchlin et al., 2003).

Além do TNF- α , a IL-1 β também se relaciona à patogênese da AR. Foi a primeira citocina detectada na sinóvia de pacientes com AR (Fontana et al., 1982) e desde então, vários estudos têm avaliado sua participação na doença. Exemplos são os estudos realizados em camundongos deficientes de antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), que apresentam um importante papel de impedir a sinalização da IL-1, uma vez ligado ao seu receptor. Esses animais desenvolvem erosões espontâneas que são associadas com a indução de células Th17 que são capazes de induzir uma resposta pró-inflamatória eficiente (Dayer and Bresnihan, 2002; Horai et al., 2000). A IL-1 β tem um papel chave na gênese de osteoclastos mediada pelo TNF- α , uma vez que o TNF- α pode induzir a expressão de IL-1 β , principalmente por células mesenquimais (Wei et al., 2005). Tais tipos celulares atuam no processo de degradação da cartilagem por meio de inibição da síntese de matriz extracelular, bem como pela indução da expressão de metaloproteinases (MMPs) que a degradam (Catterall et al., 2001; Eberhardt et al., 2000). Além disso, injeções intra-articulares de IL-1 β produzem redução de proteoglicanos, estimulam a apoptose de condrócitos e a degradação da matriz extracelular (Pettipher et al., 1986).

As quimiocinas são proteínas de baixo peso molecular (8-10 kDA) que agem diretamente no recrutamento de leucócitos, direcionando-os da corrente sanguínea para os tecidos (Janeway, 2005; Murphy et al., 2000; Rossi and Zlotnik, 2000). As quimiocinas são produzidas de maneira coordenada e controlada durante a inflamação e agem em seus receptores que são expressos diferencialmente nos

subtipos de leucócitos. Quatro diferentes subfamílias de quimiocinas e receptores têm sido identificados: CC, CXC, CX3C e C. (Murphy et al., 2000; Pease and Williams, 2006).

Vários estudos têm demonstrado papel relevante para as quimiocinas no dano tecidual e infiltração de leucócitos em modelos experimentais de artrite, destacando-se as quimiocinas da família CXC, que medeiam suas ações a partir da ligação com receptores do tipo CXCR1 e CXCR2, expressos principalmente em neutrófilos e em linfócitos T ativados (Murphy et al., 2000; Pease and Williams, 2006). O bloqueio das quimiocinas, ou dos receptores CXCR1/2, impede o influxo de neutrófilos e a lesão tecidual em vários modelos de inflamação aguda e crônica (Bizzarri et al., 2006; Gerard and Rollins, 2001; Kasama et al., 2005).

Em relação às quimiocinas, CXCL8/ IL-8 está presente no fluido sinovial de pacientes com AR ativa ou na articulação de animais com artrite induzida (Matsukawa et al., 1999; Murphy et al., 2000; Nishimura et al., 1997). As quimiocinas **KC (CXCL1)** e **CINC-1** são análogas à IL-8 humana, e estão presentes em camundongos e ratos, respectivamente. Alguns estudos demonstram uma importante ação anti-inflamatória do bloqueio do receptor CXCR2, tanto em modelos de inflamação aguda quanto crônica (Barsante et al., 2008; Coelho et al., 2008). Em modelo crônico de AR foi utilizado adjuvante, para a indução da artrite em ratos, seguido pelo tratamento com o bloqueador do receptor CXCR2, o composto DF2162, que produziu significativa redução do influxo de neutrófilos e da produção de IL-1 β e TNF- α nas articulações acometidas (Barsante et al., 2008). O mesmo ocorreu no modelo agudo, que utilizava o antígeno albumina bovina metilada (mBSA) para a indução da artrite em camundongos. O tratamento com DF2162 impediu o recrutamento e neutrófilos, reduziu a produção de TNF- α e a hipernocicepção relacionada à inflamação (Coelho et al., 2008).

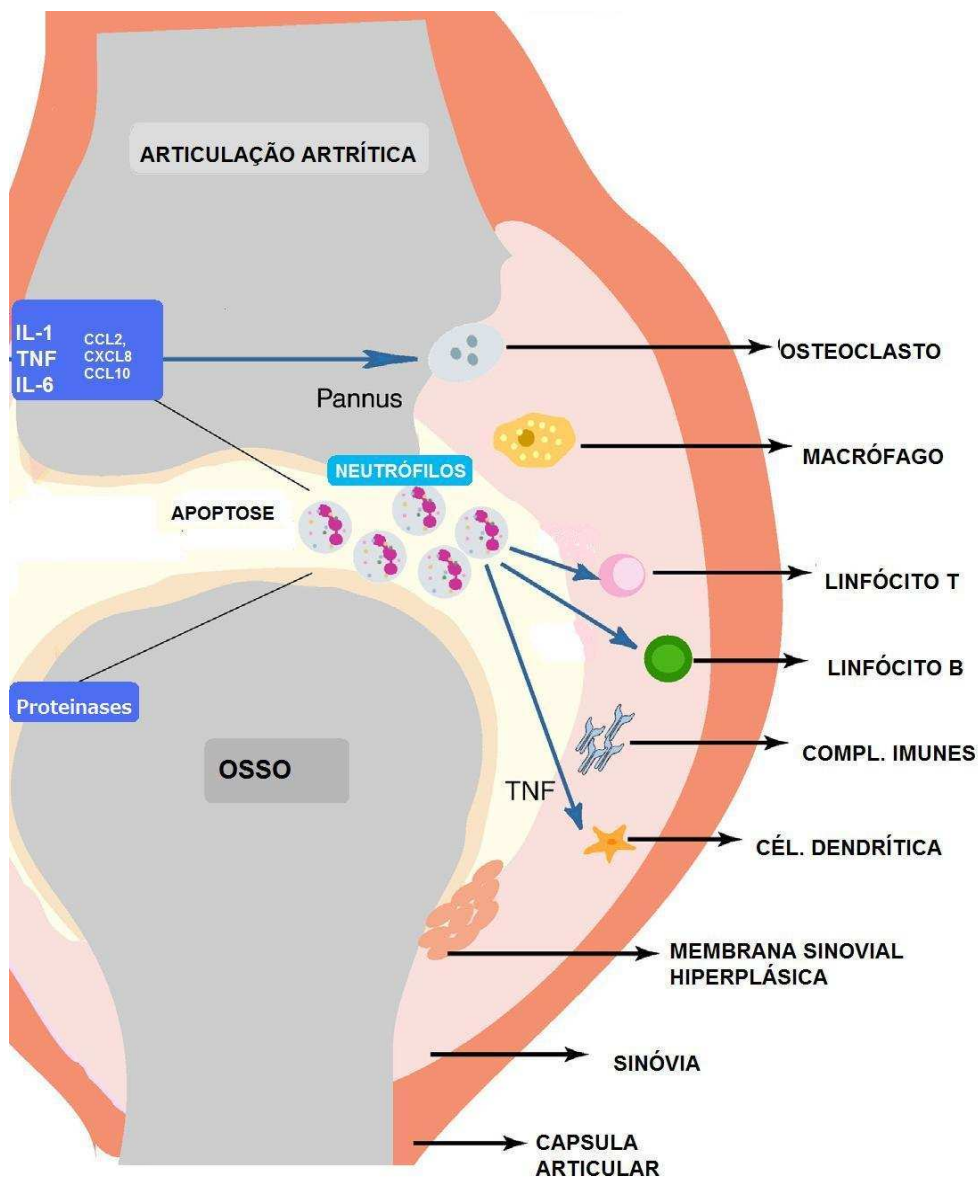


Figura 2 Representação esquemática da articulação sinovial durante a artrite. A figura apresenta a interação entre os principais tipos de leucócitos envolvidos na patogênese da artrite presentes na sinóvia e interface erosiva da cartilagem/ossos (pannus). A figura destaca o papel dos neutrófilos ativando os tipos celulares e envolvidos na produção de mediadores imunes (citocinas e quimiocinas) e enzimas. Adaptado de Cascão e cols (2010) - Autoimmunity Reviews.

1.1.1.4 Dor Inflamatória

Um dos mais importantes sintomas que acompanham a artrite reumatóide é o aumento da sensibilidade articular à dor, que é a principal causa das limitações funcionais do paciente (Hallert et al., 2004). A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada ou não a uma lesão tecidual” (Merskey, 1994).

Nesse sentido, existem alguns termos utilizados na prática clínica relacionada à dor inflamatória como alodinia (dor decorrente de um estímulo que normalmente não provoca dor), e hiperalgesia (resposta exacerbada a um estímulo doloroso) que também são utilizados na prática experimental em animais. O uso do termo hipernocicepção tem sido empregado em estudos de modelos animais, para designar as alterações comportamentais induzidas pela sensibilização dos neurônios sensitivos, responsáveis pelo reconhecimento de estímulos dolorosos (nociceptores) (Parada et al., 2003), e será utilizado neste estudo que utilizou a metodologia de pressão crescente na pata de camundongos (Cunha et al., 2004; Vivancos et al., 2004), uma versão eletrônica do método de von Frey, para detectar comportamentos nociceptivos antes e após a administração do estímulo inflamatório.

A hipernocicepção articular resulta, principalmente, de efeitos diretos e indiretos de mediadores inflamatórios que sensibilizam (aumentam a excitabilidade) de fibras nociceptivas primárias que inervam a articulação inflamada (McDougall, 2006; Schaible et al., 2002; Schaible and Grubb, 1993). A sensibilização dos nociceptores é caracterizada eletrofisiologicamente pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativar o nociceptor, pelo aumento da atividade espontânea da célula nervosa, e pela elevação da frequência de disparos em resposta aos estímulos supralimiáres (Melzack, 1999).

Prostaglandinas e aminas simpatomiméticas são mediadores-chave nesse processo, e sua liberação é geralmente estimulada por citocinas (TNF- α , IL-1 β) e quimiocinas, produzidas principalmente por neutrófilos (Cunha et al., 1992; Cunha et al., 2005; Cunha et al., 2008b; Ferreira et al., 1978; Khasar et al., 1999). Os neutrófilos também apresentam papel relevante na hipernocicepção inflamatória, através dos seguintes mecanismos: a) estimulação da liberação de citocinas e

quimiocinas pró-inflamatórias (Cunha et al., 2008b); b) estímulo à produção de prostaglandinas (PGE₂) e leucotrienos (LTB₄) (Guerrero et al., 2008); c) formação de ROS e metaloproteinases (MMPs) (Bezerra et al., 2007).

Devido à relevância clínica desse sintoma, diversas estratégias para o seu tratamento têm sido investigadas, porém com eficácia bastante limitada até o momento (Boers et al., 1997; Mottonen et al., 1999; O'Dell et al., 1996; Svensson et al., 2005)

1.1.2 Artrite Reumatóide: abordagem terapêutica

A abordagem terapêutica da AR tem sofrido grandes mudanças na última década. Três preceitos têm direcionado a abordagem mais moderna da doença: 1) Necessidade de redução precoce e persistente da inflamação, uma vez que, se não há inflamação, não há dano articular; 2) Necessidade de abordar mecanismos moleculares específicos implicados na patogênese da doença; 3) Necessidade de considerar o caráter dinâmico e complexo da AR para individualizar o tratamento adequando-o à fase da doença (Klareskog et al., 2009).

Vários estudos, realizados na última década, demonstraram claramente que tratamentos precoces e agressivos com as convencionais drogas antirreumáticas modificadoras da doença (em inglês, Disease-modifying antirheumatic drugs - DMARDs), tais como metotrexato, sulfasalazina, hidroxicloroquina, leflunomide e glicocorticóides podem ser benéficos, entretanto ainda são insuficientes (Boers et al., 1997; Mottonen et al., 1999; O'Dell et al., 1996; Svensson et al., 2005).

De acordo com os três preceitos anteriormente descritos, o desenvolvimento de terapias com diferentes alvos do sistema imune tem sido abordado. Dentre essas abordagens alternativas, destacam-se os bloqueadores de citocinas ou de seus receptores, devido à sua relevância na patogênese da AR (Dayer and Bresnihan, 2002; Feldmann et al., 1996b; Firestein, 2003; Gaston, 2008; Pinto et al.). Nesse contexto, agentes bloqueadores de TNF- α já têm sido utilizados na prática clínica, tais como infliximab (anti-TNF quimérico), etanercept (receptor de TNF solúvel), adalimumab (anti-TNF humanizado), que agem neutralizando parcialmente

o TNF- α circulante e sinovial (Klareskog et al., 2009). Comumente é utilizada a combinação do bloqueador com algum DMARD, onde se observam efeitos mais eficazes (Klareskog et al., 2004; Lipsky et al., 2000b; Maini et al., 1998; Weinblatt et al., 2003). Anakinra, uma versão recombinante do antagonista do receptor de IL-1 β humana, inibidor competitivo da IL-1 demonstra alguns efeitos sobre a erosão óssea presente em pacientes com AR (Bresnihan et al., 1998), mas sua eficácia parece ser menor que a dos bloqueadores de TNF- β (Burger et al., 2006). Mais recentemente, agentes direcionados especificamente aos linfócitos T e B também têm sido estudados (Edwards et al., 2004; Kremer et al., 2003). O Abatacept é uma proteína de fusão recombinante que consiste em um domínio extracelular de CTLA4 e um fragmento da porção Fc da IgG que inibe os sinais coestimulatórios essenciais para ativação das células T; rituximab é um anticorpo monoclonal que se liga a CD20 na superfície das células B adultas ou nos precursores das células B e os elimina da circulação (Kremer et al., 2005).

Apesar dos avanços com tais tratamentos, a utilização dos DMARDs e/ou dos agentes alternativos apresentados têm mostrado que ainda são necessários estudos adicionais, para estabelecer qual a melhor abordagem terapêutica para AR. O que se observa são respostas bastante variáveis e individualizadas dos pacientes, das quais as causas ainda não foram esclarecidas. Aliado a isto, os efeitos adversos das drogas utilizadas são frequentes, como por exemplo, o elevado risco de infecções, especialmente a tuberculose, detectada em usuários de bloqueadores de TNF- α (Gomez-Reino et al., 2003) e a possibilidade de desenvolvimento de neoplasias, particularmente linfomas (Askling and Bongartz, 2008; Baecklund et al., 2006). Outro importante fator que impulsiona a busca por novos alvos terapêuticos são os elevados custos destes tratamentos [American College of Rheumatology, (2002)].

1.1.3 Artrite Reumatóide e Doenças Cardiovasculares

Hipertensão, diabetes, sexo masculino, idade avançada, consumo de cigarro, obesidade e hiperlipidemia são fatores de risco bem estabelecidos para as doenças cardiovasculares (DCVs) (Kannel et al., 1976). No entanto, estudos recentes têm mostrado uma estreita relação entre a artrite reumatóide e as DCVs (Pasceri and Yeh, 1999; Wolfe et al., 2003). O risco de infarto do miocárdio (IM) ou insuficiência cardíaca congestiva (ICC) é significativamente maior em pacientes com AR do que em indivíduos saudáveis, sugerindo que as DCVs podem ser consideradas manifestações extra-articulares da AR (Pasceri and Yeh, 1999; Wolfe et al., 2003). Tem sido relatado que, aproximadamente um terço dos pacientes com AR, morre por DCVs (Reilly et al., 1990). As razões atribuídas a esta aumentada morbimortalidade nos pacientes com AR são multifatoriais, mas levam em consideração o papel preponderante da inflamação sistêmica na promoção da disfunção endotelial (Snow and Mikuls, 2005)

Vários estudos têm verificado que, com exceção do consumo de cigarros, que é associado ao início e exacerbação da AR, não têm sido detectados outros fatores de risco para DCVs em pacientes com AR, quando comparados com a população geral (Criswell et al., 2002; del Rincon et al., 2001; Saag et al., 1997; Silman et al., 1996; Wolfe, 2000).

Outro aspecto importante se refere aos efeitos adversos das drogas utilizadas para o tratamento da AR sobre o sistema cardiovascular. Para exemplificar, o uso de metotrexato determina aumento de homocisteína, que é um fator de risco para DCVs em pacientes com AR (Morgan et al., 1998; Roubenoff et al., 1997) e o uso de glicocorticóides e/ou de anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDs) pode afetar o controle da pressão arterial e dos níveis séricos de lipídios (Jacquot et al., 1978; Johnson, 1997; Lipsky et al., 2000a; Mukherjee et al., 2001; Nashel, 1986; Page and Henry, 2000; Singh et al., 2003). A utilização de inibidores de TNF- α também tem sido associada ao aumento da mortalidade de pacientes com AR por ICC e a uma redução dos níveis séricos de HDL (lipoproteínas de alta densidade) (Irace et al., 2004; Wolfe and Michaud, 2004). A disfunção endotelial é outra alteração associada

à patogênese das cardiopatias (Ridker et al., 1997; Ridker et al., 2002), a qual está diretamente relacionada ao processo inflamatório da AR. Citocinas pró-inflamatórias participam da disfunção endotelial, principalmente por reduzirem as concentrações de óxido nítrico e aumentarem o estresse oxidativo (Bhagat and Vallance, 1997; Clapp et al., 2004; Ohkawa et al., 1995).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina

1.2.1 Sistema Renina-Angiotensina: aspectos gerais

O sistema renina-angiotensina (SRA) é classicamente conceituado como um sistema hormonal com ações voltadas para o controle das funções cardiovasculares, renais e adrenais, controlando o balanço de fluidos e eletrólitos, e também os níveis da pressão arterial. Anteriormente, esse controle era atribuído, exclusivamente às ações da Angiotensina II (Ang II) (Zaman et al., 2002).

A Ang II é um peptídeo biologicamente derivado da Angiotensina I (Ang I) que é formada a partir da ação de uma enzima, a renina, uma protease aspártica sintetizada nas células justaglomerulares renais, que age sobre o angiotensinogênio, uma proteína sintetizada principalmente no fígado. Clivado, o angiotensinogênio forma o decapeptídeo, Ang I, que é biologicamente inativo (Oparil and Haber, 1974a; b). Este, por sua vez, é hidrolisado pela ECA (enzima conversora da angiotensina (ECA), também conhecida como cininase II – uma dipeptidil-carboxipeptidase não-seletiva (Zaman et al., 2002). Dessa hidrólise é formada a Ang II, um octapeptídeo biologicamente ativo.

A Ang II exerce muitos dos efeitos biológicos do SRA, através a ativação do receptor angiotensinérgico do tipo 1 (AT₁), um receptor de sete domínios transmembrânicos acoplado à proteína G (Sasaki et al., 1991; Smith and Timmermans, 1994). Dentre os efeitos decorrentes dessa ativação, destacam-se: vasoconstrição, estímulo ao mecanismo da sede, liberação de aldosterona e vasopressina, aumento da reabsorção tubular renal de sódio e de água, hipertrofia celular, fibrose, inotropismo e cronotropismo positivos, formação de radicais

superóxido, ativação do sistema nervoso simpático, secreção de endotelinas, dentre outros (Santos et al., 2008b). Os efeitos mediados pela interação da Ang II com o receptor AT_1 são decorrentes da ativação do eixo clássico do SRA, formado pela ECA, Ang II e receptor AT_1 . A Ang II também pode se ligar ao receptor AT_2 , um receptor de membrana cujos efeitos podem ser opostos aos do receptor AT_1 . A ativação do receptor AT_2 promove diferenciação celular, reparo tecidual, apoptose, vasodilatação, inibição do crescimento e da proliferação celular (Carey, 2005).

Além da ECA, outras enzimas também têm a habilidade de formar a Ang II a partir de Ang I (Greene et al., 1982; Welches et al., 1991; Yamamoto et al., 1992). Ambas, Ang I e Ang II são susceptíveis à ação de peptidases que hidrolisam aminoácidos da porção aminoterminal (chamadas aminopeptidases), da porção carboxiterminal (chamadas carboxipeptidases), ou da porção interior da molécula (endopeptidases). A ação dessas peptidases produz fragmentos menores de angiotensinas encontrados na circulação ou nos diversos tecidos tais como Ang III ou Ang-(2-8), Ang IV ou Ang-(3-8) e Ang-(1-7) (Santos et al., 2008a), revisão, figura 3.

O papel biológico desses peptídeos do SRA tem sido investigado nos últimos anos (Chappell, 2007; Ferreira et al., 2007; Iwai and Horiuchi, 2009; Santos et al., 2008a). Nesse contexto, recentes avanços na biologia celular e molecular, bem como novas ferramentas farmacológicas e fisiológicas têm modificado a visão clássica do SRA. Dentre os aspectos mais significativos da visão atual do SRA, destacam-se a identificação de peptídeos biologicamente ativos, a descoberta de novas enzimas para o metabolismo de angiotensinas, de novos receptores angiotensinérgicos, de interações receptor-receptor, de novas funções do SRA e da atuação local deste sistema, independente de sua secreção hormonal (Carey, 2005; Ferrario et al., 2005b; Santos et al., 2008a).

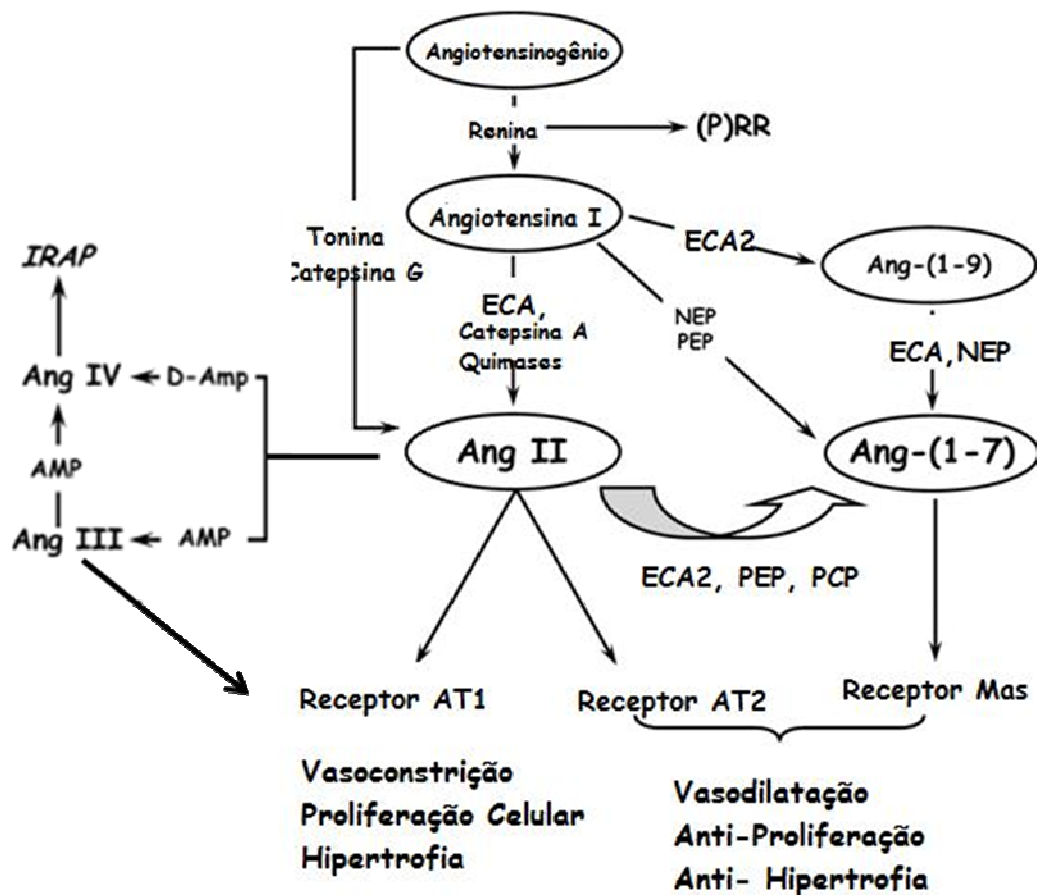


Figura 3 Visão atual da cascata do Sistema Renina-Angiotensina. Abreviações: Ang: angiotensina; AMP: aminopeptidase; AT₁: Receptor do tipo 1 de Ang II; AT₂: Receptor do tipo 2 de Ang II; ECA: Enzima conversora da angiotensina; Mas: receptor Mas de Ang-(1-7); PCP: prolil-carboxipeptidase; NEP: Endopeptidase neutra; (P)RR: Renina/receptor de pro-renina. Adaptado de: Santos e cols (2008) – Exp. Physiol.

1.2.2 Sistema Renina Angiotensina: papel da Angiotensina-(1-7)

A Angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] é um metabólito do SRA, que, por muito tempo, foi considerado inativo (Greene et al., 1982). Esse conceito começou a se modificar a partir dos estudos de Schiavone et al. (1988) demonstrando que a Ang-(1-7) exercia um efeito semelhante ao da Ang II na *in vitro* liberação de vasopressina em culturas de extrato de neuro-hipófise. Desde então, um grande número de

trabalhos vêm contribuindo para fundamentar as notáveis mudanças do conhecimento em relação à cascata do sistema renina-angiotensina e de suas funções (Chappell, 2007; Ferreira and Santos, 2005; Iwai and Horiuchi, 2009; Santos et al., 2008a; Santos et al., 2005; Simoes e Silva et al., 2006b).

Dentre as recentes descobertas que produziram alterações conceituais de fundamental importância relacionadas à Ang-(1-7), destacam-se a identificação da ECA2 (enzima conversora da angiotensina 2) como a principal enzima responsável pela formação de Ang-(1-7) (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000) e a descoberta de um novo receptor acoplado a proteína G, o receptor Mas, como sendo um ligante endógeno para a Ang-(1-7) (Santos et al., 2003). Além da ECA2, outras enzimas podem formar Ang-(1-7), a partir da hidrólise da Ang I ou da Ang II, tais como a prolil-endopeptidase (Greene et al., 1982), a endopeptidase neutra 24.11 (Yamamoto et al., 1992) e a prolil-carboxipeptidase (Welches et al., 1991). A ECA2 converte a Ang I em Ang-(1-9), peptídeo considerado inativo que, por sua vez, é hidrolisado pela ECA ou endopeptidase neutra, formando Ang-(1-7). Estudos de Tipnis e cols (2000) (Tipnis et al., 2000) e de Vickers e cols (2002) (Vickers et al., 2002) demonstraram que o substrato preferencial da ECA2 é a Ang II ao invés da Ang I. A eficiência catalítica da ECA2 em hidrolisar a Ang II é 400 vezes maior do que para hidrólise de Ang I (Vickers et al., 2002). A Ang-(1-7) é produzida, então, diretamente pela ação catalítica da ECA2 sobre a Ang II (Tipnis et al., 2000; Vickers et al., 2002).

A ativação do receptor Mas pela Ang-(1-7) tem efeitos antagônicos àqueles promovidos pela interação da Ang II com o receptor AT₁. Dentre esses efeitos pode-se destacar: vasodilatação (Brosnihan et al., 1996; Ferreira et al., 2001; Loot et al., 2002), antiarritmogênico (Santos et al., 2004), redução de fibrose (Pereira et al., 2007), redução da proliferação celular (Gallagher and Tallant, 2004; Tallant et al., 2005), redução da hipertrofia (Iwata et al., 2005; Tallant et al., 2005), entre outros. A partir desses achados, o SRA passou a ser considerado atualmente um sistema complexo e bidirecional que atua por meio de dois eixos antagônicos: o eixo clássico formado por ECA-Ang II- receptor AT₁ e o eixo contra-regulador cujos componentes são ECA2-Ang-(1-7)-receptor Mas [para revisão, ver (Santos et al., 2008a)].

1.2.3 Modulação do Sistema Renina Angiotensina

1.2.3.1 Antagonistas do receptor AT₁

A maioria das ações da Ang II é mediada pelo receptor AT₁ (de Gasparo et al., 1995; Kaschina and Unger, 2003). O composto losartan é o protótipo dos antagonistas não-peptídicos e seletivos do receptor AT₁ (Duncia et al., 1990) que pode ser competitivo ou não, conforme o tecido (Robertson et al., 1994) e é ativo por via oral (Wong et al., 1990a; b). Losartan tem sido utilizado em larga escala com eficácia em doenças cardiovasculares e renais há aproximadamente 20 anos (Aulakh et al., 2007; Chung and Unger, 1999).

Os antagonistas do receptor AT₁ fazem parte do arsenal terapêutico da hipertensão arterial (Aulakh et al., 2007), da falência cardíaca (Bernal et al., 2006), do diabetes mellitus tipo II e das síndromes metabólicas (Engeli, 2006; Leung, 2007), do infarto (Tanahashi, 2006), do câncer de próstata (Uemura et al., 2006), da fibrilação atrial (Anand et al., 2006), de doenças renais crônicas (Ruster and Wolf, 2006) (Ferrari, 2007), do mal de Parkinson (Grammatopoulos et al., 2007), do mal de Alzheimer (Gard and Rusted, 2004), da fibrose hepática e da hipertensão de veia porta (Tox and Steffen, 2006).

Alguns estudos sugerem que os efeitos benéficos decorrentes da administração de antagonistas de receptores AT₁ possam ser atribuídos, pelo menos em parte, pelo aumento das concentrações locais e circulantes da Ang-(1-7) (Ferrario et al., 2005a), e pela possível interação com o receptor Mas (de Moura et al., 2005).

1.2.3.2 Agonistas do receptor Mas

Existem vários estudos sobre os efeitos endógenos resultantes da interação entre Ang-(1-7) e seu receptor Mas (Benter et al., 2006; Chappell et al., 1998; Ferrario et al., 2005a; Ferreira et al., 2001; Iyer et al., 1998; Santos et al., 2005). Tais efeitos são, em sua maioria, opostos àqueles exercidos pela Ang II, o que demonstra

o importante papel da ativação desse eixo, ECA2-Ang-(1-7)-receptor Mas, na regulação do SRA e, além disso, na modulação de vários estados fisiopatológicos do organismo.

A detecção de que os níveis de Ang-(1-7) aumentam durante o bloqueio do eixo clássico do SRA, tanto quando se inibe a conversão da Ang I em Ang II (inibição da ECA) (Simoes e Silva et al., 2006a) quanto ao se bloquear o receptor AT₁ (Chappell et al., 1998; Iyer et al., 1998) evidenciam a importância da formação de Ang-(1-7) durante o bloqueio do eixo clássico do SRA. Desse modo, o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas surge como um importante alvo para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de doenças crônico-degenerativas, sobretudo com acometimento renal e cardiovascular (Benter et al., 2006; Chappell et al., 1998; Ferrario et al., 2005a; Ferreira et al., 2001; Iyer et al., 1998; Santos et al., 2005).

Um importante passo nessa direção foi a descoberta do primeiro agonista não peptídico do receptor Mas da Ang-(1-7), o composto AVE 0991, que é ativo por via oral (Heitsch, 2000; Wiemer et al., 2002). Este composto apresenta efeitos comparáveis aos da Ang-(1-7) por meio de sua ligação ao receptor Mas em vários órgãos tais como nos vasos sanguíneos (Faria-Silva et al., 2005; Lemos et al., 2005), nos rins (Pinheiro et al., 2004) e no coração (Benter et al., 2006). A descoberta da AVE 0991 abriu novas possibilidades terapêuticas para as doenças cardiovasculares e renais (Santos and Ferreira, 2006).

Em relação à estrutura química, a AVE 0991 consiste em 5-formyl-4-methoxy-2-phenyl-1[[4-[2-ethylaminocarbonylsulfonamido)-5-isobutyl-3-thienyl]-phenyl]-methyl]-imidazole) (Wiemer et al., 2002). Trata-se de um derivado do imidazole substituído, com peso molecular de 580,73 e solúvel em soluções aquosas, alcalinas ou solventes orgânicos (DMSO, etanol). AVE 0991 é um composto ativo por via oral e fisiologicamente bem tolerado. Além disso, esse agonista do receptor Mas da Ang-(1-7) pode ser produzido em larga escala (Derdau et al., 2003). No entanto, ainda há uma escassez de dados referentes às propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas desse composto conforme mencionado a seguir.

Após a descrição de AVE 0991 (Heitsch, 2000), o primeiro estudo demonstrando que seus efeitos eram similares aos da Ang-(1-7) foi o de Wiemer e

cols (2002). Verificou-se que ambos, AVE 0991 e Ang-(1-7), se ligavam a sítios de células endoteliais aórticas bovinas e desencadeavam a liberação de óxido nítrico (NO) e, em menor proporção, de superóxido. Nesse estudo, AVE 0991 apresentou uma capacidade de liberação de NO cinco vezes maior do que a de Ang-(1-7) (Wiemer et al., 2002).

Pinheiro e cols (2004) demonstraram, em fatias de rins de camundongos C57BL/6, que a ligação de Ang-(1-7) a seu receptor Mas era abolida em presença de AVE 0991. Nesse mesmo estudo, tal observação se repetiu em cultura de células ovarianas de hamster chinês (CHO). A ligação da Ang-(1-7) ao receptor Mas foi completamente deslocada em presença de AVE 0991, mas não em presença dos antagonistas dos receptores AT₂ (PD 123391) e AT₁ (CV 11974) (Pinheiro et al., 2004). Em adição a estes dados, foi também observado que o antagonista do receptor Mas, o composto A-779, bloqueou completamente a liberação de NO promovida pela administração de AVE 0991 (Pinheiro et al., 2004).

AVE 0991 e Ang-(1-7) apresentaram efeitos vasodilatadores de mesma magnitude e dose-dependentes em anéis de aorta de camundongos. A vasodilatação induzida por AVE 0991 foi completamente abolida em animais com deleção genética do receptor Mas. Farmacologicamente, o efeito de ambos, Ang-(1-7) e AVE 0991, foi bloqueado na presença dos dois antagonistas do receptor Mas de Ang-(1-7), A-779 e D-Pro7-Ang-(1-7) (Lemos et al., 2005).

Estudos *in vivo* sugerem que a administração de AVE 0991 preserva a contratilidade cardíaca e o fluxo coronariano após isquemia e reperfusão de ratos espontaneamente hipertensos, prevenindo a elevação da pressão arterial, atenuando respostas vasoconstritoras, diminuindo a excreção de proteína urinária e prevenindo alterações morfológicas nos rins, vasos do mesentério e coração, provocadas pelo aumento da pressão arterial, (Benter et al., 2006).

1.2.4 Ang II x Ang-(1-7): papel na inflamação

Devido à escassez de estudos sobre os componentes do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas, muitas vezes é necessário inferir os efeitos potenciais da Ang-(1-7) a partir da avaliação do eixo clássico do SRA ou do bloqueio desse eixo por meio de inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECAs) ou antagonistas de seus receptores AT₁ (Abu Nabah et al., 2007; Hagiwara et al., 2009; Kranzhofer et al., 1999; Nabah et al., 2004; Nahmod et al., 2003; Peng et al., 2002; Ruiz-Ortega et al., 2001a; Ruiz-Ortega et al., 2001b; Suzuki et al., 2003).

Inúmeros estudos têm demonstrado um importante papel para a Ang II nos processos inflamatórios (Abu Nabah et al., 2007; Nabah et al., 2004; Peng et al., 2002; Ruiz-Ortega et al., 2001a; Ruiz-Ortega et al., 2001b). Além disso, alguns componentes do SRA têm sido detectados em células inflamatórias (Gomez et al., 1993; Owen and Campbell, 1998). Um exemplo é o estudo de (Silver et al., 2004) mostrando que os mastócitos produzem renina sendo, portanto, um sítio extrarrenal de síntese desta importante enzima formadora de Ang I. Outra evidência foi a verificação de que os monócitos contêm alguns constituintes do SRA, cuja expressão é aumentada durante a diferenciação dos monócitos em macrófagos, importante passo no processo de inflamação (Okamura et al., 1999). Células dendríticas também são moduladas por componentes do SRA, como demonstrado por Nahmod et al., 2003). Nesse estudo a diferenciação das células dendríticas mostrou-se, pelo menos em parte, dependente dos receptores AT₁, uma vez que antagonistas desses receptores (losartan, candesartan ou irbesartan) foram capazes de inibir o processo.

O papel de Ang II como modulador de fatores de transcrição para proteínas inflamatórias também já foi observado, como por exemplo, a estimulação do fator de transcrição pró-inflamatório NF-KB em células mononucleares e monócitos pela Ang II (Kranzhofer et al., 1999). Além disso, a inibição do NF-KB resulta em redução da lesão induzida pela Ang II em camundongos transgênicos que super-expressam Ang II (Theuer et al., 2002). A Ang II regula algumas citocinas inflamatórias, tais como o TNF- α e a IL-1 e a IL-6 (Arenas et al., 2004; Lapteva et al., 2002), que, por sua vez, são capazes de regular a Ang II (Peng et al., 2002; Wassmann et al., 2004).

Alvarez et al., 2004) verificaram que a exposição à Ang II induzia adesão dos leucócitos nas arteríolas da microcirculação mesentérica por meio de ativação do receptor AT₁. Nesse mesmo estudo, foi observado que a Ang II estimulou a expressão de moléculas de adesão de células endoteliais (CAMs), tanto em vênulas quanto em artérias. Outros estudos destacam a participação da Ang II no recrutamento de leucócitos através da formação e liberação de quimiocinas CC (MCP-1/CCL2, MCP-3/CCL7), da ativação de células T (RANTES/CCL5 e MIP-1 α /CCL3) e da liberação de quimiocinas CXC (CINC/KC e MIP-2) (Hernandez-Presa et al., 1997; Mateo et al., 2006; Nabah et al., 2004; Wolf et al., 1997). Além disso, a Ang II induziu a secreção de IL-8, MCP-1, RANTES e MCP-3 via ativação de receptor AT₁ em culturas de células humanas e aumentou a expressão de receptor CXCR2 nesses tipos celulares (Jacobi et al., 2005). Dois importantes estudos, (Gerszten et al., 1999) e (Nabah et al., 2004), demonstraram que o bloqueio do receptor CXCR2 inibiu a síntese e liberação de quimiocinas do tipo CC induzidas por Ang II. (Nabah et al., 2004). Verificaram ainda, que o bloqueio do receptor CXCR2 inibiu o recrutamento de células mononucleares para a cavidade peritoneal, sugerindo o potencial terapêutico do bloqueio tanto de AT₁ quanto de CXCR2 para prevenir disfunções, tais como a formação de lesões ateroscleróticas.

Guo et al. (2008), em estudos *in vitro* utilizando culturas de macrófagos, demonstraram que a *superexpressão* de ECA2 evitou o aumento da expressão de MCP-1 induzida por Ang II. Esses autores sugerem que um dos mecanismos para essa proteção seria a produção de Ang-(1-7), uma vez que o uso de A779, antagonista do receptor Mas, reverteu o efeito protetor da superexpressão da ECA2 em cultura de macrófagos.

A ação pró-inflamatória de componentes do SRA já foi verificada em doenças pulmonares (Kuba et al., 2006). O estudo de Weber (1997), em fibrose pulmonar, mostrou a participação da Ang II na conversão de fibroblasto em miofibroblasto, com consequente acúmulo de colágeno, a partir de estímulo à expressão de TGF β . A inibição da ECA ou o bloqueio do receptor AT₁ em modelos experimentais de fibrose pulmonar induzida por bleomicina atenuaram a apoptose epitelial, fibrose intersticial e deposição de colágeno (Li et al., 2003; Otsuka et al., 2004; Wang et al., 2000).

Oudit et al. (2007) mostraram que animais com deleção do gene para ECA2 apresentaram piora da função cardíaca, aumento das citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, MCP-1) e do número de neutrófilo totais em um modelo de cardiomiopatia em camundongos. A utilização de antagonista do receptor AT_1 nesses animais minimizou os efeitos observados (Oudit et al., 2007).

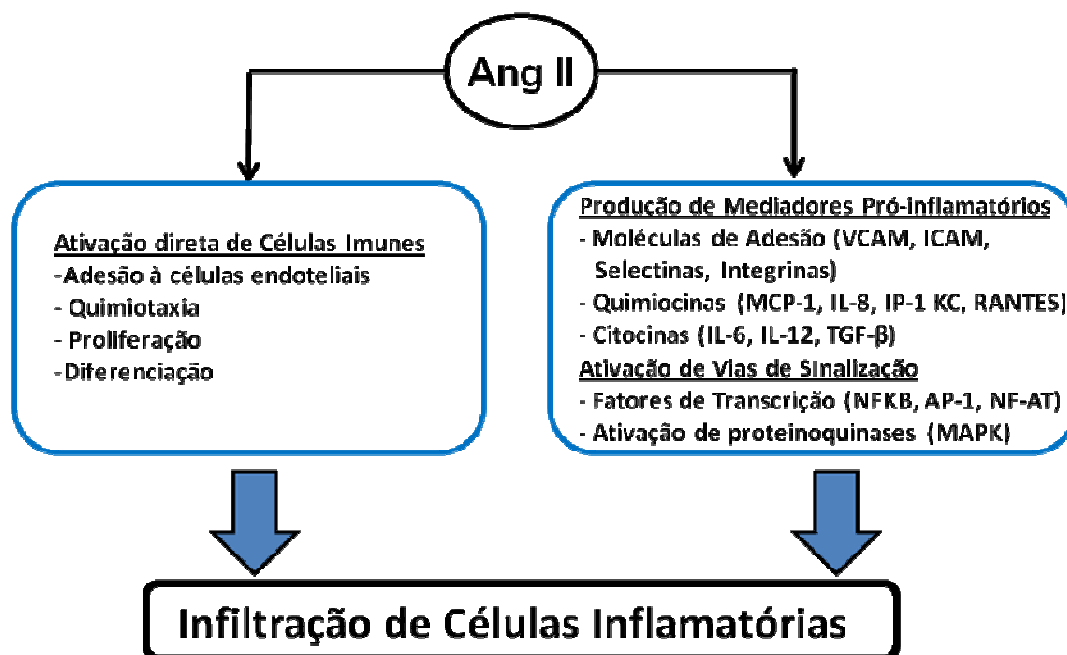


Figura 4 Potenciais mecanismos pelos quais Ang II induz a infiltração de células inflamatórias. Adaptado de Suzuki et al (2003). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.

1.3 Justificativa

Walsh e cols (Walsh et al., 1993; Walsh et al., 1994) demonstraram aumentos dos níveis de ECA e do receptor AT₁ em amostras de sinóvia de pacientes com artrite reumatóide. Posteriormente, em um modelo murino de artrite induzida por colágeno, a utilização de inibidores da ECA promoveu benefícios terapêuticos para os animais, diminuindo a inflamação articular (Dalbeth et al., 2005). Em um estudo mais recente, Price e cols (2007) mostraram que o bloqueio do receptor AT₁ atenuou a inflamação de forma dose-dependente em humanos e em modelo animal, ocorrendo diminuição de edema articular e da quantidade de TNF- α local.

Tendo em vista o perfil da resposta inflamatória desencadeada na artrite, caracterizada por recrutamento de células inflamatórias, associado à liberação de citocinas para o local da inflamação [(Feldmann et al., 1996a; b; Firestein, 2005; Schett and Firestein),2010], aliado aos efeitos benéficos decorrentes do bloqueio do eixo clássico do SRA (Abu Nabah et al., 2007; Dalbeth et al., 2005; Price et al., 2007), o presente estudo teve como objetivo principal avaliar os dois eixos do sistema em modelo experimental de artrite. Ainda, buscamos compreender o mecanismo pelo qual a modulação farmacológica do SRA resulta em atividade anti-inflamatória. A partir do entendimento do efeito modulatório do SRA na artrite experimental, esperamos sugerir novas opções terapêuticas para a artrite, considerando-se que é uma doença de caráter crônico, incapacitante e de difícil manuseio [American College of Rheumatology (2002; Firestein, 2005; Schett and Firestein), 2010].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito e mecanismos de ação anti-inflamatória da modulação farmacológica dos eixos do sistema renina-angiotensina - eixo clássico (ECA – Ang II – AT₁) e eixo contra-regulatório (ECA2 – Ang-(1-7) – Mas) - em modelos de artrite experimental.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1- Avaliar o efeito do bloqueio do receptor AT₁, através da utilização do seu antagonista, Losartan, sobre a resposta inflamatória em dois modelos experimentais de artrite: agudo (artrite induzida por antígeno em camundongos) e crônico (artrite induzida por adjuvante em ratos), por meio da medida de hiperalgesia, do influxo de neutrófilos, da liberação das citocinas (TNF- α , IL-1), da quimiocina (CXCL1/CINC) e das alterações histológicas no tecido periarticular;

2.2.2- Verificar o perfil de expressão do receptor Mas nos tecidos articulares após indução de artrite por antígenos e avaliar o perfil inflamatório de artrite induzida por antígeno em camundongos com deleção genética do receptor Mas (Mas^{-/-});

2.2.3- Avaliar o efeito da ativação do receptor Mas, através da utilização de Ang-(1-7) ou do agonista, AVE 0991, sobre a resposta inflamatória em modelos experimentais de artrite aguda (artrite induzida por antígeno) e crônica (artrite induzida por adjuvante), por meio da medida de hiperalgesia, do influxo de neutrófilos, da liberação das citocinas (TNF- α , IL-1), da quimiocina (CXCL1/CINC) e das alterações histológicas no tecido periarticular;

2.2.4- Avaliar mecanismos do efeito anti-inflamatório de Losartan ou AVE 0991 em modelo de artrite induzida por antígeno com foco nos níveis articulares de citocinas e nas interações leucócito/endotélio na microcirculação sinovial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6 e camundongos com deleção genética do proto-oncogene Mas (Mas knockout – Mas^{-/-}), criados a partir de camundongos C57Bl/6, todos com idade entre 8-10 semanas e ratas Holtzman pesando entre 140-170 g. Todos os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-UFMG) e os procedimentos experimentais devidamente aprovados pelo Comitê de Ética da UFMG (CETEA 166/06).

3.2 Modelos murino de indução de artrite reumatóide.

Para investigar o papel do SRA, no processo inflamatório que acomete as articulações durante a instalação da artrite reumatóide, foram utilizados dois modelos que reproduzem as principais alterações verificadas na patologia.

O primeiro modelo experimental de artrite é induzido pela administração intra-articular de albumina bovina metilada (mBSA) como antígeno que desencadeia a resposta imune após estímulo prévio (desafio) (Coelho et al., 2008). O segundo modelo experimental de artrite foi induzido em ratas por meio da administração intradérmica de *Micobacterium butiricum* (Barsante et al., 2005). Tais modelos representam, respectivamente, um modelo agudo (horas) e um modelo crônico (dias) de lesão articular. Foram utilizados dois modelos para melhor caracterização e validação dos efeitos obtidos como os tratamentos propostos.

3.2.1 Indução de artrite por antígeno (AIA): imunização e desafio com albumina bovina metilada (mBSA)

Camundongos machos foram imunizados, a partir da administração subcutânea (s.c.), de uma emulsão contendo adjuvante completo de Freund (CFA) e PBS 1x, numa proporção de 1:1 (50 µL de PBS 1x e 50 µL de CFA). Esta emulsão continha 500 µg de mBSA, que foi previamente dissolvida no PBS 1x e então homogeneizada em seringa de vidro durante 15 minutos e injetada na base da cauda dos animais (50 µL à direita e 50 µL à esquerda da base da cauda). No 14º dia após a imunização, os animais foram desafiados a partir de uma injeção intra-

articular de mBSA (10 µg em 10 µL de PBS 1x) na articulação fêmur-tibial traseira direita. Todos os parâmetros foram avaliados 24 horas após o desafio, momento em que ocorre o pico da resposta inflamatória neste modelo (Coelho et al., 2008). Alguns dos parâmetros inflamatórios apresentados pelos animais neste modelo são: aumento de neutrófilos intra-articular e periarticular, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, alterações histológicas evidenciando lesão articular, aumento de hipernocicepção, etc.

3.2.2 Indução de artrite por adjuvante (AdIA): imunização e desafio com *Micobacterium butiricum*

Ratas Holtzman foram imunizadas a partir da administração intradérmica (i.d.), de uma emulsão contendo H₂O destilada e óleo mineral, numa proporção de 1:10 (20µL de H₂O e 180 µL de óleo). A esta emulsão acrescentou-se 400 µg de *Micobacterium butiricum*, que foi homogeneizada intensamente em seringa de vidro durante 15 minutos. Em seguida, foram injetados 200 µL dessa emulsão na base da cauda dos animais (100 µL à direita e 100 µL à esquerda). Os animais foram acompanhados durante 16 dias, sendo que o início dos sintomas ocorreu no 10^o dia após a imunização. Todos os parâmetros foram avaliados no 16^o dia, exceto o edema articular que foi verificado diariamente. A cinética inflamatória verificada neste modelo foi previamente descrita por Barsantes e cols (2005) e reproduzida neste estudo. Alguns dos parâmetros inflamatórios apresentados pelos animais neste modelo são: aumento de neutrófilos periarticular, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, alterações histológicas evidenciando lesão articular, aumento de hipernocicepção, presença de edema periarticular importante, déficit funcional de marcha.

3.3 Protocolos de tratamento e grupos experimentais:

3.3.1 Modelo de artrite em camundongos (AIA)

Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos:

- ✓ **CT - controle:** camundongos imunizados com emulsão de CFA + mBSA (5 µg/µL) e desafiados com PBS 1x intra-articularmente (10 µL);

- ✓ **VE - veículo:** camundongos imunizados com emulsão de CFA + mBSA (5 µg/µL) e desafiados com mBSA intra-articularmente (10 µg em 10 µL de PBS 1x) e tratados com PBS 1x ou PBS + KOH (10 mM) estéril, 30 minutos antes e 6h após o desafio. As injeções foram administradas por via subcutânea;
- ✓ **TT- tratamento:** camundongos imunizados com emulsão de CFA + mBSA (5 µg/µL) e desafiados com mBSA intra-articularmente (10 µg em 10 µL de PBS 1x) e tratados com Losartan (1, 3 e 10 mg/kg), AVE 0991 (0,6, 3 e 15 mg/kg) ou Ang-(1-7) (2 mg/kg), 60 minutos antes e 6h após o desafio;

Tecidos e fluidos coletados

A- Lavado articular: foi coletado da articulação fêmur-tibial em solução de BSA 3%, para as posteriores contagens total e diferencial dos leucócitos.

B- Tecidos periarticulares: após a coleta do lavado articular, os tecidos moles das regiões adjacentes à articulação fêmur-tibial foram removidos e estocados à -70° C, para ensaios de MPO, citocinas *Western blot*.

C- Articulação completa do joelho para análise histopatológica: toda a região da articulação fêmur-tibial foi removida cirurgicamente e dissecada, mantendo-se o invólucro muscular. A secção foi realizada entre o terço distal do fêmur e o terço proximal da tibia/fíbula.

Parâmetros avaliados:

- ❖ neutrófilos do tecido periarticular;
 - ❖ contagem total e diferencial das células inflamatórias do lavado articular;
 - ❖ concentração de citocinas teciduais;
 - ❖ hipernocicepção (teste de pressão crescente na pata do camundongo);
 - ❖ rolamento e adesão leucocitária;
 - ❖ pressão arterial sistólica;
 - ❖ histologia da articulação – índice de acometimento articular;
-
-

❖ expressão do receptor Mas no tecido periarticular.

As técnicas utilizadas para estas análises estão descritas na seção 3.4.

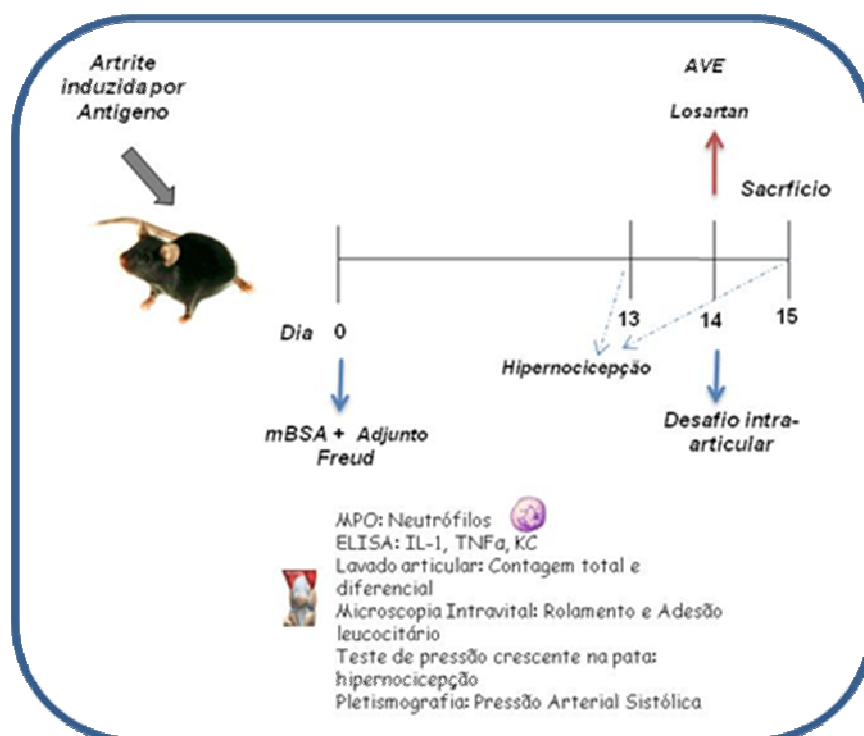


Figura 5 Protocolo Experimental da Artrite induzida por Antígeno (mBSA) em camundongos.

3.3.2 Modelo de artrite em ratas (AdIA)

As ratas foram divididas nos seguintes grupos:

- ✓ **CT - controle:** ratas imunizadas com emulsão de Óleo + água (200 μ L);
- ✓ **VE - veículo:** ratas imunizadas com emulsão de Óleo + água + *M. butiricum* (400 μ g em 200 μ L) e tratadas com água filtrada ou água + KOH (10 mM), diariamente, do 10^o ao 16^o dia. O tratamento foi administrado através da técnica de gavagem, volume de 500 μ L, uma vez ao dia.
- ✓ **TT- tratamento:** ratas imunizadas com emulsão de Óleo + água + *M. butiricum* (400 μ g em 200 μ L) e tratadas com Losartan (1, 3 e 10 mg/kg) ou AVE 0991 (0,6, 3 e 15 mg/kg), diariamente, do 10^o ao 16^o dia. Os tratamentos foram administrados pela técnica de gavagem, em um volume de 500 μ L, uma vez ao dia.

Tecidos coletados

A- Tecidos periarticulares: os tecidos moles das regiões adjacentes à articulação do tornozelo foram removidos e estocados à -20° C, para ensaios de MPO e citocinas.

C- Articulação completa do tornozelo para análise histopatológica: toda a região da articulação radio-carpal do membro anterior direito foi removida cirurgicamente e dissecada, mantendo-se o invólucro muscular. A secção foi realizada entre o terço distal do fêmur e o terço proximal da tibia/fíbula.

Parâmetros avaliados:

- ❖ neutrófilos do tecido periarticular;
- ❖ concentração de citocinas teciduais;
- ❖ edema articular;
- ❖ histologia da articulação – índice de acometimento articular;

As técnicas utilizadas para estas análises estão descritas na seção 3.4.

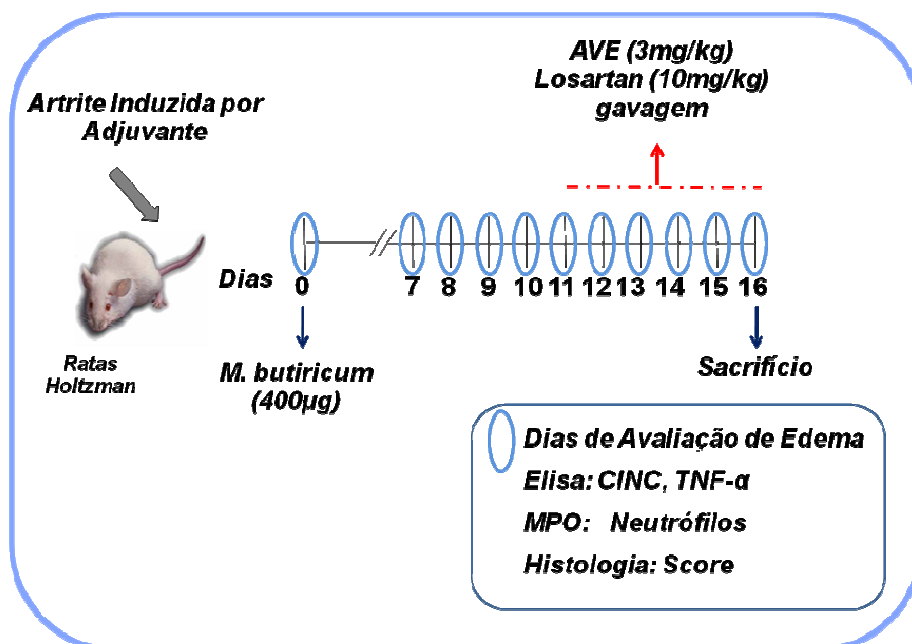


Figura 6 Protocolo Experimental da Artrite induzida por Adjuvante (*M. butircum*) em ratos.

3.3.3 Preparação das drogas:

Losartan, AVE 0991 e veículo foram preparados segundo descrição abaixo. A preparação só diferiu em relação ao meio no qual os compostos foram dissolvidos: PBS 1x estéril, para administração subcutânea (modelo de AIA em camundongos) e água filtrada, para administração por gavagem (modelo de AdIA em ratas).

Losartan: diluído diretamente em PBS 1x estéril ou água filtrada e mantido em agitação contínua (vórtex) e no gelo, até o momento do uso.

AVE 0991: diluído em KOH 10 mM e, em seguida, completado o volume com PBS 1x estéril ou água filtrada para a concentração desejada. A proporção utilizada de KOH e PBS foi de 1:10. A solução foi homogeneizada (sonicador), mantida em agitação contínua (vórtex), no gelo e protegida da luz, até o momento do uso.

Ang-(1-7): diluída em PBS 1x estéril e mantida em agitação contínua (vórtex) e no gelo, até o momento do uso.

Veículo de AVE 0991: KOH 10 mM em PBS 1x estéril ou água filtrada, na proporção de 1:10.

Veículo de Losartan e Ang-(1-7): PBS 1x estéril ou água filtrada.

3.4 Parâmetros avaliados

3.4.1 Migração de neutrófilos para a cavidade articular

Após 24h do desafio, os camundongos foram anestesiados com cetamina (150 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e, posteriormente, sacrificados. Para avaliar a migração de leucócitos (neutrófilos) para a cavidade articular, foi obtido lavado intra-articular. Este procedimento consistiu na injeção de 20 μ L de solução de BSA 3% na cavidade articular, lavando-a três vezes para coleta de amostra das células presentes no interior da cavidade. O lavado de células articulares foi diluído em 180 μ L de BSA 3% para posterior contagem total e diferencial dos leucócitos.

3.4.1.1 Contagem total dos leucócitos

Alíquotas de 30 μL do lavado articular foram diluídas em 60 μL de solução Turk, sendo a contagem total dos leucócitos realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio óptico (aumento de 100x) e contador manual. O número total de leucócitos foi utilizado para cálculo da percentagem dos diferentes leucócitos encontrados no lavado articular a partir da contagem/discriminação por visualização de lâminas preparadas por citocentrifugação sob microscópio óptico.

3.4.1.2 Contagem diferencial dos leucócitos

As lâminas para contagem diferencial dos leucócitos foram preparadas por citocentrifugação de uma alíquota de 70 μL do lavado articular (cyospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, Pennsylvania, USA). As lâminas foram coradas segundo a técnica de May-Grumwald e giemsa e examinadas em microscópio óptico, objetiva de imersão em óleo (aumento de 1.000x), usando critérios morfológicos para diferenciar os tipos celulares. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos $\times 10^4$ / cavidade articular.

3.4.2. Citocinas por ensaio imuno-enzimático (ELISA)

Processamento do tecido periarticular:

O tecido periarticular de camundongos e ratas foi coletado para ensaios imuno-enzimáticos e da atividade da mieloperoxidase (MPO). O tecido foi pesado e acondicionado em eppendorfs, sendo acrescentada solução de extração de citocinas (1 mL de solução para cada 100 mg de tecido). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (10.000 g , 10 minutos, 4^o C). O sobrenadante foi retirado para a quantificação de citocinas por ELISA. A fração residual decantada (*pellet*) foi utilizada para o ensaio de quantificação indireta de neutrófilos.

Ensaio bioquímico:

Os kits de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) foram utilizados para medida de citocinas em camundongos (TNF- α , CXCL1 e IL-1 β) e ratas (TNF- α , CINC e IL-1 β), de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante.

Resumidamente, concentrações das citocinas foram avaliadas no sobrenadante do tecido periarticular, na diluição 1:3 em BSA 0,1%. Em placa de 96 poços, foram adicionados 100 μ l/poço de solução contendo anticorpo captura específico para cada citocina. Essa solução permaneceu em contato com a placa durante 24 h à 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas (4 vezes), com tampão PBS 1x / Tween 0,1%, em lavador de placas automático (Bio-Tec instruments Inc, ELX 50, USA). Em seguida, foram adicionados 200 μ l/poço da solução de bloqueio (BSA 1% em PBS 1x). O tempo de bloqueio foi de, no mínimo, 1 hora. Após este procedimento, foram adicionadas as concentrações padrão de citocinas, as amostras e o branco (BSA 0,1%) (100 μ l/ poço) para incubação por 24h à 4°C. Após este período, a placa foi lavada e foram adicionados 50 μ l de anticorpo de detecção, diluído em PBS 1x, durante 1 h, em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Após 30 min, a placa foi novamente lavada, sendo adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H₂O₂ (Merck). A reação foi interrompida pela adição de 100 μ l de ácido sulfúrico 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em leitor de placas (Molecular Devices, Spectra Max 190, USA), no comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos como pg de citocina por 100 mg de tecido.

3.4.3 Atividade da Mieloperoxidase (MPO)***Processamento tecidual:***

Para avaliar o acúmulo de neutrófilos no tecido periarticular de camundongos e ratas, foi utilizado o método de quantificação da atividade de MPO, como descrito previamente (De-Matos et al., 2001). Resumidamente, o tecido periarticular removido foi pesado e processado em solução de extração de citocinas (vide seção 3.4.2).

Após homogeneização e centrifugação, o sobrenadante foi coletado e estocado para quantificação de citocinas. O componente residual (*pellet*) foi ressuspensionado no tampão 1 (NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M, Na₂ EDTA 0,015 M – pH 4,7) na proporção de 1,9 mL para cada 10mg de tecido, e submetido à homogeneização e centrifugação (10.000 g, 10 minutos).

O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensionado em NaCl 0.2% gelado seguido por NaCl 1.6% com glicose 5% gelada (1,5 mL para cada 100 mg de tecido). Realizou-se nova centrifugação 10.000 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado no tampão 2 (Na₃PO₄ 0,05 M, HETAB 0,5% p/v – pH 5,4) e homogenizado por 30 segundos. O volume total de cada amostra foi congelado e descongelado por 3 vezes em nitrogênio líquido, submetido à centrifugação (10.000 g, 15 minutos), sendo o sobrenadante coletado para ensaio de MPO.

Ensaio bioquímico:

As amostras do tecido periarticular de camundongos e de ratas foram diluídas 1:3. Em seguida, as amostras foram adicionadas à placa de 96 poços (25 µl/poço). Tetrametil-benzina (TMB - 1.6 mM em dimetilsulfóxido) foi adicionada a cada poço (25µl/poço) e a placa incubada a 37°C, por 5 minutos. Foram adicionados 100 µl/poço de água oxigenada (H₂O₂ - 0,002%) e a placa foi novamente incubada a 37°C, durante 5 minutos. A reação de cor foi interrompida pela adição de 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄ - 1M). A atividade da MPO das amostras foi detectada por colorimetria em leitor de placas (Molecular Devices, Spectra Max 190, USA), no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos (Unidades Relativas) por comparação da O.D. do sobrenadante do tecido com neutrófilos do pulmão de camundongos, processados da mesma maneira.

3.4.4 Histologia

As articulações fêmur-tibial dos camundongos e radiocarpal das ratas foram removidas cirurgicamente e dissecadas, mantendo-se o invólucro muscular. Os espécimes obtidos foram fixados em formol 10% tamponado, durante 24 horas. Inicialmente, as amostras foram lavadas em água corrente e desmineralizadas em solução de EDTA 10%, pH 7.2, em temperatura ambiente, por um período de três semanas (a solução era renovada a cada 3 dias). Em seguida, as peças foram novamente lavadas em água corrente, desidratadas em banhos de álcool 70%, 80%, 90% e 100%; diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. O material foi seccionado em micrótomo RM2125RT (Leica, Heerbrugg, St. Gallen, Switzerland), obtendo-se cortes consecutivos de 5 μ m, que foram corados pela técnica da Hematoxilina & Eosina (HE).

Quantificação do grau de lesão articular (escore histológico)

Os cortes histológicos, corados em H&E, foram avaliados em microscópio óptico, nos aumentos de 40x, 100x ou 400 x. O grau de acometimento articular nos camundongos foi mensurado com base em escore semiquantitativo previamente descrito (Coelho et al., 2008; Williams et al., 2007). A presença de hiperplasia sinovial, exsudato celular e erosão de cartilagem e/ou dos ossos foi pontuada, segundo a intensidade, em valores de 0 (ausência) a 3 (alterações acentuadas), enquanto a extensão do infiltrado sinovial foi quantificada numa escala de 0 a 5. A partir destas quantificações, foi obtido o *índice de artrite*.

Para o modelo de AdIA, foi utilizado outro escore previamente descrito por Barsantes e cols. (2005). Tal escore baseia-se na presença de erosão de cartilagem, infiltrado celular, edema e destruição óssea, sendo cada item pontuado, segundo a intensidade, em valores de 0 (ausência) a 3 (alterações acentuadas).

Quantificação da perda de proteoglicanos

Seções (4 μ m) da articulação tibio-társica dos camundongos e da articulação radiocárpica dos ratos foram corados com azul de toluidina (AT) a fim de

estimar o conteúdo de proteoglicanos presente na articulação, conforme descrito previamente por Bolon et al. (2004) e Urech et al. (2010). Os cortes foram deparafinizados em xilol e hidratados com água. A coloração de AT foi realizada com uma solução contendo 1 % AT (Synth, Diadema, SP, Brasil), diluído em tampão fosfato (pH 5,7) durante 2 minutos. Em seguida, os cortes foram rapidamente desidratados em etanol 96% e acetona (p.a.), lavados em PBS 1x por um minuto, imersos em xileno e montados.

Após os procedimentos de histoquímica, imagens da superfície articular de cada amostra foram digitalizadas (aumento de 100x) para avaliação da cartilagem. A área da cartilagem que apresentava positividade para AT foi obtida a partir da seleção dos pixels corados correspondentes à AT, seguido pela criação de uma imagem binária, usando o software Image J (National Institutes of Health) da mesma forma, a área total de cartilagem foi calculada a partir da seleção dos pixels totais. Assim, o conteúdo de proteoglicano foi apresentado como o percentual da área de coloração AT-positiva em relação à área total da superfície da cartilagem.

3.4.5 Hipernocicepção (teste de pressão crescente)

A hipernocicepção foi avaliada pelo teste de pressão crescente na pata do animal, utilizando anestesiômetro eletrônico (Insight Equipamentos, São Paulo, Brasil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força (g). O aparelho foi calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de pressão à pata foi realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno com ou 4,15 mm² de área. Os animais foram alocados em caixas de acrílico, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. As caixas mediam 12 x 10 x 17 cm e seu assoalho era constituído por uma rede (malhas de 5 mm²) de arame não maleável com 1 mm de espessura. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das patas dos animais. Foi aplicada, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produzisse uma resposta de retirada (*flinch*) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar três medidas similares.

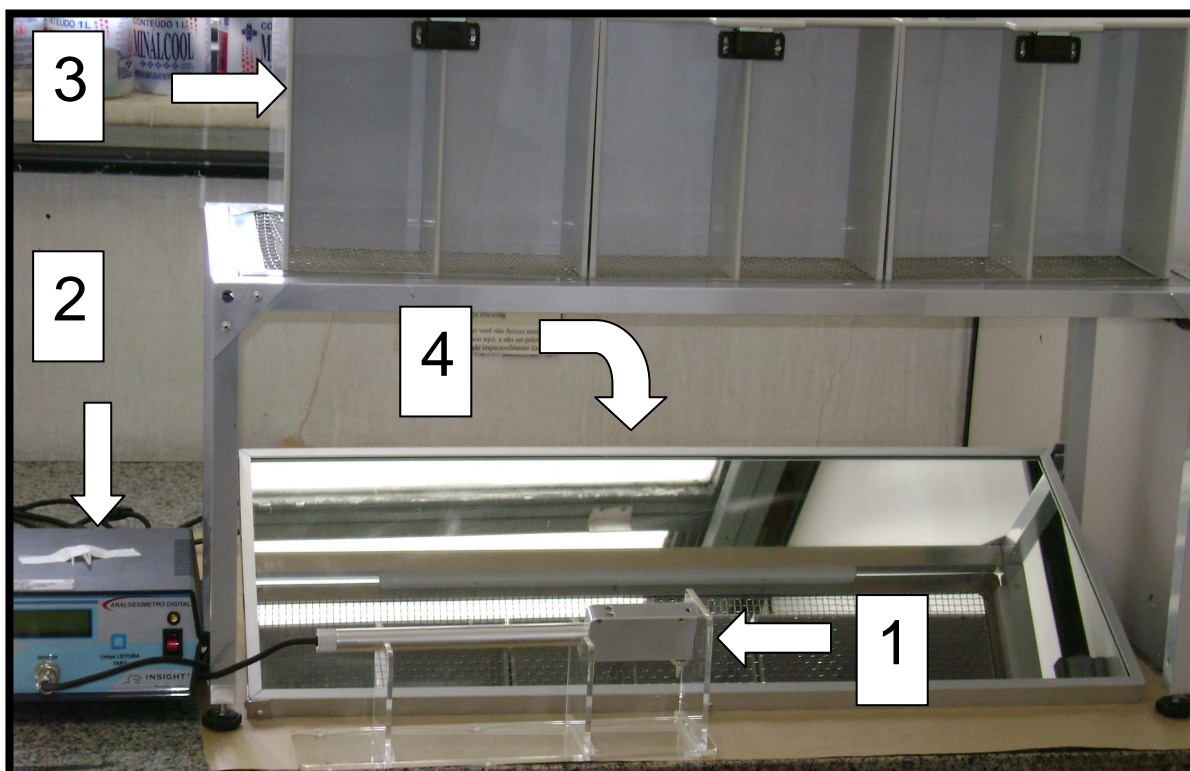


Figura 7 Foto do equipamento utilizado no teste de pressão crescente na pata de camundongo. A foto apresenta o anestesimetro eletrônico (INSIGHT EQUIPAMENTOS, SÃO PAULO, BRAZIL), constituído por transdutor de pressão (1) conectado a um contador digital de força (2), as caixas de acrílico (12 x 10 x 17 cm de altura) e os espelhos inclinados (4), abaixo do assoalho, que permitiram a visualização das patas traseiras dos animais.

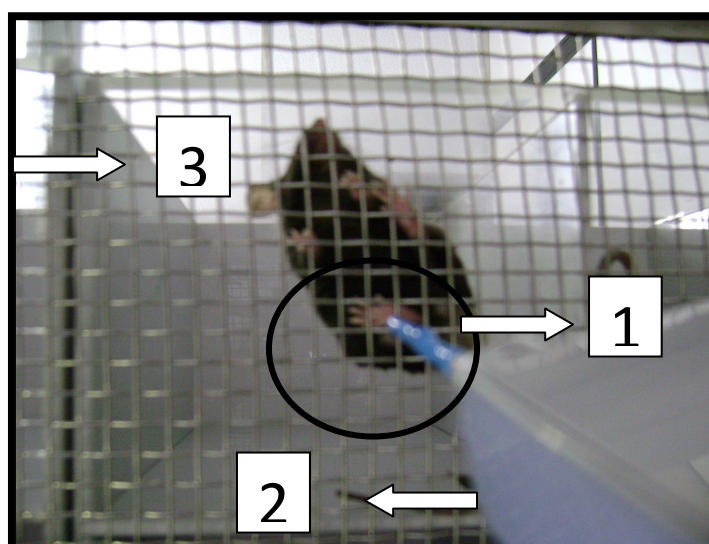


Figura 8 Foto no momento do teste de pressão crescente na pata de camundongo. A foto apresenta a ponteira de polipropileno (1) acoplada ao transdutor de força (2) em contato com a pata do animal (círculo vermelho). Ao aplicar-se, por entre as malhas da rede do assoalho (3), uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal, obtém-se uma resposta de retirada (*flinch*).

A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se a média de três valores expressos em gramas (força) observados antes do procedimento experimental (tempo 0), que correspondia ao período anterior ao desafio dos animais com mBSA, da média de três valores em gramas (força) 24 horas após o desafio e/ou após os tratamentos, segundo protocolo experimental específico. Os testes nociceptivos foram realizados entre 08:00 e 16:00 horas.

3.4.6 Pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi avaliada pela pletismografia de cauda (Fujii et al., 2006; Krege et al., 1995; Whitesall et al., 2004). Os camundongos, acordados, foram colocados em contensor acrílico, com temperatura interna constante (37° C), por um período máximo de 5 minutos, suficiente para cada medida de PAS. Sobre a cauda dos animais, foram acoplados manguito e sensor de frequência cardíaca, interligados a um programa de aquisição de dados (XBP1000 Series Rat Blood Pressure System – Kent Scientific, Torrington, CT – USA). Foram realizadas 3 a 5 medidas da PAS, com intervalo mínimo de 60 segundos entre elas.

Para minimizar o estresse causado pela contenção e manipulação, cada animal foi submetido ao mesmo procedimento experimental pelo menos 5 vezes nos 2 dias que antecederam a medida propriamente dita da PAS (período de adaptação). As medidas de PAS foram realizadas no 12^o e 13^o dias após a imunização (período de adaptação), no 14^o dia (medida anterior ao desafio e aos tratamentos) e 24 horas após o desafio.

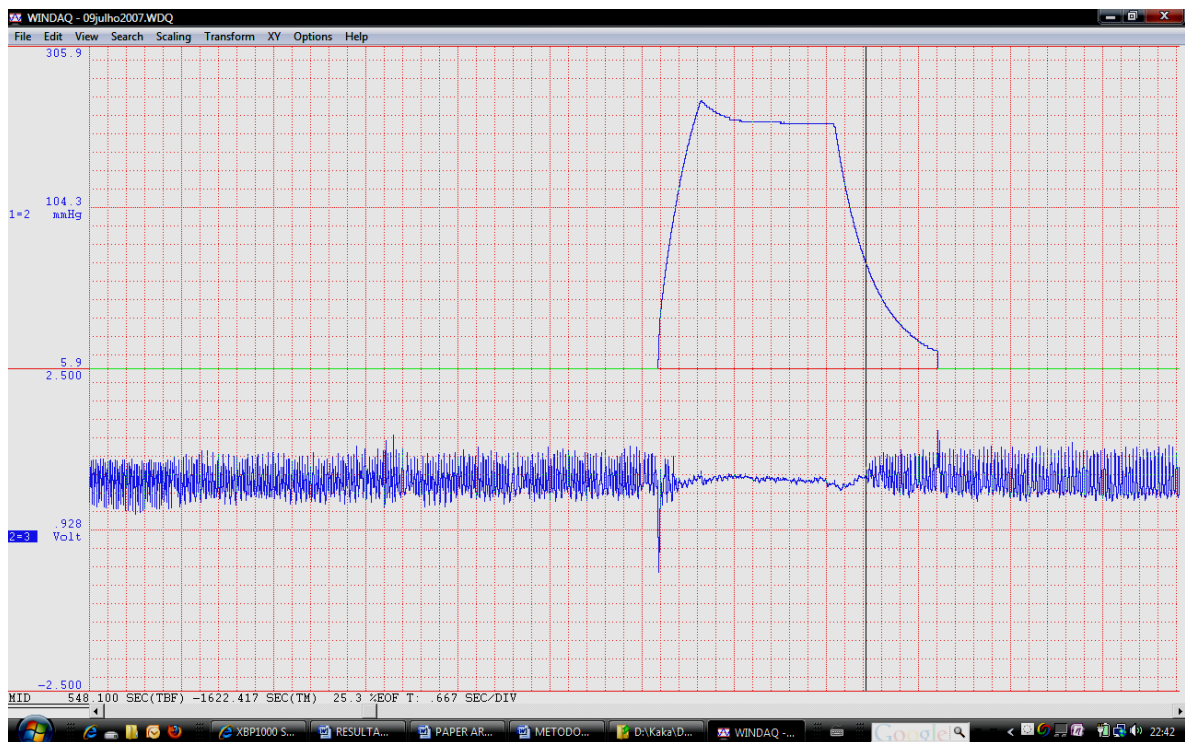
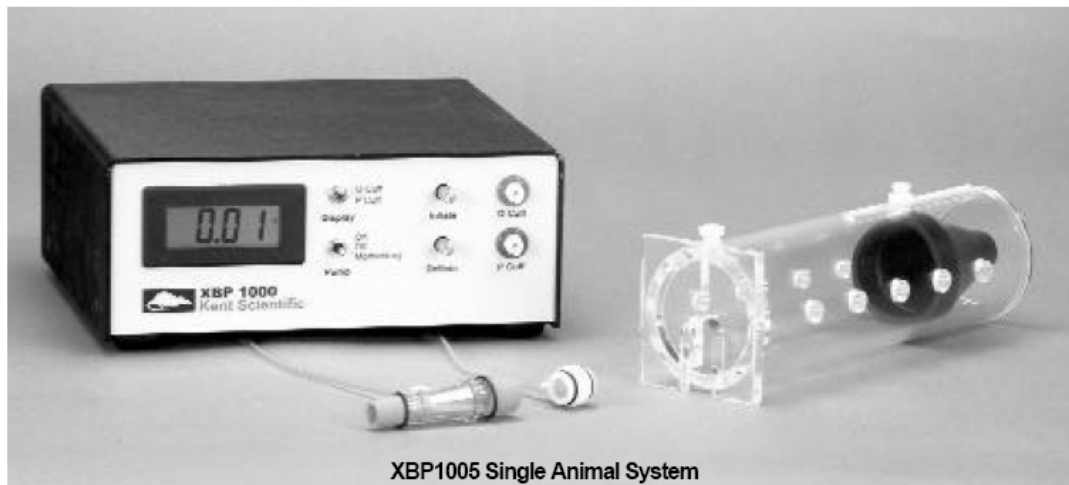


Figura 9 Pletismografia de cauda para mensuração da pressão arterial sistólica de camundongos. Em **A** visualiza-se o manguito e sensor de frequência cardíaca, **B** destaca a câmara de contenção do camundongo e **C** o registro das variáveis (PAS e FC) pelo software em forma de gráficos na tela do computador.

3.4.7 Interação leucócito-endotélio (microscopia intravital)

A técnica de microscopia intravital foi utilizada para visualização do recrutamento de leucócitos através do endotélio da microvasculatura da articulação fêmur-tibial de camundongos. Sob anestesia, foi injetada Rodamina 6G (0,3 mg/kg, i.v., veial caudal), corante fluorescente que possibilita a visualização de leucócitos, mesmo em altos fluxos. Para a visualização dos vasos sanguíneos (vênulas), foi realizada ressecção do tendão patelar. A fluorescência associada à Rodamina 6G foi visualizada por meio de epi-iluminação em 510-560 nm, usando filtro de emissão de 590 nm de microscópio Olympus BX40 (Olympus Optical CO, Japão), sob objetiva de 20X. O rolamento e a adesão celular na parede dos vasos foram registrados por câmera de vídeo (Optronics, CA, USA), acoplada ao microscópio. As imagens foram, então, gravadas em vídeo-cassete (VHS, Semp Toshiba, modelo x685) para posterior contagem do número de leucócitos em rolamento e aderidos ao longo da parede dos vasos. Foram considerados aderidos, os leucócitos que permaneceram imóveis no endotélio vascular por um período mínimo de 30 segundos, e esta adesão foi quantificada pelo número total de células aderidas em 100µm de comprimento da vênula. O rolamento foi considerado para os leucócitos que migravam da região central para a margem do vaso e se moviam a uma velocidade menor que a dos eritrócitos. Foram avaliados três a quatro vasos sanguíneos por animal e os resultados de rolamento e adesão foram expressos como número de células/min e número de células/100µm, respectivamente.

A técnica de microscopia intravital foi realizada em camundongos submetidos ao modelo de AIA e realizada 24 horas após o desafio. Os tratamentos específicos com antagonista de receptor de Ang II, Losartan, com agonista do receptor Mas, AVE 0991, ou veículo, foram administrados 30 minutos antes do procedimento da microscopia intravital, em dose única por via subcutânea.

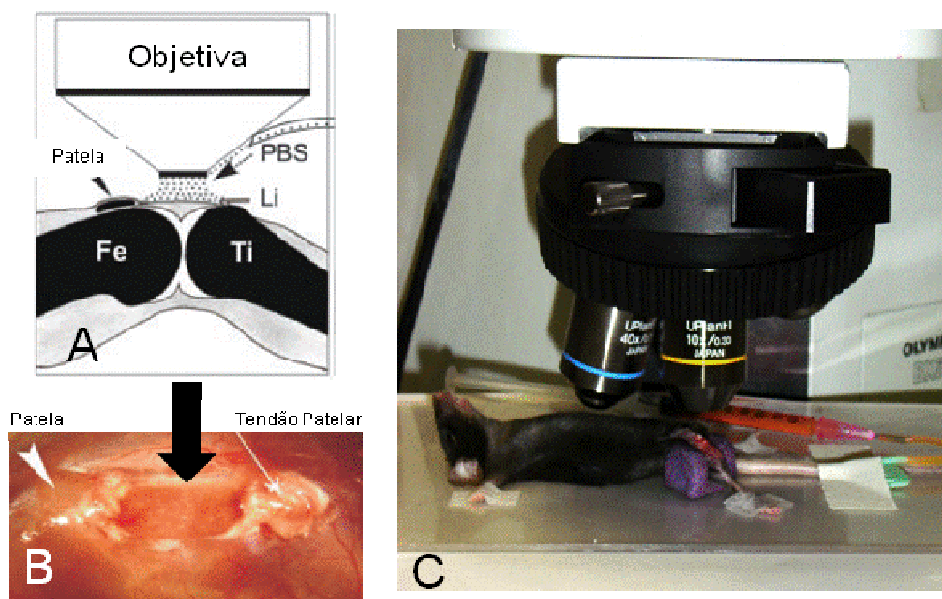


Figura 10 Foto da microscopia intravital da microvasculatura do joelho. A) Representação esquemática da preparação da articulação fêmur-tibial sob a objetiva. Fe, fêmur; Ti, tíbia; Li, lamínula; PBS, solução de tampão fosfato; B) Foto da região visualizada na microscopia intravital (seta preta); C) Foto da articulação fêmur-tibial sob microscopia.

3.4.8 Avaliação da expressão do receptor Mas de Ang-(1-7) no tecido periarticular de camundongos por Western Blot

Ao extrato de células obtido do homogenato de tecido periarticular do joelho dos camundongos desafiados com mBSA ou PBS 1x s, foi adicionada solução de lise (Triton X-100 1%; Tris/HCl 100 mM, pH 8.0; glicerol 10%; EDTA 5 mM; NaCl 200 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM, NaF 25mM; leupeptina 2,5 µg/ml; aprotinina 5 µg/ml e sódio ortovanadato 1 mM), mantendo-se em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, o lisado foi centrifugado a 13.000 g, por 10 minutos, a 4° C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -70° C até o momento de uso. A concentração das proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford, utilizando-se o kit *Bio-Rad Assay* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Amostras contendo 40µg de proteínas totais foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% a 100 V por 1,5 h e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Piscataway, NJ), conforme protocolo do “Kit Bio-Rad Transferency” (Bio-Rad Laboratories, USA). Após transferência, as membranas

foram coradas com “ponceau” e bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente, utilizando-se PBS1x contendo 0,1% de Tween-20 e 5% de leite em pó desnatado.

As membranas foram primeiramente lavadas por três vezes em PBS 1x - Tween-20 0,1%, e posteriormente, incubadas com o anticorpo policlonal anti-Mas (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) a 4°C, por 18-20 horas, em solução de PBS/Tween contendo 5% de BSA. As membranas foram lavadas novamente em PBS/Tween por três vezes e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo secundário anticoelho ligado à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) na diluição de 1:3000 em solução PBS/Tween contendo 5% de leite em pó desnatado. Após nova sessão de lavagens (3 vezes em PBS/Tween), as membranas foram incubadas em solução reveladora “ECL-Plus” (GE Healthcare, Piscataway, NJ), expostas contra filme de raio X em intervalos de 30 segundos a 20 minutos (Hyperfilm ECL, Amersham, Pharmacia), e revelados utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante. Como controle interno da quantidade de extratos protéicos aplicados às diferentes canaletas, foi realizado o *immunoblot* das membranas com o anticorpo anti- β -tubulina (Sigma Aldrich).

3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software Prism, versão 4.0 (GraphPad Software, Inc, Califórnia, USA). Todos os dados apresentaram distribuição normal, segundo teste de normalidade de Shapiro. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Diferenças entre os grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguidas por pós-teste Student-Newman-Keuls. A significância estatística foi ajustada em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do bloqueio do receptor AT₁ na artrite experimental.

4.1.1 Efeitos anti-inflamatórios do antagonista de AT₁, Losartan em camundongos com artrite induzida por antígeno - AIA.

Estudos prévios do nosso grupo, avaliando a cinética do processo inflamatório no modelo de artrite, demonstraram a ocorrência de aumento progressivo de células inflamatórias (neutrófilos) no tecido periarticular, bem como na cavidade articular acometida horas após a administração do agente antigênico (mBSA, 10µg/cavidade). De acordo com observação anterior, o pico da migração de neutrófilos para a região acometida ocorre 24 horas após o desafio (Coelho et al., 2008); dessa forma, o efeito da administração do antagonista do receptor angiotensinérgico do tipo 1 (AT₁), Losartan, sobre parâmetros inflamatórios foi avaliado neste tempo.

A artrite induzida por mBSA produziu significativo aumento no recrutamento de neutrófilos 24 h após o desafio. Em decorrência disso, os tecidos periarticulares (**Figura 11A**) e a cavidade sinovial dos camundongos artríticos apresentaram número significativamente maior de neutrófilos do que os animais controle, não desafiados (**Figura 11B**). A administração de Losartan, na dose de 10 mg/kg, reduziu significativamente a quantidade de neutrófilos nos tecidos periarticulares (**Figura 11A**). Além disso, como representado na figura **11B**, as doses de 3 e 10 mg/kg de Losartan produziram efeito semelhante na cavidade sinovial, com redução significativa do número de neutrófilos.

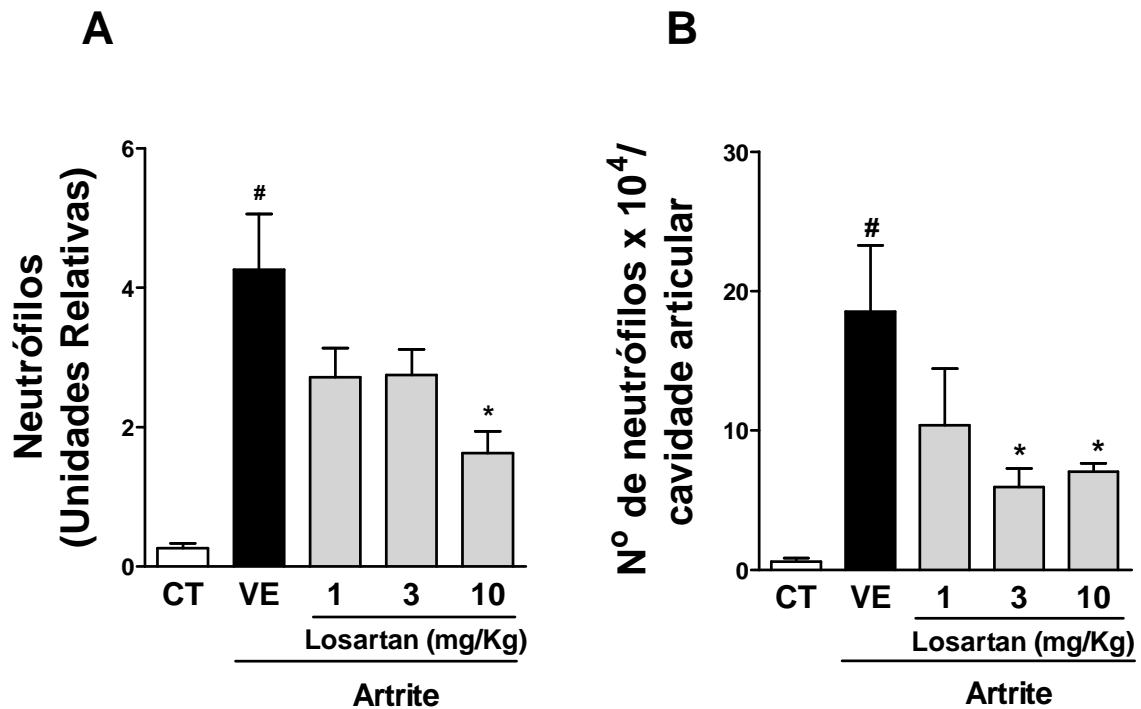


Figura 11. Efeito da administração de Losartan sobre a migração de neutrófilos em modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). Losartan (1, 3 ou 10 mg/kg) ou veículo – VE – (PBS 1x estéril) foram administrados (i.p.) 60 min antes e 6 h após o desafio com 10 µg de albumina bovina metilada (mBSA). O número relativo de neutrófilos no tecido periarticular, determinado pela atividade da mieloperoxidase (A), e o número de neutrófilos na cavidade sinovial (B) foram avaliados 24 h após a indução da artrite (administração de mBSA) ou após injeção de 10 µl de salina estéril (controle – CT) dentro da articulação fêmur-tibial (joelho) dos camundongos imunizados. As barras representam médias ± EPM de 8 camundongos por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

As concentrações das citocinas TNF- α e IL-1 β , bem como da quimiocina CXCL1, de camundongos com AIA foram comparadas às concentrações presentes nos tecidos periarticulares de camundongos controle, não desafiados com mBSA. Os animais artríticos apresentaram elevação dos níveis das três citocinas estudadas, em comparação ao grupo controle (**Figura 12**). O tratamento com Losartan (10 mg/kg) reduziu os níveis teciduais de TNF- α (**Figura 12A**) e CXCL1 (**Figura 12B**), entretanto não modificou os níveis de IL-1 β (**Figura 12C**) nos tecidos periarticulares dos animais.

A inibição do recrutamento de neutrófilos esteve associada com a redução nos níveis de CXCL1 e TNF- α durante tratamento com Losartan, que não alterou os níveis de IL-1 β .

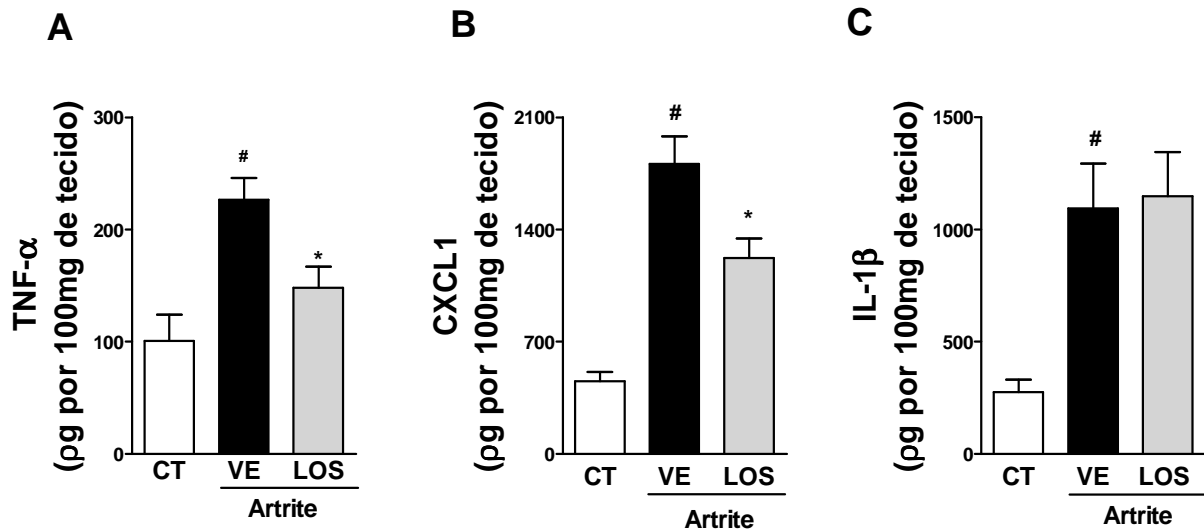


Figura 1. Efeito da administração de Losartan sobre a concentração de citocinas teciduais em modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). Losartan (10 mg/kg) ou veículo – VE (PBS 1x estéril) foram administrados (i.p.) 60 min antes e 6 h após o desafio com 10 μ g de albumina bovina metilada (mBSA). As concentrações de TNF- α (A), CXCL1 (B) e IL-1 β (C), presentes nos tecidos periarticulares do joelho, foram determinadas por ELISA, 24 h após a indução da artrite (administração de mBSA) ou após injeção de 10 μ l de salina estéril (controle – CT) dentro da articulação fêmur-tibial (joelho) dos camundongos imunizados. As barras representam médias \pm EPM de 8 camundongos por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

As análises histológicas mostraram que o extravasamento de leucócitos, com conseqüente formação de agregados no tecido sinovial e hiperplasia estavam presentes nos animais imunizados e desafiados com mBSA (Figura 14C, 14D) quando comparado aos animais controle (Figura 14A, 14B). A administração de Losartan (10 mg/kg) aos animais AIA reduziu o infiltrado inflamatório e a hiperplasia sinovial (Figura 14E, 14F). A análise semiquantitativa destes cortes histológicos confirmou estes achados (Figura 14G). Além disso, avaliou-se também a perda de proteoglicanos dos animais, sendo possível observar a ocorrência de perda significativa de proteoglicanos nos animais imunizados e desafiados com mBSA, veículos – NaCl 0,9%, (Figura 13B) quando comparado ao grupo controle (Figura 13A).e, corroborando com a redução da atividade da doença, observada nos animais tratados com Losartan, o percentual de perda de proteoglicanos, nestes

animais, foi significativamente menor (**Figura 13C**). A avaliação semiquantitativa da perda foi representada graficamente na **figura 13D**.

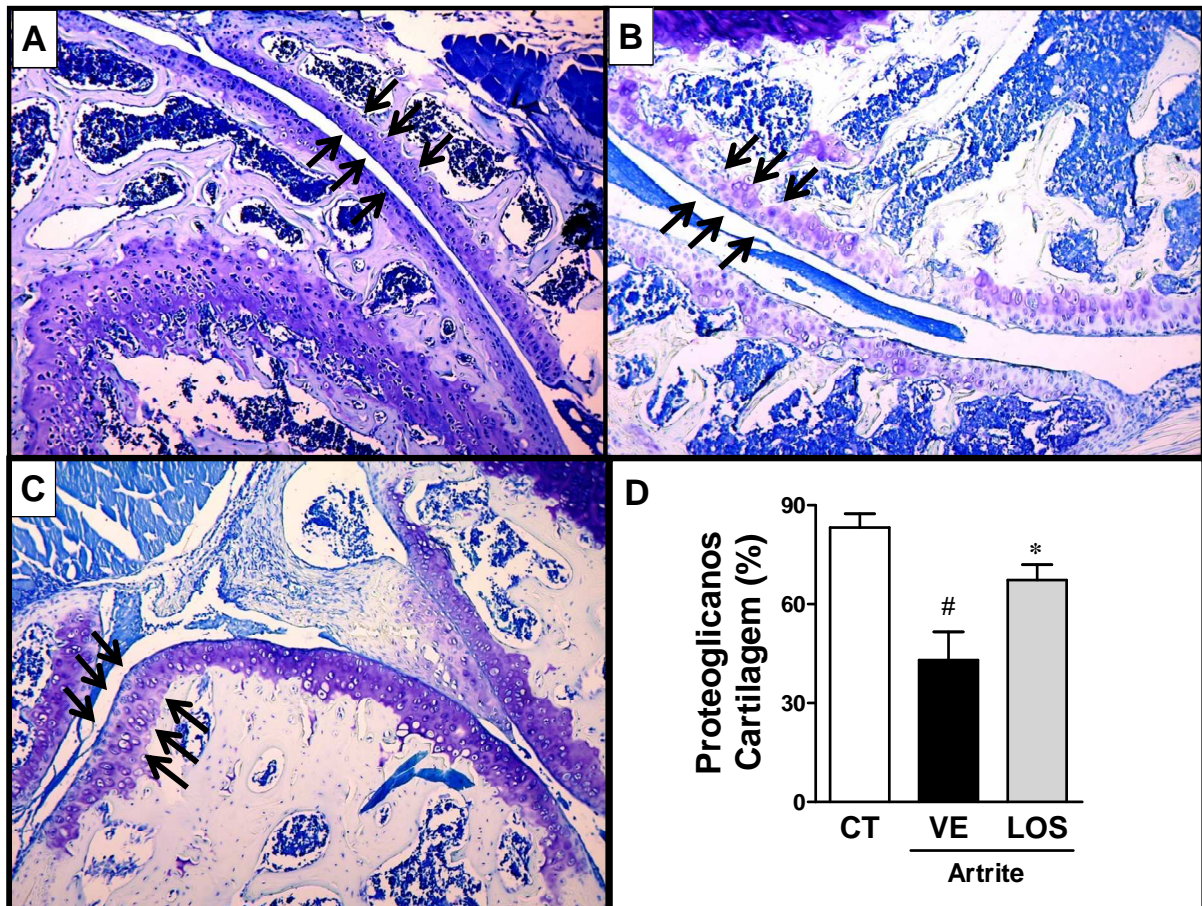


Figura 2 Efeito da administração de Losartan sobre a perda de proteoglicanos nas articulações de camundongos submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). Cortes representativos da articulação fêmur-tibial (joelho) de animais controle, imunizados e desafiados com PBS 1x estéril (A), animais imunizados e desafiados com mBSA, e que receberam administração (i.p) de veículo (PBS 1x estéril) (B) ou animais imunizados e desafiados com mBSA e tratados com Losartan (10 mg/kg) (C) estão representados neste painel. O tratamento foi administrado (i.p.), 60 min antes e 6 h após o desafio. As amostras foram obtidas 24 h após a indução da artrite e os cortes histológicos foram representados em aumento de 100x e foram corados com Azul de Toluidina. As setas indicam a área da cartilagem na qual foi realizada a quantificação da perda de proteoglicanos, conforme descrito na sessão 3.4.4, e a avaliação semiquantitativa da perda foi representada graficamente na figura D. As barras representam a média \pm EPM de 3-4 camundongos por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

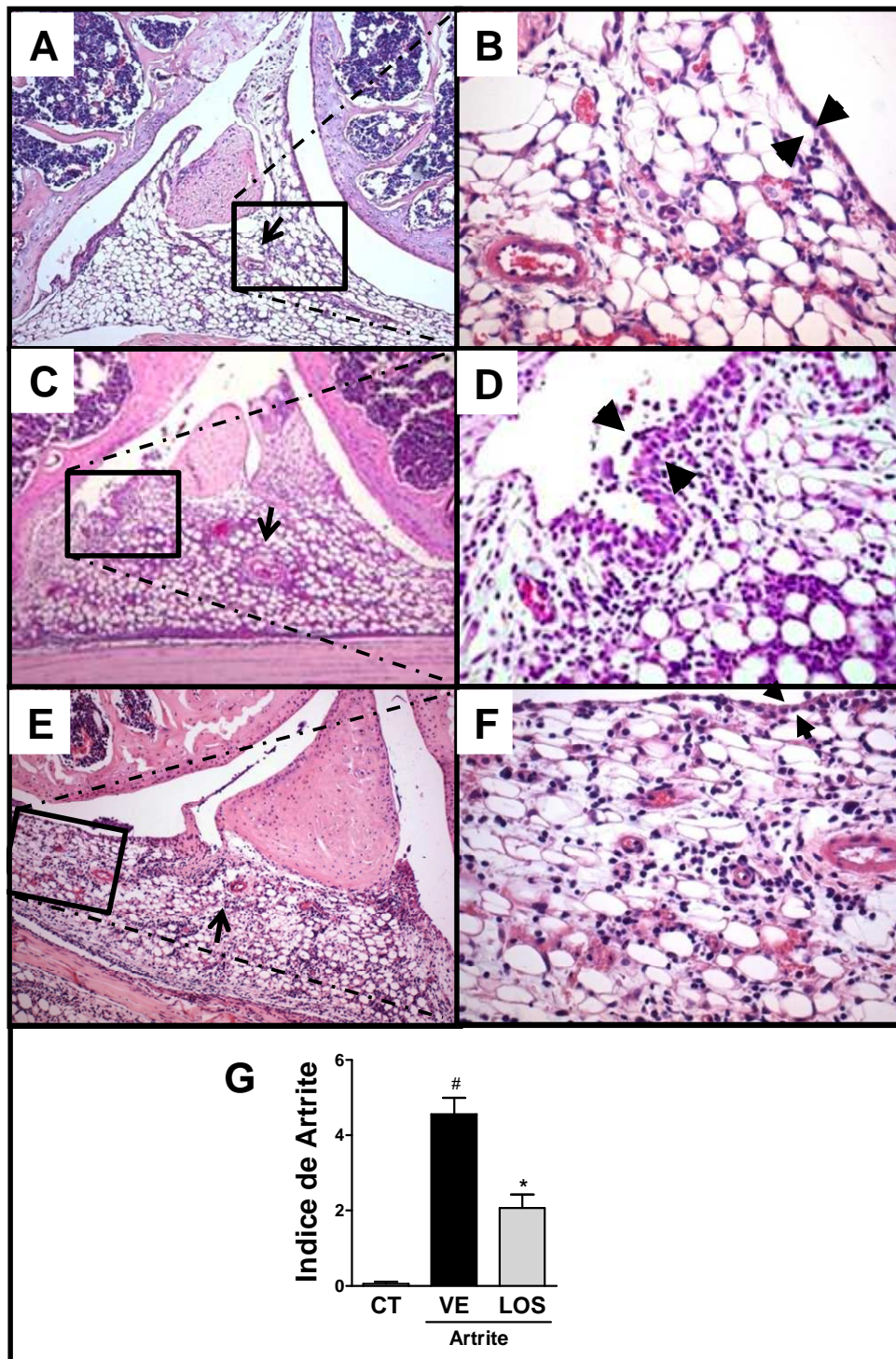


Figura 3 Efeito da administração de Losartan sobre a histologia das articulações de camundongos submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). Cortes representativos da articulação fêmur-tibial (joelho) de animais controle, imunizados e desafiados com PBS 1x estéril (A, B), animais imunizados e desafiados com mBSA, e que receberam administração (i.p.) de veículo (PBS 1x estéril) (C,D) ou animais imunizados e desafiados com mBSA e tratados com Losartan (10 mg/kg) (E,F) estão representados neste painel. O tratamento foi administrado (i.p.), 60 min antes e 6 h após o desafio. As amostras foram obtidas 24 h após a indução da artrite e os cortes histológicos estão representados em aumento de 100x (A, C, E) e 400x (B, D, F), corados com H&E. Em A, C e E, as setas indicam a presença do infiltrado inflamatório subsinovial. Em B, D, F, as cabeças de setas mostram a membrana sinovial. O índice de artrite (G) foi obtido a partir de escore semiquantitativo do grau de acometimento histológico (vide sessão 3.4.4). As barras representam a média \pm EPM de 7-9 camundongos por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.1.2 Efeitos do bloqueio do receptor AT₁ sobre a hiperalgesia e pressão arterial dos camundongos com AIA.

A artrite induzida por mBSA produziu aumento da hipernociceção verificado pelo teste de pressão crescente na pata. Após a administração de Losartan (10 mg/kg) ocorreu redução significativa da hipernociceção quando comparado ao grupo tratado com veículo (**Figura 15A**).

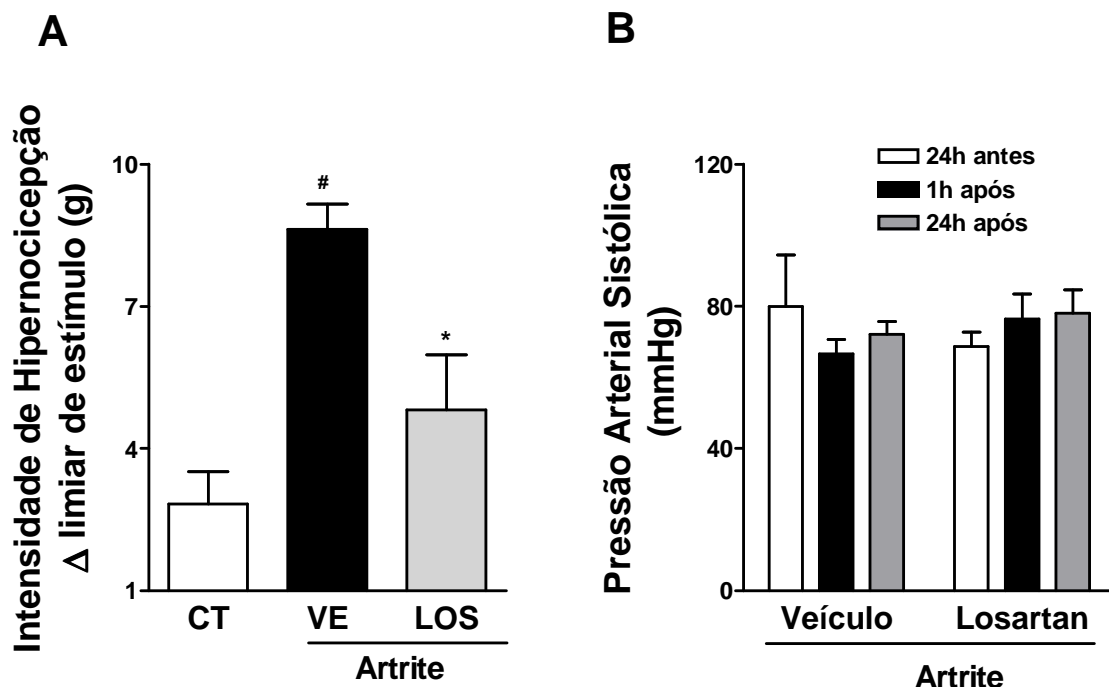


Figura 4. Efeito da administração de Losartan sobre o limiar de hipernociceção e níveis de pressão arterial sistólica em camundongos submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). A hipernociceção (**A**) foi avaliada por anestesiómetro eletrônico. Losartan (10 mg/kg) ou veículo – VE (PBS 1x estéril) foram administrados (i.p.) 60 min antes e 6 h após o desafio com mBSA. As avaliações ocorreram antes do desafio e 24 h após a injeção de mBSA ou PBS 1x estéril (grupo veículo – VE e controle – CT, respectivamente). Os resultados representam a variação (Δ) do limiar de estímulo (g), calculado pela subtração dos dois tempos avaliados ($n = 10-15$ animais). A pressão arterial sistólica (**B**) foi mensurada por pletismografia de cauda 24 h antes, 1 h e 24 h após a indução de artrite nos grupos veículo e tratado com Losartan, 10 mg/kg (4 animais por grupo). As barras representam médias \pm EPM. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

A pressão arterial sistólica dos animais foi verificada para excluir possíveis interferências causadas por variações hemodinâmicas sobre os demais parâmetros avaliados. Conforme observado na **figura 15B**, a pressão arterial sistólica dos animais tratados com Losartan (10mg/kg) não variou de forma significativa, ou seja, os valores pré-tratamento foram semelhantes ao pós-tratamento, bem como aqueles observados nos animais que receberam veículo (PBS 1 x) ou nos controles, não desafiados.

4.1.3 Mecanismos anti-inflamatórios envolvidos no efeito do bloqueio do receptor AT₁ na AIA.

A administração de Losartan, 10 mg/kg, reduziu a produção local da quimiocina ativadora de neutrófilos, CXCL1 (ver **figura 12B**). Essa redução poderia explicar a inibição do influxo de neutrófilos para a articulação acometida.

Para avaliar se o bloqueio do receptor AT₁ afetaria as interações leucócito-endoteliais *in vivo*, a microscopia intravital foi utilizada, na qual Losartan (10 mg/kg) foi administrado i.p. 30 minutos antes do procedimento. Usando este protocolo, foi possível avaliar as interações leucócito-endoteliais, evitando um efeito do composto sobre a produção de quimiocinas. Conforme demonstrado na **figura 16**, a administração de Losartan, minutos antes da microscopia intravital, reduziu significativamente o rolamento (42%) (**Figura 16A**) e a adesão leucocitária (50%) (**Figura 16B**) em comparação com a administração de veículo.

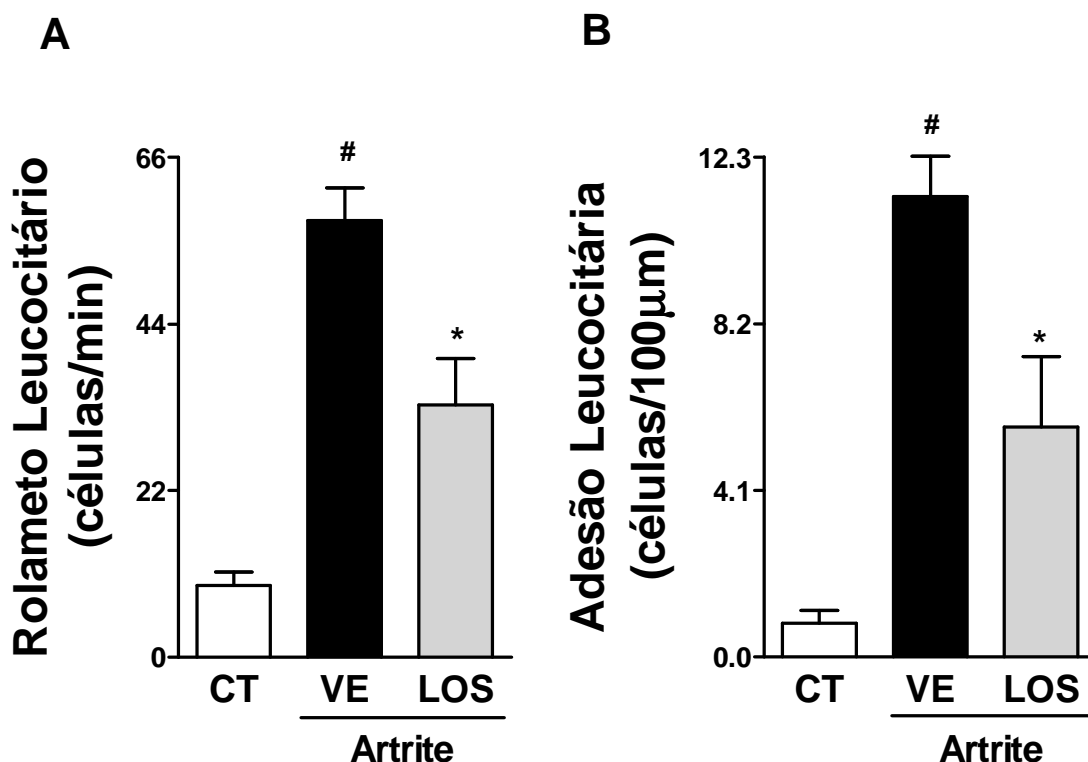


Figura 5. Efeito da administração de Losartan sobre a interação leucócito-endotélio na microvasculatura sinovial de camundongos submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). Losartan (10 mg/kg) ou veículo (PBS 1x estéril) foi administrado i.p., 30 min antes da microscopia intravital. Rolamento (A) e adesão (B) de leucócitos no endotélio sinovial foram avaliados 24 h após a injeção de antígeno (mBSA, 10 µg) ou PBS 1x estéril na região intra-articular dos animais previamente imunizados. Os resultados de rolamento e adesão foram expressos como número de células/min e número de células/100µm, respectivamente. As barras representam a média ± EPM de 8 animais por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.1.4 Efeitos anti-inflamatórios do antagonista de receptores AT_1 , Losartan, em ratas com artrite induzida por adjuvante.

A fim de investigar se o antagonista do receptor AT_1 , Losartan, seria capaz de reproduzir os mesmos efeitos anti-inflamatórios observados no modelo de AIA, foram realizados novos experimentos em um modelo crônico de artrite induzida por *Micobacterium butitricum* em ratas Holtzman. Os sinais da progressão da doença

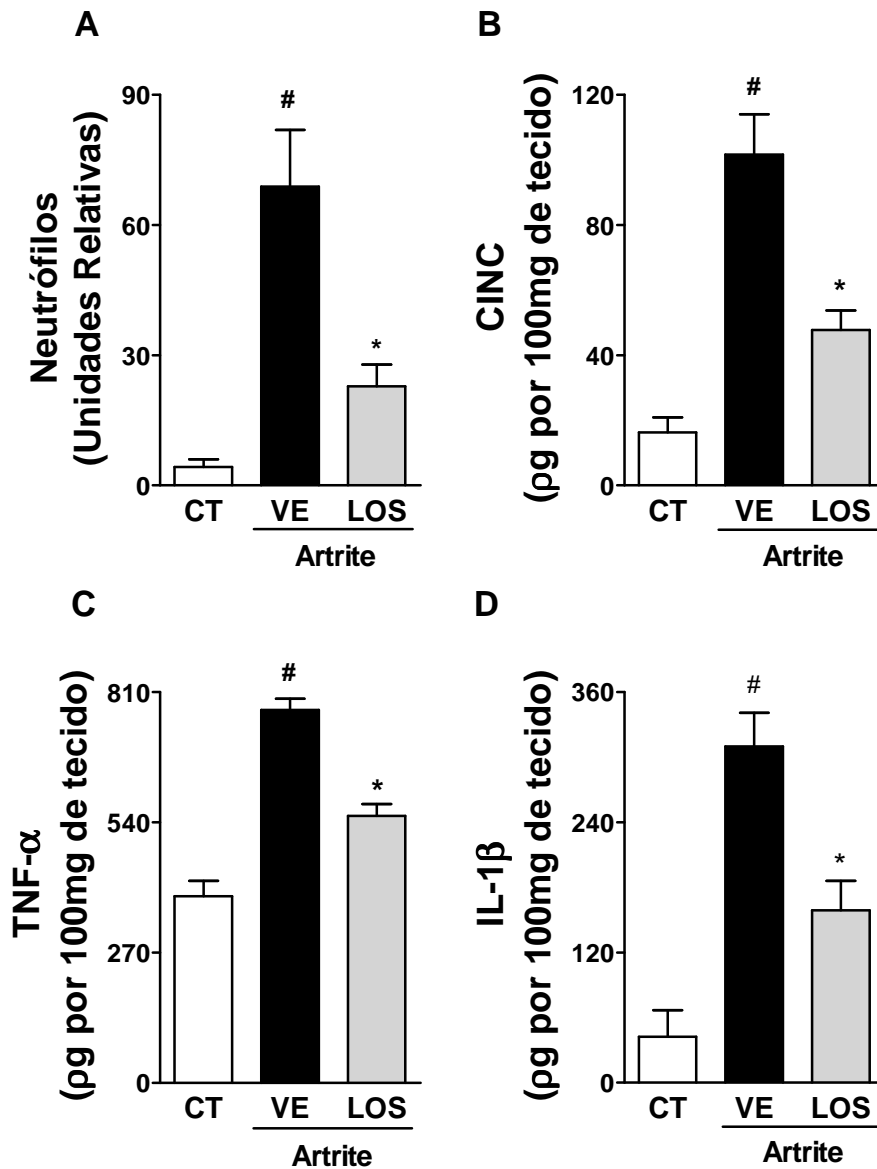


Figura 6 Efeito do tratamento com Losartan sobre a migração de neutrófilos e a concentração de citocinas teciduais periarticulares de ratas submetidas à artrite induzida por adjuvante (*AdIA*). Uma emulsão contendo *Micobacterium butiricum* foi administrada, i.d, em ratas Holtzman. No 10^o dia após indução de artrite, Losartan (10 mg/kg) ou veículo – VE – (PBS 1x estéril) foi administrado (gavagem) aos animais, uma vez ao dia, até o 16^o dia. No 16^o dia, o número relativo de neutrófilos foi determinado pela atividade da mieloperoxidase (**A**), e a concentração de citocinas, CINC (**B**), TNF- α (**C**) e IL1- β (**D**) no tecido periarticular, foram quantificadas por ELISA. Aos animais do grupo controle (CT), foi administrada apenas uma emulsão contendo óleo + água. As barras representam a média \pm EPM de 5-8 ratas por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

(edema, rubor, vocalização em presença de estímulos dolorosos e perda de movimentação normal das patas) foram observados a partir do 10^o dia. O tratamento

com Losartan (10 mg/kg) foi iniciado no 10^o e se estendeu até o 16^o dia. O ensaio de MPO indicou um acentuado acúmulo de neutrófilos nos tecidos periarticulares avaliados, tecidos moles da articulação tibio-tasal (**Figura 17A**).

As principais citocinas pró-inflamatórias responsáveis pela migração de neutrófilos foram avaliadas nos tecidos periarticulares neste mesmo momento. Estas citocinas apresentaram-se significativamente aumentadas nas ratas com AdIA, quando comparadas aos controles não imunizados (**Figura 17B-D**). No entanto, o tratamento diário com Losartan (10 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente as concentrações de CINC (**Figura 17B**), TNF- α (**Figura 17C**) e IL-1 β (**Figura 17D**), quando comparadas às ratas que receberam veículo. A administração de Losartan causou redução nos níveis de CINC, TNF- α e IL-1 β que estiveram associadas ao menor número des neutrófilo infiltrados.

A avaliação dos cortes histológicos das articulações rádio-cárpicas dos ratos demonstrou um comportamento semelhante àquele observado nos camundongos submetidos à artrite induzida por mBSA. As alterações histológicas verificadas nos ratos com artrite e tratados com veículo, NaCl 0,9%, (**Figuras 18C, 18D**) foram caracterizadas por uma expressiva hipertrofia e hiperplasia de sinóvia, intenso infiltrado leucocitário no tecido subsinovial. Além disso, foi possível observar um grande número de osteoclastos ativos na borda óssea formando área de erosão, que são associadas à formação de pannus e, áreas de irregularidade na zona superficial da cartilagem. Essas alterações não foram verificadas no grupo controle (**Figura 18A, 18B**). A administração de Losartan (10 mg/kg) aos animais AdIA preveniu a ocorrência das alterações verificadas no grupo veículo (**Figura 18E, F**). A análise semiquantitativa destes cortes histológicos confirmou esses achados (**Figura 18G**).

Além disso, avaliou-se também a perda de proteoglicanos dos animais, onde foi possível observar a ocorrência de uma perda significativa de proteoglicanos nos animais imunizados e desafiados com mBSA, veículos – NaCl 0,9%, (**Figura 19B**) quando comparado ao grupo controle (**Figura 19A**). Nos animais tratados com Losartan, o percentual de perda de proteoglicanos foi significativamente menor (**Figura 19C**) quando comparado ao percentual de perda erificado no grupo veículo. A avaliação semiquantitativa da perda foi representada graficamente na **figura 19D**.

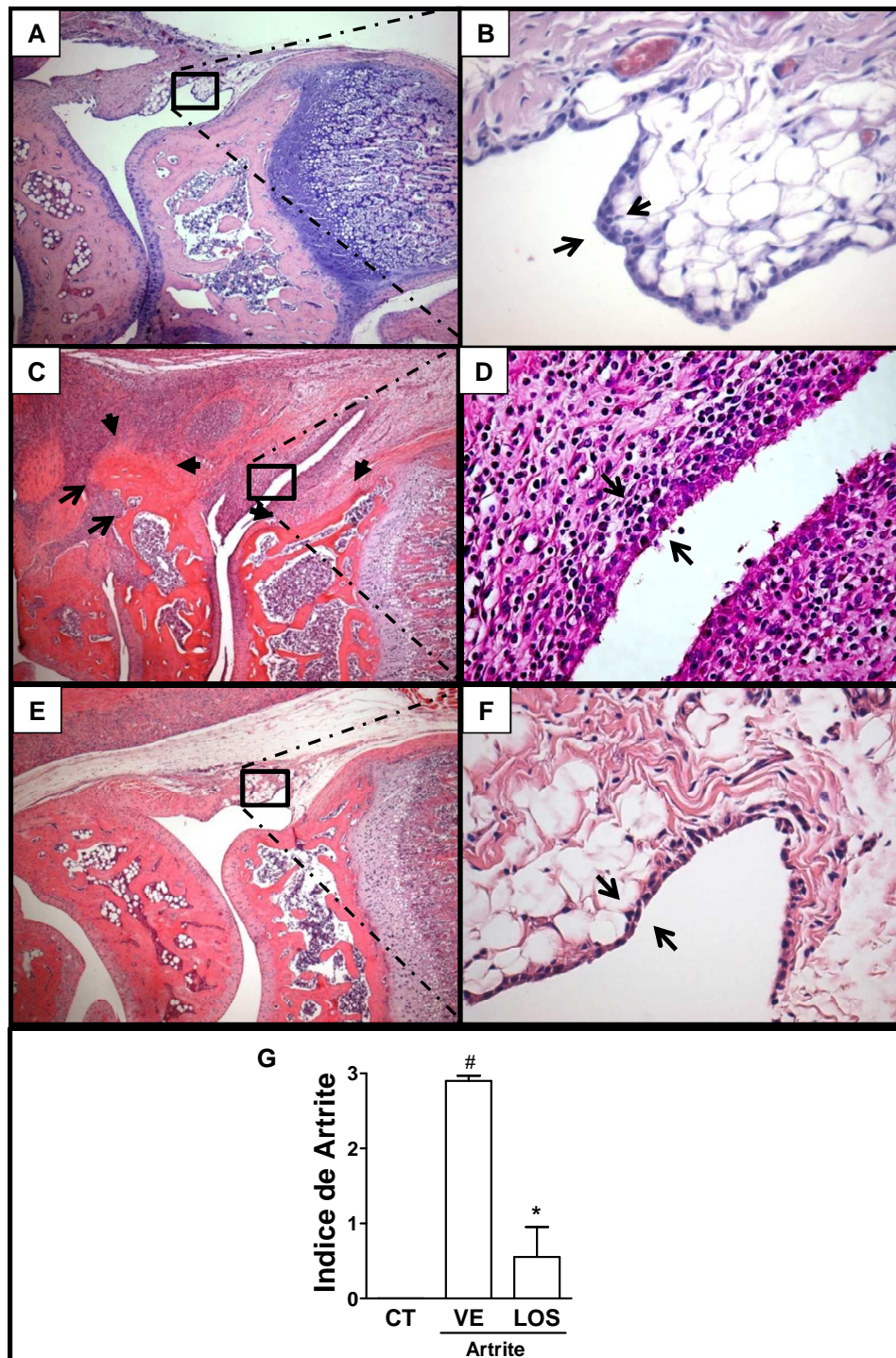


Figura 7. Efeito do tratamento com Losartan sobre o perfil histopatológico das articulações de ratas submetidas à artrite induzida por adjuvante (AdIA). Uma emulsão contendo *Micobacterium butyricum* foi administrada, i.d, em ratas Holtzman. No 10^o dia após indução de artrite, Losartan (10 mg/kg) ou veículo – VE – (PBS 1x estéril) foi administrado (gavagem) aos animais uma vez ao dia até o 16^o dia. Aos animais do grupo controle (CT) foi administrada apenas uma emulsão contendo óleo + água. Cortes representativos da articulação radio-carpal das ratas controle (A,B), veículo (C,D), e tratados com Losartan (10 mg/kg) (E,F) foram obtidas no 16^o dia. Os cortes histológicos estão representados em aumento de 40x (A,C,E) e 100x (B,D,F) e foram corados com H&E. Em B, D e F, as setas indicam a membrana sinovial. Em C, a cabeça de seta destaca as áreas de irregularidades da zona superficial da cartilagem e as setas indicam a erosão óssea e formação de pannus. O índice de artrite (G) representa uma medida quantitativa do grau de acometimento histopatológico observado (descrição na sessão 3.4.4). As barras representam a média ± EPM de 4-5 camundongos por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

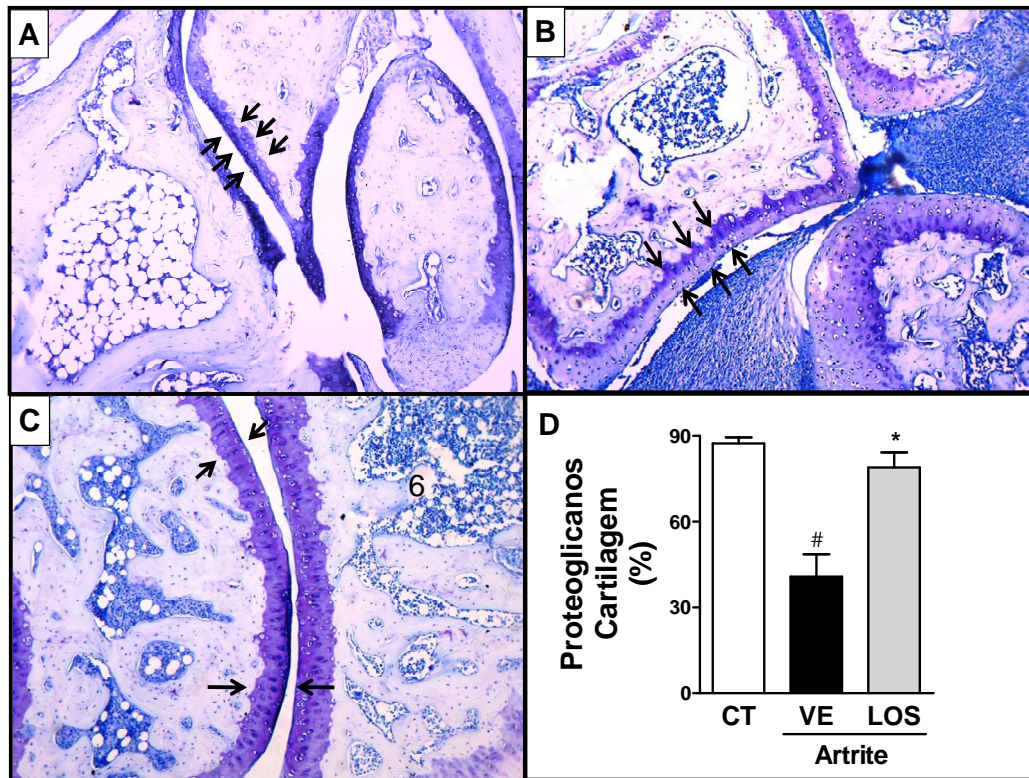


Figura 8 Efeito da administração de Losartan sobre a perda de proteoglicanos nas articulações de ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AdIA). Uma emulsão contendo *Micobacterium butiricum* foi administrada, i.d, em ratas Holtzman. No 10º dia após indução de artrite, Losartan (10 mg/kg) ou veículo – VE – (PBS 1x estéril) foi administrado (gavagem) aos animais uma vez ao dia até o 16º dia. Aos animais do grupo controle (CT) foi administrada apenas uma emulsão contendo óleo + água. Cortes representativos da articulação radio-carpal das ratas controle (A), veículo (B), e tratados com Losartan (10 mg/kg) (C) foram obtidas no 16º dia. Os cortes histológicos estão representados em aumento de 100x e foram corados com Azul de toluidina. As setas indicam a área da cartilagem no qual foi realizada a quantificação da perda de proteoglicanos, conforme descrito na sessão 3.4.4) e a avaliação semiquantitativa da perda foi representada graficamente na figura. As barras representam a média \pm EPM de 3-4 camundongos por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.2- Efeitos da ativação do receptor Mas na artrite experimental

4.2.1 – Expressão do receptor Mas no tecido periarticular

Uma vez que não há relatos na literatura sobre a expressão do receptor Mas nos tecidos articulares de nenhuma espécie de animal, o primeiro passo dessa etapa foi avaliar a expressão do receptor neste tecido. Para isso, Western Blot foi realizado usando-se tecidos periarticulares de animais imunizados e desafiados com mBSA, grupo artrítico, e animais imunizados com mBSA e desafiados com PBS 1x, grupo controle. A presença do receptor Mas foi confirmada em ambos os grupos, entretanto, a indução da artrite não afetou a expressão do receptor que foi semelhante ao grupo controle (**Figura 20**).

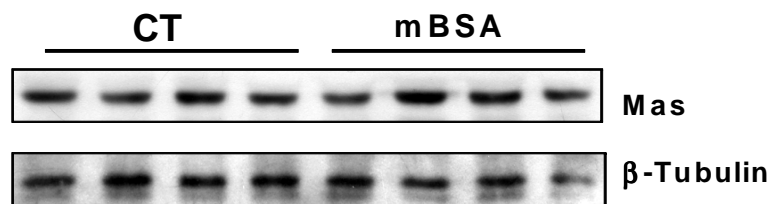


Figura 20 Expressão do receptor Mas no tecido periarticular de camundongos submetidos ao modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). A presença do receptor Mas em tecidos peri-articulares foi detectada por Western Blot e comparados com a expressão da β-Tubulina. A avaliação foi realizada 24 h após a indução da artrite por administração de 10 µg de mBSA ou injeção de 10 µl de salina estéril (controle – CT) dentro da articulação fêmur-tibial (joelho) dos camundongos imunizados.

4.2.2 – Efeitos anti-inflamatórios de agonistas do receptor Mas em um modelo de AIA

A injeção de antígeno na articulação do joelho de camundongos C57Bl/6, previamente imunizados com mBSA induziu significativo recrutamento de neutrófilos para o tecido periarticular e para a cavidade articular, conforme observado anteriormente. A administração de AVE 0991 reduziu o acúmulo de neutrófilos nos tecidos periarticulares (**Figura 21A**) e, também, diminuiu seu influxo para dentro da

cavidade articular (**Figura 21B**). A administração da Ang-(1-7) apresentou efeitos similares aos de AVE 0991 em relação ao influxo de neutrófilos (**Figura 21A-B**).

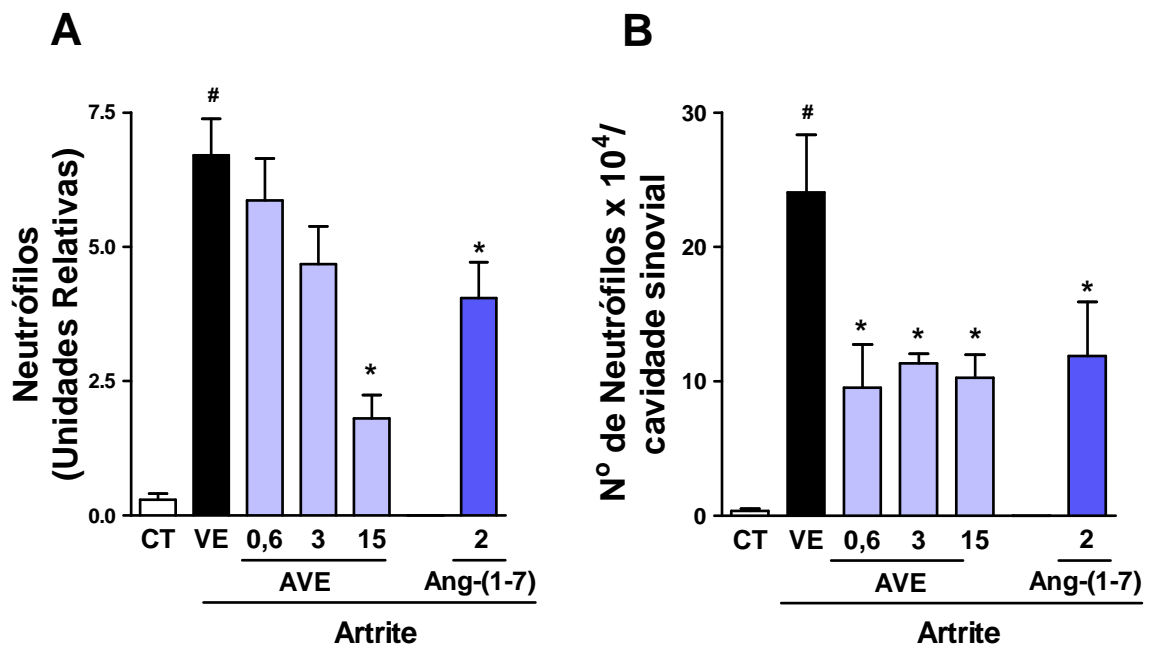


Figura 21 Efeito da administração de agonistas do receptor Mas sobre a migração de neutrófilos em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). AVE 0991 (0,6, 3 ou 15 mg/kg), Ang-(1-7) (2 mg/kg) ou veículo – VE – (KOH 10mM em PBS 1x estéril) foram administrados (i.p.) 60 min antes e 6 h após o desafio com mBSA. O número relativo de neutrófilos no tecido periarticular, determinado pela atividade da mieloperoxidase (**A**), e o número de neutrófilos na cavidade sinovial (**B**) foram avaliados 24 h após a indução da artrite por administração de 10 µg de mBSA ou injeção de 10 µl de salina estéril (controle – CT) dentro da articulação fêmur-tibial (joelho) dos camundongos imunizados. As barras representam a média ± EPM de 8 camundongos por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

A concentração das citocinas, TNF- α e IL-1 β , e da quimiocina CXCL1, nos tecidos periarticulares, também foi avaliada. Conforme apresentado na figura 22, pode-se verificar que as concentrações dessas citocinas apresentavam-se elevadas nos animais que foram desafiados com mBSA. O tratamento com ambos os agonistas do receptor Mas, AVE 0991 (3 mg/kg) e Ang-(1-7) (2mg/kg) reduziu a concentração de TNF- α (**Figura 22A**) e CXCL1 (**Figura 22C**), entretanto apenas AVE 0991 foi eficaz em reduzir IL-1 β (**Figura 22B**).

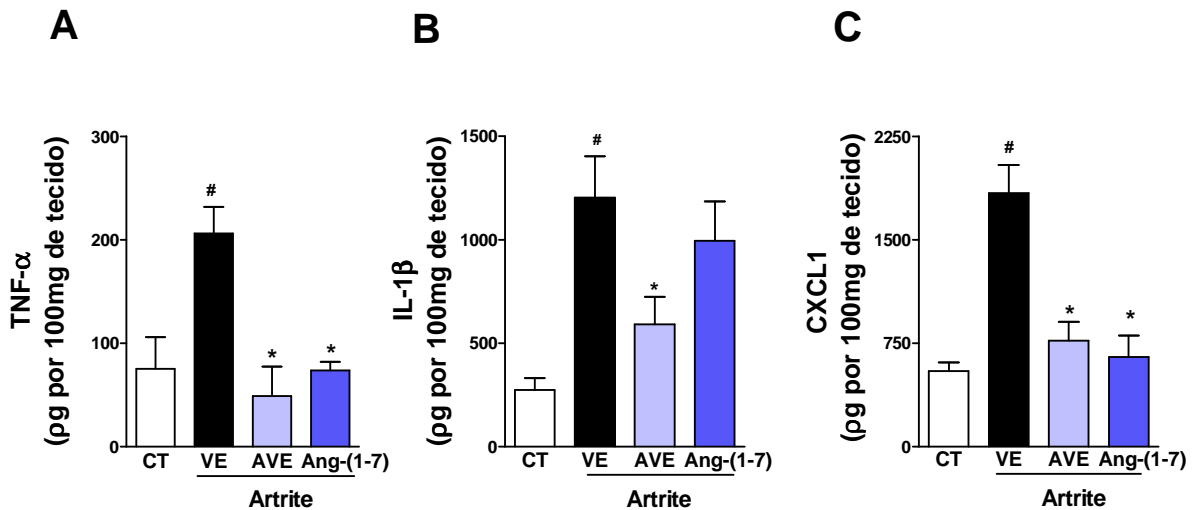


Figura 9 Efeito da administração de agonistas do receptor Mas sobre a concentração de citocinas teciduais em um modelo de artrite induzida por antígeno (AIA). AVE 0991 (3 mg/kg), Ang-(1-7) (2 mg/kg) ou veículo – VE – (KOH 10mM em PBS 1x estéril) foram administrados (i.p.) 60 min antes e 6 h após o desafio com mBSA. As concentrações de TNF- α (A), IL-1 β (B) e CXCL1 (C), presentes nos tecidos periarticulares do joelho, foram determinadas por ELISA, 24 h após a indução da artrite por administração de 10 μ g de mBSA ou injeção de 10 μ l de salina estéril (controle – CT) dentro da articulação fêmur-tibial (joelho) dos camundongos imunizados. As barras representam a média \pm EPM de 8 camundongos por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls)

A análise histológica das articulações fêmur-tibiais dos animais imunizados e desafiados com mBSA mostrou a presença de algumas alterações que podem ser verificadas na artrite, tais como a presença de intenso infiltrado celular, hiperplasia e descontinuidade da membrana sinovial (**Figura 23B**), que não são vistas nos animais controle – imunizados com mBSA, mas desafiados com PBS 1x (**Figura 23A**). A administração de AVE 0991 (3 mg/kg) reduz, de forma significativa, a intensidade de tais alterações (**Figura 23C**), o que está expresso, de forma quantitativa, no índice de acometimento histológico, mostrado na figura **23D**.

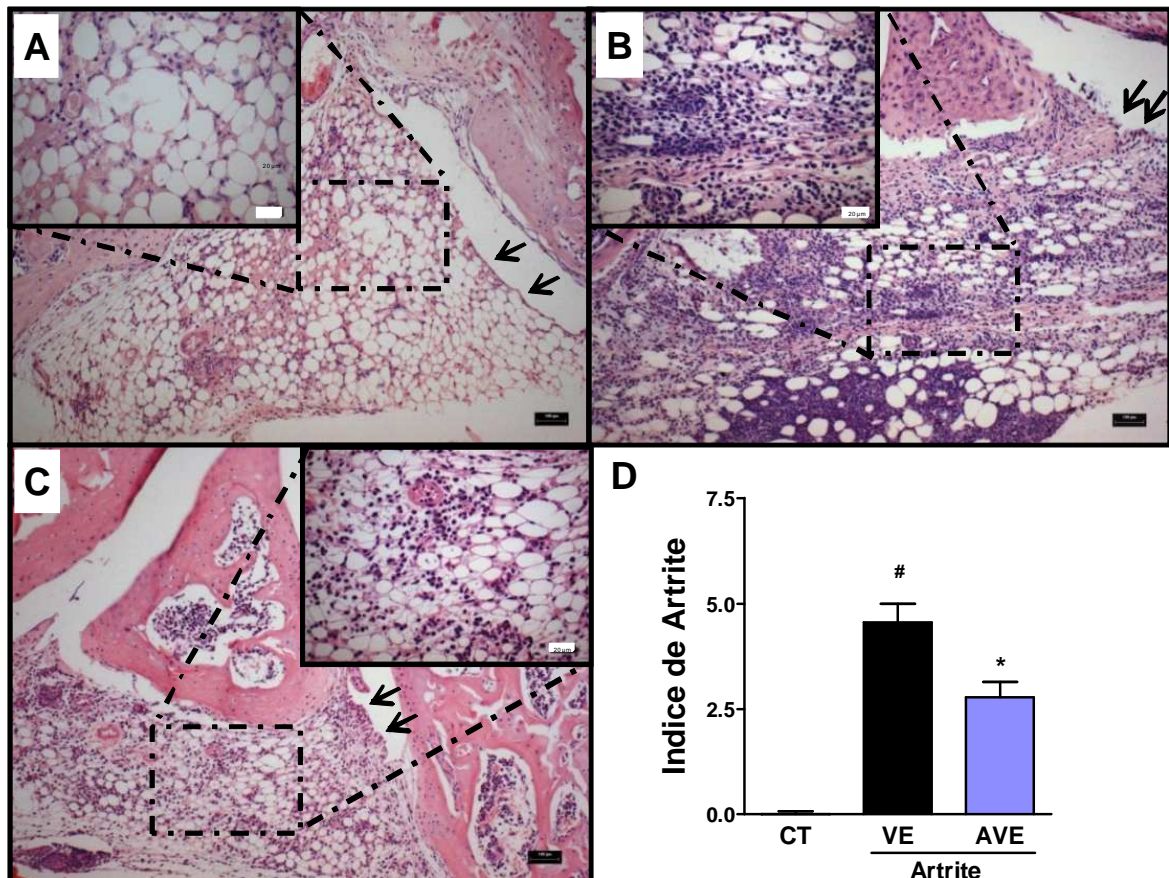


Figura 10 Efeito da administração de agonista do receptor Mas, AVE 0991, sobre o perfil histopatológico das articulações de camundongos submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). Cortes da articulação fêmur-tibial (joelho) de animais controle, imunizados e desafiados com PBS 1x estéril (A), animais imunizados e desafiados com mBSA e que receberam administração (i.p.) de veículo (KOH 10mM em PBS 1x estéril) (B), e ou animais imunizados e desafiados com mBSA e tratados com AVE 0991 (3 mg/kg) (C) estão representados neste painel. O tratamento foi administrado (i.p.), 60 min antes e 6 h após o desafio. As amostras foram obtidas 24 h após a indução da artrite e os cortes histológicos foram corados com Eosina e Hematoxilina, onde as barras brancas representam 20 μ m e as barras pretas representam 100 μ m de comprimento. As setas indicam a membrana sinovial e os inserts estão destacando uma área de importante infiltrado inflamatório. O índice de artrite (D) representa uma medida quantitativa do grau de acometimento histopatológico observado (descrição na sessão 3.4.4). As barras representam a média \pm EPM de 4-6 camundongos por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.2.3- Efeitos da ativação do receptor Mas sobre a hipernocicepção e pressão arterial sistólica de camundongos com AIA

Conforme relatado anteriormente, estudos prévios do nosso grupo demonstram a ocorrência de pronunciada hiperalgesia que sucede a inflamação tecidual, caracterizada, principalmente, pelo influxo de neutrófilos para a articulação às 24 h após o desafio com antígeno (mBSA) (Coelho et al., 2008). No presente estudo, o desafio dos animais previamente imunizados induziu um aumento importante da hipernocicepção, avaliada 24 h após a indução da artrite. O tratamento com AVE 0991 produziu uma redução da intensidade de hipernocicepção, cujo efeito máximo pôde ser verificada com a dose de 3 mg/kg (**Figura 24A**). Efeito semelhante foi obtido pela administração da Ang-(1-7), 2 mg/kg, que também reduziu a hiperalgesia decorrente da inflamação articular (**Figura 24A**). A administração de AVE 0991 inibiu de maneira dose-dependente a hipernocicepção, com inibição máxima observada nas doses de 3 e 15 mg/kg.

A ativação do receptor Mas da Ang-(1-7) é capaz de contrarregular vários efeitos cardiovasculares da Ang II, incluindo a redução da hipertensão arterial (Iyer et al., 1998). Além disso, alguns estudos têm mostrado que agonistas do receptor Mas não causam hipotensão *per se* e nem alteram a pressão arterial de normotensos (Grobe et al., 2006), mas aumentam o potencial hipotensor de outros vasodilatadores (Faria-Silva et al., 2005; Grobe et al., 2007). Devido ao fato de que a hipotensão poderia reduzir a inflamação e a hiperalgesia, por diminuir o fluxo sanguíneo para os tecidos, ou por efeitos centrais secundários à queda da pressão sanguínea, foi avaliado se a administração da dose máxima de AVE 0991 (15 mg/kg) poderia afetar a pressão arterial sistólica dos camundongos submetidos à AIA. Conforme representado na **figura 24B**, AVE 0991 não alterou a pressão arterial sistólica dos animais que receberam 15 mg/kg do composto.

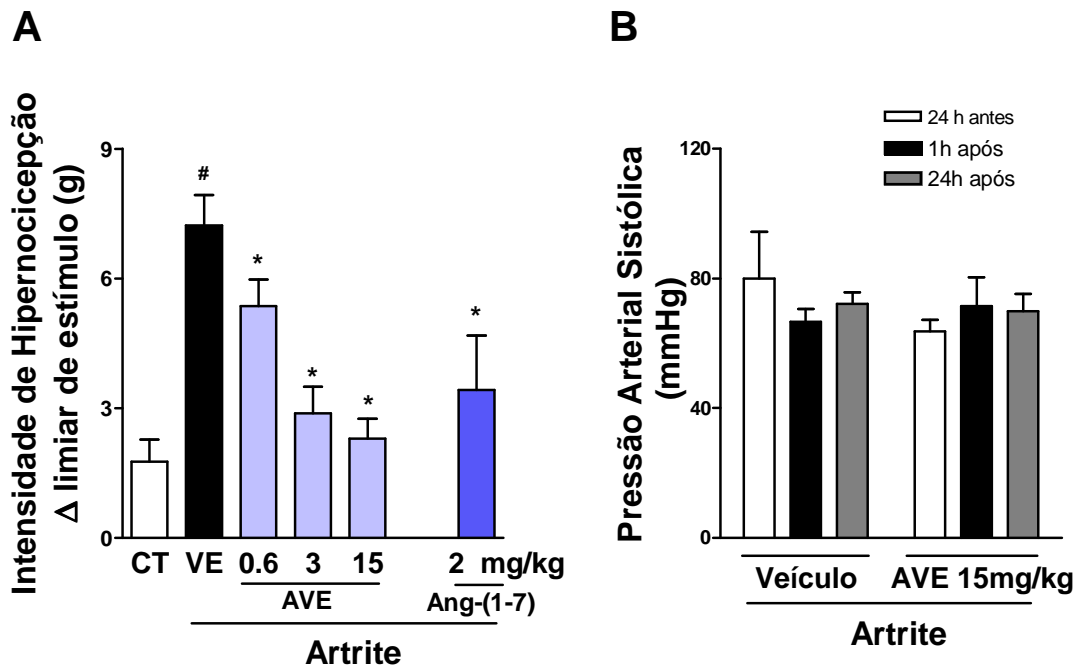


Figura 11 Efeito da administração de agonistas do receptor Mas sobre o limiar de hipernocicepção e níveis de pressão arterial sistólica em camundongos submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). A hipernocicepção (**A**), um índice de dor inflamatória, foi avaliada com o uso de um anesthesiômetro eletrônico. AVE 0991 (0,6, 3 ou 15 mg/kg), Ang-(1-7) (2mg/kg) ou veículo – VE (KOH 10mM em PBS 1x estéril) foram administrados (i.p.) 60 min antes e 6 h após o desafio com mBSA. As avaliações ocorreram antes do desafio e 24 h após a injeção de mBSA ou KOH em PBS 1x estéril (grupo veículo – VE e controle – CT, respectivamente). Os resultados foram representados como variação (Δ) do limiar de estímulo (g), calculado pela subtração dos dois tempos avaliados ($n = 10-15$ animais). A pressão arterial sistólica (**B**) foi mensurada por pletismografia de cauda 24 h antes, e 1 h e 24 h após a indução de artrite nos grupos veículo e grupo tratado com AVE 0991, 15 mg/kg ($n = 4$ animais). As barras representam a média \pm EPM. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.2.4- AIA em camundongos com deleção gênica do receptor Mas de Ang-(1-7)

Como a ativação do receptor Mas pela administração de AVE 0991 ou Ang-(1-7) reduziu o influxo de neutrófilos, a produção de citocinas e a hipernocicepção nos camundongos submetidos à AIA, o próximo passo foi avaliar o papel da ativação endógena do eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas, para o desenvolvimento da artrite. Para este fim, animais com e sem deleção genética do receptor Mas (C57Bl/6 Mas^{-/-} e Mas^{+/+}) foram imunizados e desafiados com mBSA. Animais Mas^{-/-} e Mas^{+/+} imunizados com mBSA e desafiados com PBS 1x estéril não apresentaram diferenças basais entre si (dados não apresentados). A deleção gênica do receptor Mas foi acompanhada por um discreto agravamento de alguns parâmetros nos animais submetidos à AIA. Ocorreu um aumento do influxo de neutrófilos para a cavidade articular acometida, bem como maior produção de TNF- α e CXCL1 (**Figura 25C-D**). No entanto, não houve diferenças significativas no infiltrado de neutrófilos nos tecidos periarticulares (**Figura 25A**), na hiperanocicepção (**Figura 25E**) e no índice de acometimento histológico entre os animais Mas^{-/-} e Mas^{+/+} (**Figura 25F**). Houve aumento significativo no número de neutrófilos e na concentração de citocinas em ausência do receptor de Mas, no entanto não houve piora dos aspectos histológicos da doença.

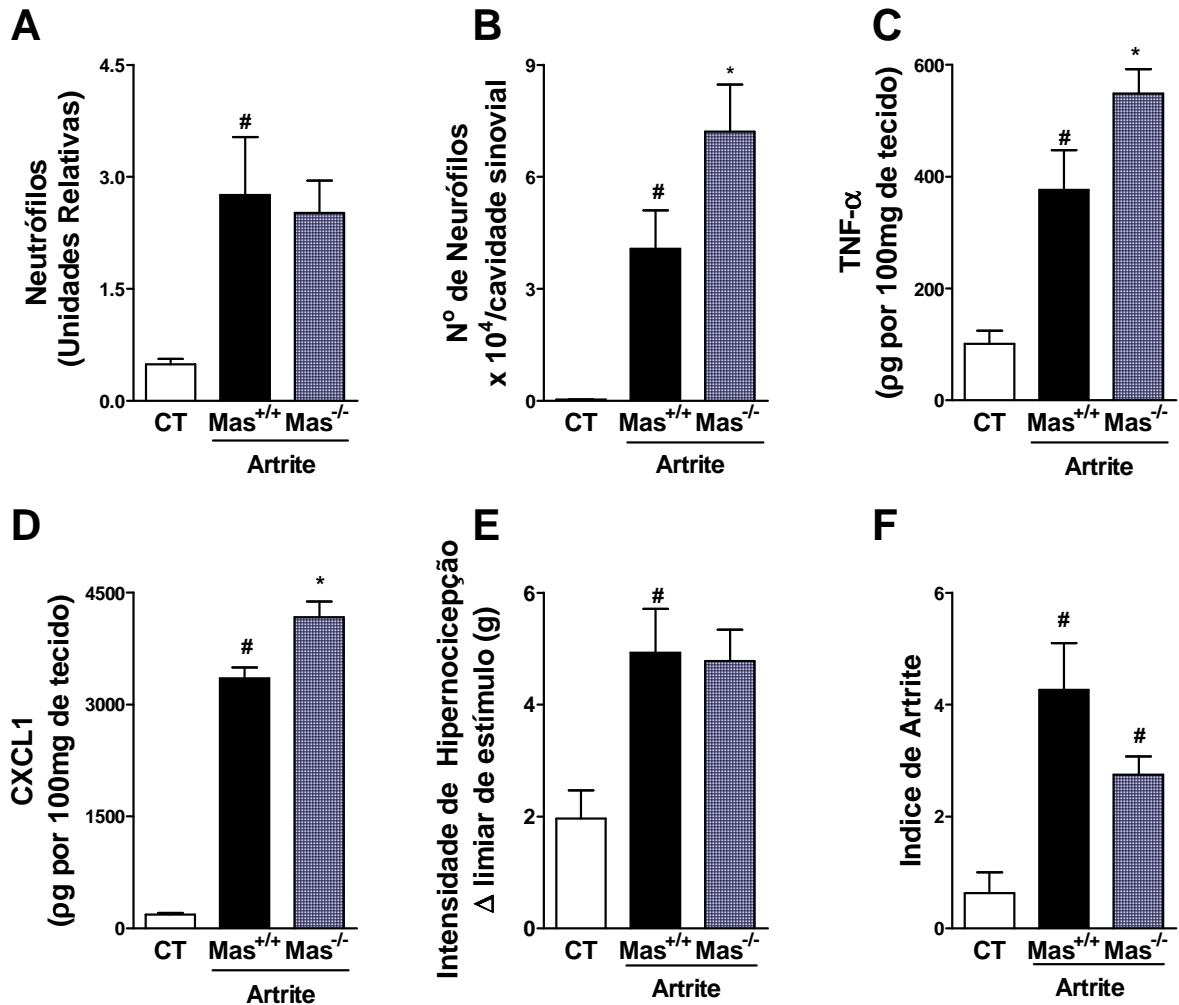


Figura 12 Artrite induzida por antígeno (AIA) em camundongos com deleção gênica do receptor Mas de Ang-(1-7). Os animais com e sem deleção genética do receptor Mas (C57Bl/6 Mas^{-/-} e Mas^{+/+}) foram imunizados com mBSA seguido pelo desafio com mBSA (10µg) ou PBS 1x (controle - CT) administrados dentro da articulação fêmur-tibial (joelho). O número relativo de neutrófilos no tecido periarticular (**A**) e na cavidade sinovial (**B**) e as concentrações de TNF-α (**C**) e CXCL1 (**D**) nos tecidos periarticulares foram avaliados 24 h após a indução da artrite. Hipernocicepção (**E**) e índice de acometimento histopatológico da artrite (**F**) também foram avaliados conforme descrição na sessão 3.4.4. As barras representam a média ± EPM (n= 4 animais). (*) para P<0,05 quando comparado à média do grupo veículo e (#) para P<0,05 quando comparado à média do grupo controle (C57Bl/6 Mas^{+/+}) (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.2.5- Mecanismos anti-inflamatórios da ativação do receptor Mas na AIA

Conforme observado no bloqueio do receptor AT_1 , pela utilização do Losartan, ocorreu aumento do influxo de neutrófilos para articulação associado à elevação nas concentrações teciduais de $TNF\alpha$, CXCL1 e IL-1 β em decorrência da artrite. Além disso, observou-se uma significativa redução da migração celular e dos níveis dessas citocinas após o tratamento com o agonista do receptor de Ang-(1-7), AVE 0991. Experimentos de microscopia intravital permitiram avaliar *in vivo* o processo de rolamento e de adesão leucocitária, mostrando que os camundongos imunizados e desafiados com mBSA (veículos) apresentaram aumento tanto no número de leucócitos em rolamento quanto no número de leucócitos aderidos ao longo das paredes dos vasos, quando comparado com os camundongos imunizados com mBSA e desafiados com PBS (controles). A utilização do agonista do receptor de Ang-(1-7), AVE 0991, alterou de forma expressiva o perfil de interação leucócito-endotélio: houve redução de 38% na taxa de rolamento (**Figura 26A**) e de 53% na adesão (**Figura 26B**) leucocitária ao longo dos vasos sinoviais, 24 horas após o desafio dos animais previamente imunizados com mBSA.

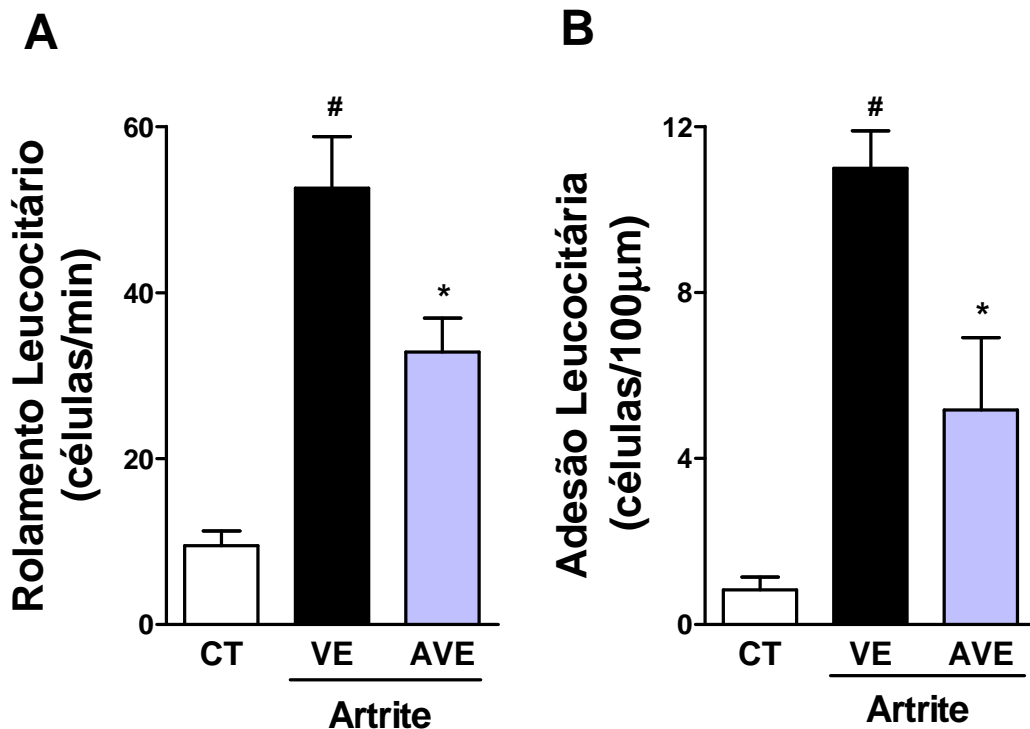


Figura 13. Efeito da administração do agonista do receptor Mas, AVE 0991, sobre a interação leucócito-endotélio na microvasculatura sinovial de camundongos submetidos à artrite induzida por antígeno (AIA). AVE 0991 (3 mg/kg) ou veículo (PBS 1x estéril) foi administrado i.p., 30 min antes da microscopia intravital. Rolamento (A) e adesão (B) de leucócitos no endotélio sinovial foram avaliados 24 h após a injeção de antígeno (mBSA, 10 µg) ou KOH 10mM em PBS 1x estéril na região intra-articular dos animais previamente imunizados. Os resultados de rolamento e adesão foram expressos como número de células/min e número de células/100µm, respectivamente. As barras representam a média ± EPM de 8 animais por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

4.2.6- Efeito anti-inflamatório dos agonistas do receptor Mas, AVE 0991, em ratos submetidos à artrite induzida por adjuvante (AdIA).

Por último, foi investigado se o tratamento com o agonista do receptor Mas, AVE 0991, poderia apresentar efeitos anti-inflamatórios em um modelo crônico de artrite, conforme verificado previamente para o tratamento com Losartan. Para isso, foi utilizado o modelo de indução de artrite a partir da administração de *M. Butiricum* em ratos. O tratamento com AVE 0991, 3 mg/kg, iniciou-se no 10º dia após indução da

artrite, onde até então, não existiam sinais da doença. O tratamento com AVE 0991 estendeu-se até o 16º dia, quando foram realizadas avaliações que mostraram novamente aumento do influxo de neutrófilos (**Figura 27A**) e da produção de TNF- α (**Figura 27B**), CINC (**Figura 27C**) e IL-1 β (**Figura 27D**) nos tecidos periarticulares dos animais com AdIA tratados com veículo. A presença de edema progressivo nas patas também foi verificada nestes animais (**Figura 27D**). O tratamento com AVE 0991 reduziu significativamente todos estes parâmetros inflamatórios.

A avaliação histopatológica da articulação radio-carpal dos animais permitiu também quantificar o grau de acometimento da articulação a partir da utilização de um índice de acometimento histológico. Intenso infiltrado celular, hiperplasia e desorganização sinovial, reabsorção de cartilagem e ossos, e formação de *pannus* foram observados nas articulações dos animais do grupo veículo (**Figura 28B**) em comparação aos controles (**Figura 28A**). Por outro lado, os animais tratados com AVE 0991 apresentaram melhora significativa quando comparados aos tratados com veículo. Houve redução significativa do infiltrado inflamatório, bem como preservação da sinóvia, com apenas pequenas áreas de hiperplasia focal (**Figura 28C**). Esta avaliação foi representada quantitativamente por meio do índice de acometimento histológico (**Figura 28D**), que confirmou a eficácia do tratamento com AVE 0991. O tratamento com AVE 0991 reduziu o número de neutrófilos infiltrados bem como a concentração de citocinas pró-inflamatórias, com consequente melhora patológica.

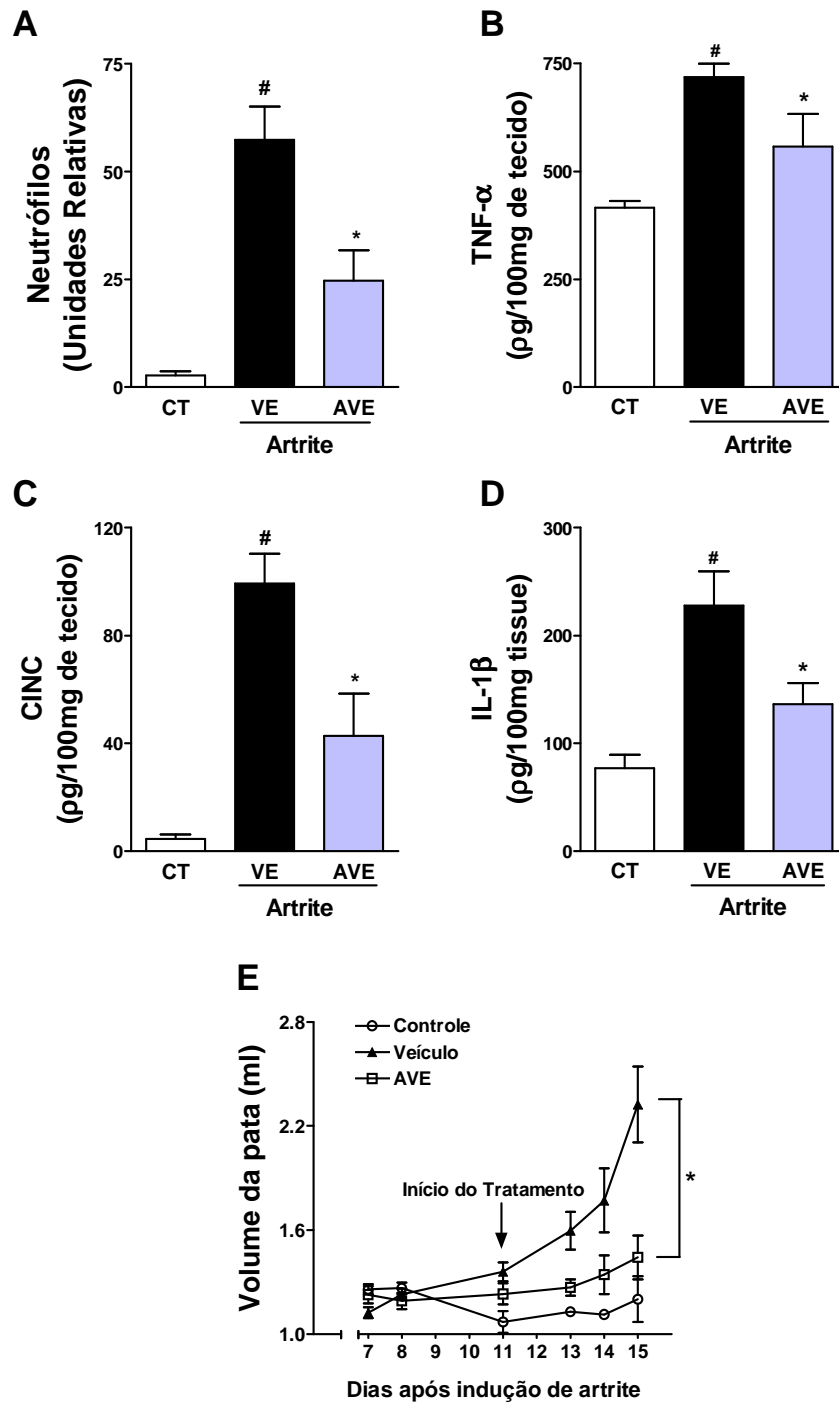


Figura 14 Efeito do tratamento com agonista do receptor Mas, AVE 0991, sobre a migração de neutrófilos, concentração de citocinas e edema teciduais periarticulares de ratas submetidas à artrite induzida por adjuvante (*AdIA*). Uma emulsão contendo *Micobacterium butiricum* foi administrada, i.d, em ratas Holtzman. A partir do 10º dia após indução de artrite, AVE 0991 (3 mg/kg) ou veículo – VE – (KOH 10mM em PBS 1x estéril) foram administrados (gavagem) aos animais, uma vez ao dia, até o 16º dia. No 16º dia, o número relativo de neutrófilos (**A**) foi estimado por ensaio de MPO e a concentração de citocinas, TNF- α (**B**), CINC (**C**) e IL-1 β (**D**) no tecido periarticular, foram quantificadas por ELISA. A presença de edema periarticular foi acompanhada diariamente e mensurada por pletismografia (**E**). Aos animais do grupo controle (CT), foi administrada apenas uma emulsão contendo óleo + água. As barras representam a média \pm EPM de 5-8 ratas por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

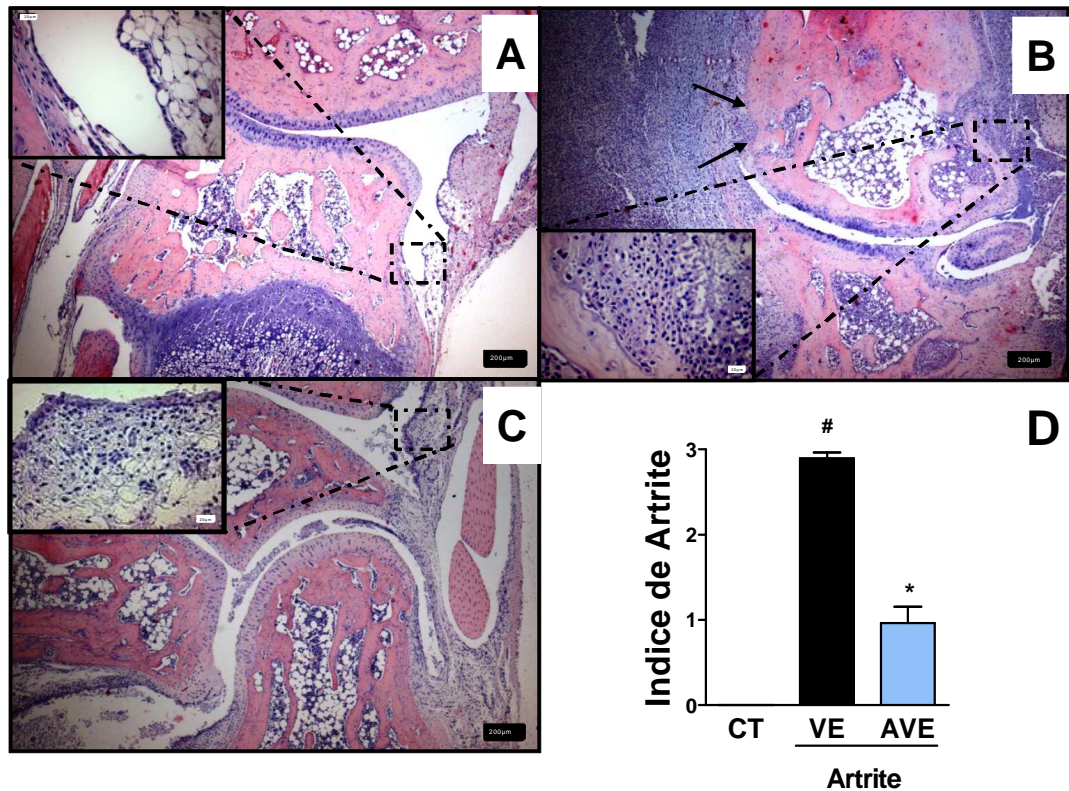


Figura 15 Efeito do tratamento com agonista do receptor Mas, AVE 0991, sobre o perfil histopatológico das articulações de ratas submetidas à artrite induzida por adjuvante (AdIA). Uma emulsão contendo *Micobacterium butyricum* foi administrada, i.d, em ratas Holtzman. A partir do 10º dia após indução de artrite, AVE 0991 (3 mg/kg) ou veículo – VE – (KOH 10mM em PBS 1x estéril) foram administrados (gavagem) aos animais, uma vez ao dia, até o 16º dia. Aos animais do grupo controle (CT) foi administrada apenas uma emulsão contendo óleo + água. Cortes representativos da articulação radio-carpal das ratas controle (A), veículo (B), e tratadas com AVE 0991 (3 mg/kg) (C) foram obtidas no 16º dia. Os cortes histológicos foram corados com Eosina e Hematoxina, onde as barras brancas representam 20 µm e as barras pretas 100 µm de comprimento. Inserts em A e C destacam a integridade da membrana sinovial e ausência de infiltrado inflamatório. Insert em B destaca a reabsorção óssea e formação de panus (setas). O índice de artrite (D) representa uma medida quantitativa do grau de acometimento histopatológico observado (descrição na sessão 3.4.4). As barras representam a média ± EPM de 5-8 ratas por grupo. (*) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo veículo e (#) para $P < 0,05$ quando comparado à média do grupo controle (ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newman-Keuls).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o papel do SRA no processo inflamatório da artrite experimental por meio da administração de antagonistas e agonistas de diferentes receptores angiotensinérgicos. Inicialmente, foram confirmados e ampliados dados obtidos previamente por outros autores (Price et al., 2007; Sagawa et al., 2005) de que o antagonista do receptor AT₁, Losartan, melhora significativamente o processo inflamatório na artrite experimental (**Figura 29**). No entanto, o resultado mais relevante e inovador deste estudo diz respeito aos significativos efeitos anti-inflamatórios decorrentes da ativação do receptor Mas em modelos experimentais de artrite (**Figura 29**). Este estudo apresenta evidências de que o composto AVE 0991, agonista do receptor Mas (Santos and Ferreira, 2006; Wiemer et al., 2002), apresenta potencial terapêutico para utilização em diferentes formas de artrite. Além disto, demonstramos que a expressão de citocinas e a interação leucócito-célula endotelial são alvos importantes da ação de fármacos que alteram o SRA.

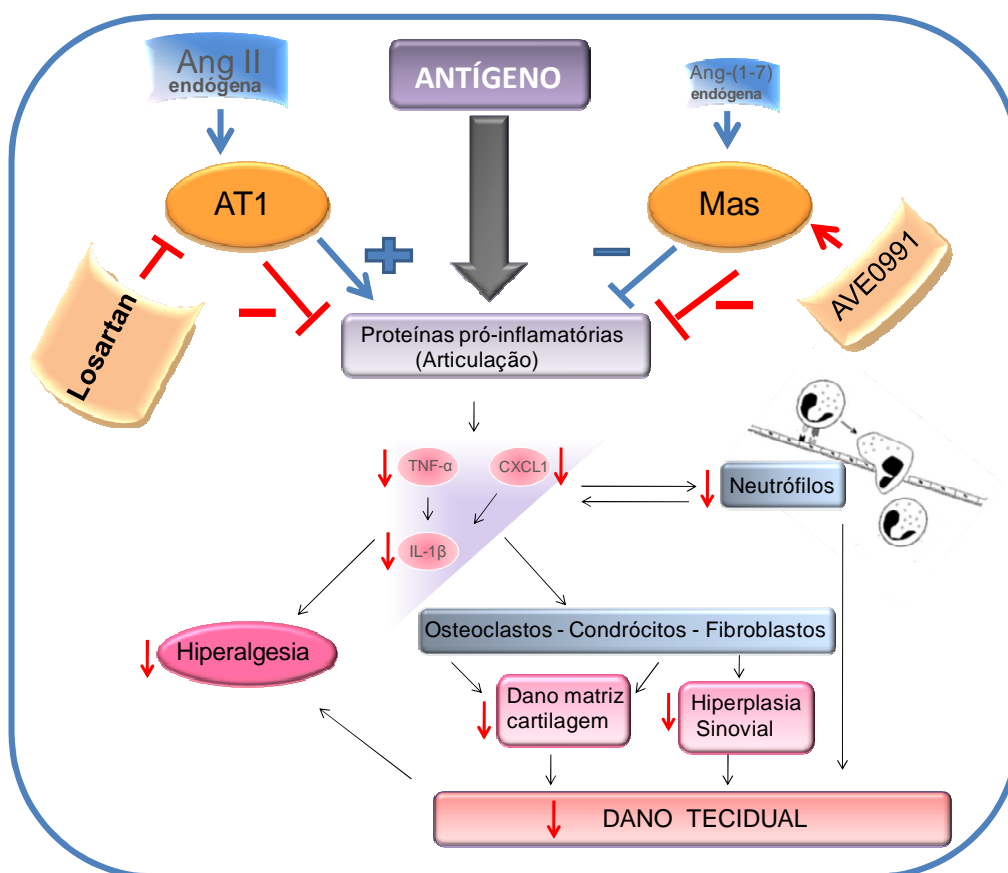


Figura 29 Representação esquemática dos principais resultados observados no estudo do efeito da modulação farmacológica do SRA na artrite experimental.

A expressão de receptores de AT₁ na sinóvia humana havia sido descrita há vários anos (Walsh et al., 1994). Outra informação importante refere-se à atividade aumentada da ECA na sinóvia de pacientes com artrite (Veale et al., 1992), sugerindo maior capacidade de síntese local de Ang II. O papel da Ang II como um agente pró-inflamatório já está bem estabelecido (Abu Nabah et al., 2007; Nabah et al., 2004; Peng et al., 2002; Ruiz-Ortega et al., 2001a; Ruiz-Ortega et al., 2001b). A Ang II participa da ativação e regulação de NF-κB e de genes relacionados com atividade inflamatória *in vivo* e *in vitro* (Ruiz-Ortega et al., 2000; Ruiz-Ortega et al., 2001b). Além disso, vários estudos mostram que Ang II estimula a produção de quimiocinas e citocinas e a expressão de moléculas de adesão, que contribuem para a migração de células inflamatórias ao sítio de lesão (Mateo et al., 2006; Nabah et al., 2004; Ruiz-Ortega et al., 2001b).

Alguns estudos têm mostrado também a participação do SRA no curso da artrite. Sagawa et al. (2005) verificaram que o tratamento com antagonistas do receptor AT₁ (ARBs) atenua a expressão da doença em modelo animal de artrite induzida por colágeno (CIA). Price et al. (2007) observaram que o tratamento com Losartan reduziu os níveis da citocina pró-inflamatória TNF-α na sinóvia de pacientes com artrite, bem como o edema articular em modelo animal de artrite. A partir dessas evidências, propusemos avaliar os efeitos e mecanismos envolvidos no tratamento com antagonistas do receptor AT₁.

Dessa forma, o bloqueio do eixo clássico do SRA, ECA – Ang II – AT₁, a partir da utilização do Losartan, antagonista do receptor AT₁, produziu efeitos anti-inflamatórios nos dois modelos de artrite estudados: artrite aguda induzida por mBSA (artrite induzida por antígeno - AIA) e artrite crônica induzida por adjuvante (AdIA). Em ambos os modelos experimentais, o Losartan reduziu o infiltrado celular, a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a dor, importante sinal local de inflamação. Além disso, o tratamento evitou alterações histológicas mais intensas em decorrência da doença, e demonstrou, pela primeira vez, efeito anti-hiperalgésico em modelos de artrite.

Tendo em vista a primeira demonstração da presença do receptor Mas em tecidos periarticulares de animais com AIA e controles, pareceu-nos razoável testar também a hipótese de participação do eixo contrarregulatório do SRA, ECA 2 – Ang-

(1-7) – Mas, nos mesmos modelos experimentais de artrite por meio da utilização de agonistas do receptor Mas. Foram, então, utilizados o ligante endógeno do receptor, a Ang-(1-7) (Santos et al., 2003) e o agonista sintético, ativo por via oral, desse receptor, o composto AVE 0991 (Santos and Ferreira, 2006; Wiemer et al., 2002). Dessa forma, à semelhança do que foi observado para o Losartan, houve redução no processo inflamatório articular em decorrência da ativação do receptor Mas, tanto na AIA como na AdIA. Além disso, pôde-se verificar que a deleção gênica do receptor Mas piora alguns parâmetros inflamatórios que acompanham a artrite.

A redução do acúmulo de neutrófilos e da lesão tecidual foi associada à menor produção local de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 β e da quimiocina ativadora de neutrófilos (CXCL1/CINC). É bem estabelecido que as citocinas sejam responsáveis pelo início e perpetuação da resposta inflamatória na AR, bem como favoreçam o influxo de neutrófilos para os sítios de lesão (Feldmann et al., 1996b; Passos et al., 2004). Nesse contexto, o TNF- α apresenta um papel chave na patogênese da AR (Feldmann, 2002; Feldmann et al., 1996b), facilitando o influxo de leucócitos, que, por sua vez, são capazes de aumentar ainda mais a produção local dessa citocina, gerando um ciclo vicioso (Bombini et al., 2004; Canetti et al., 2001). De forma semelhante, quimiocinas ativadoras de neutrófilos, tais como CXCL1, são importantes para o recrutamento dessas células em modelos animais, que, por sua vez, também estimulam a produção de quimiocinas.

Estudos anteriores também evidenciaram o papel do SRA no recrutamento de neutrófilos e na produção de citocinas. Price e cols (2007) associaram a redução da concentração de TNF- α com a melhora clínica da artrite após utilização de Losartan. Abu Nabah e cols (2007) demonstraram o potencial da Ang II em estimular os neutrófilos e a produção de algumas quimiocinas, tais como CINC (CXCL1) na cavidade peritoneal. Além disso, este mesmo estudo mostrou que o tratamento com Losartan foi capaz de inibir tais respostas. Oudit e cols (2007), avaliando animais com deleção genética do gene da ECA2, sugeriram a participação do eixo contrarregulatório do SRA como modulador da produção de citocinas e do influxo de neutrófilos em animais com cardiomiopatia. Também foi verificado o efeito renoprotetor da administração de Ang-(1-7) em animais com glomerulonefrite associado à expressiva redução da citocina TGF- β (Zhang et al., 2010).

Inúmeras evidências mostram a interação positiva entre citocinas/ quimiocinas e neutrófilos no processo de inflamação e lesão do tecido articular (Bombini et al., 2004; Canetti et al., 2001; Cascao et al.; 2010, Coelho et al., 2008; Cunha et al., 2008a; Cunha et al., 2005). Tanto o bloqueio do receptor AT_1 , pela administração de Losartan, quanto a ativação do receptor Mas, pelo tratamento com Ang-(1-7) ou AVE 0991, foram eficazes em reduzir influxo de neutrófilos, a produção de TNF- α e CXCL1, demonstrando que a intervenção farmacológica junto ao SRA foi potente o suficiente para impedir a interação entre as citocinas e os leucócitos na indução da inflamação e da lesão articular, tanto no modelo de artrite aguda (AIA), quanto crônica (AdIA).

Histologicamente, foi possível detectar redução significativa do infiltrado celular sinovial, da hiperplasia de sínovia, e da reabsorção óssea (específica para o modelo de AdIA) após administração de Losartan ou de AVE 0991. A maior preservação da arquitetura articular decorre provavelmente da redução da migração de neutrófilos e da menor produção local de citocinas. Esse resultado pode ser atribuído, pelo menos em parte, à redução do estímulo direto dos neutrófilos sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que estão relacionadas à maior susceptibilidade à doença (Cedergren et al., 2007). Além disso, os neutrófilos estão envolvidos nos processos de diferenciação celular e reabsorção óssea (Poubelle et al., 2007). No que se refere às citocinas, a redução da produção local de TNF- α foi verificada em resposta a ambos os tratamentos (Losartan e AVE 0991), administrados nos modelos agudo e crônico de artrite. Esse efeito certamente também contribuiu para a melhora da artrite experimental, uma vez que o TNF- α é capaz de direcionar a formação de osteoclastos, podendo, inclusive, mobilizar seus precursores da medula óssea (Li et al., 2004; Ritchlin et al., 2003) e induzir erosões espontâneas e inflamação articular, quando sua expressão encontra-se aumentada (Keffer et al., 1991).

A redução da reposta inflamatória obtida por meio da intervenção farmacológica no SRA, tanto pelo bloqueio do receptor AT_1 quanto pela ativação do receptor Mas, associou-se à recuperação funcional articular, refletida pela redução da hipernocicepção avaliada nos camundongos com AIA. A dor é considerada o principal sintoma em pacientes com artrite e frequentemente causa importante perda de função (Hallert et al., 2004). A hipernocicepção na artrite é decorrente,

principalmente, do processo inflamatório associado à doença (Cunha et al., 2008a; Cunha et al., 2005; Kasama et al., 2005). No entanto, observa-se que a hipernocicepção não decorre somente da ativação direta de nociceptores, mas também pode ser produzida pela liberação local de citocinas (Cunha et al., 2005; Cunha et al., 2008b; Kasama et al., 2005) associada à migração de neutrófilos (Cunha et al., 2008b; Levine et al., 1985). Desta forma, pode-se dizer que, o processo inflamatório articular é decorrente da liberação em cascata de citocinas, que contribuem para os fenômenos de dor e perda de função articular (Cunha and Ferreira, 2003; Cunha et al., 2005; Verri et al., 2006). O estudo de Cunha e cols (2008) realizado em camundongos submetidos ao modelo de artrite induzida por mBSA sugere que a inflamação decorrente da artrite seja mediada inicialmente pela produção de TNF- α que, sequencialmente, ativa a liberação de IL-1 β e CXCL1. Essas citocinas, por sua vez, estimulam a liberação de mediadores finais do processo inflamatório, como prostanóides e aminas simpatomiméticas, os quais sensibilizam fibras aferentes nociceptivas.

No presente estudo, a redução da hipernocicepção foi acompanhada por uma menor taxa de produção de TNF- α e CXCL1 após a administração de Losartan, e uma menor produção de TNF- α , IL-1 β e CXCL1 após administração de AVE 0991 ou Ang-(1-7). Além disso, ainda ocorreu uma redução de neutrófilos em ambos os casos. Esses resultados indicam que a modulação farmacológica do SRA é capaz de atuar em importantes vias relacionadas à gênese da dor inflamatória observada na artrite.

Alguns trabalhos descrevem o papel da Ang II em modular a nocicepção no sistema nervoso central (Haulica et al., 1986; Marques-Lopes et al., 2009; Pelegrini-da-Silva et al., 2005). Um exemplo é o estudo de Marques-Lopes e cols (2009) demonstrando que a injeção de Ang II na região ventrolateral caudal do bulbo foi capaz de induzir hipernocicepção, detectada em testes de indução de dor aguda por estímulo inflamatório. Tal estudo mostrou também que a administração de Losartan evitou a hipernocicepção observada. Em estudo mais recente, os mesmos autores (Marques-Lopes et al., 2010) mostraram que o efeito hiperalgésico de Ang II é mediado por um grupo de células noradrenérgicas A5. Existem evidências de que outros peptídeos do SRA sejam capazes de modular a hipernocicepção (Pelegrini-da-Silva et al., 2005) Por exemplo, foi demonstrado papel antinociceptivo da Ang III

na substância cinzenta periaquedutal (Pelegrini-da-Silva et al., 2005). Apesar desses achados não serem diretamente associados aos mecanismos de nocicepção inflamatória envolvidos na artrite, é possível que os mediadores do SRA modulem respostas nociceptivas de naturezas diversas.

A fim de avaliar o papel endógeno do eixo contrarregulatório do SRA no processo inflamatório presente na artrite, foi realizado a indução de artrite por mBSA em camundongos com deleção genética para o receptor Mas de Ang-(1-7). Nossos resultados mostraram que os camundongos deficientes de receptor Mas (C57Bl/6 Mas^{-/-}) apresentam um quadro inflamatório mais acentuado do que os camundongos controle (C57Bl/6 Mas^{+/+}), também acometidos pela artrite. Esses resultados corroboram a hipótese de que o receptor Mas apresenta um papel endógeno no controle das respostas inflamatórias verificadas na artrite induzida por antígeno, entretanto a intensidade desse efeito endógeno é extremamente pequena quando comparada às respostas anti-inflamatórias verificadas com a ativação do receptor Mas por administração farmacológica de AVE 0991 ou Ang-(1-7).

Conforme já mencionado, as intervenções farmacológicas no SRA (bloqueio do receptor AT₁ e estimulação do receptor Mas) produziram redução do infiltrado de neutrófilos em ambos os modelos experimentais avaliados. A inibição do influxo de neutrófilos foi devida, pelo menos em parte, à diminuição da produção local de quimiocinas. No entanto, era possível que o SRA também interferisse diretamente nas interações leucócito-endoteliais na sinóvia, impedindo, dessa forma, o influxo de neutrófilos para o tecido lesado. Os resultados do presente estudo demonstraram que, tanto a administração de losartan quanto o tratamento com AVE 0991, reduziram significativamente, e por efeito direto as taxas de rolamento e adesão leucocitárias na microvasculatura de camundongos com artrite. Isto pode ser afirmado devido ao fato de que os compostos foram administrados poucos minutos antes do procedimento da microscopia intravital, e, neste momento, os mediadores inflamatórios já haviam sido produzidos/liberados.

A ativação do receptor AT₁ pela Ang II aumenta o rolamento e adesão leucocitárias, conforme já demonstrado em estudos anteriores (Mateo et al., 2006; Nabah et al., 2004). Tais estudos avaliaram o potencial pró-inflamatório da Ang II em recrutar leucócitos, liberar quimiocinas e estimular as interações leucócito-endoteliais na microcirculação do mesentério. Foi também verificado que os efeitos inflamatórios

da Ang II decorrem da ativação do receptor AT₁, sugerindo o potencial terapêutico do bloqueio farmacológico deste receptor (Mateo et al., 2006).

Em vários sistemas, especialmente no cardiovascular e renal, os efeitos decorrentes da ativação do receptor AT₁ pela Ang II são frequentemente opostos aos obtidos pela ação da Ang-(1-7) sobre seu receptor Mas [ver para revisão (Santos et al., 2008b)]. Nesse contexto, o presente estudo sugere que as ações destes dois eixos do SRA também sejam opostas no processo inflamatório, onde a interação entre Ang-(1-7) e receptor Mas exerce efeitos anti-inflamatórios enquanto o receptor AT₁ medeia as ações pró-inflamatórias da Ang II.

Finalmente, o impacto de nossos resultados vai além do potente efeito anti-inflamatório observado pelos compostos estudados. Nosso estudo sugere ainda que: 1) Losartan, que é um dos principais medicamentos usados no tratamento de doenças cardiovasculares e renais, de baixo custo e poucos efeitos adversos descritos (Aulakh et al., 2007; Chung and Unger, 1999), pode apresentar também efeitos benéficos no tratamento da artrite. Tendo em vista que as doenças cardiovasculares são as principais causas de morte em pacientes com AR (Reilly et al., 1990), o uso de Losartan, fármaco sabidamente cardioprotetor, pode-se tornar um agente de escolha no controle da inflamação em pacientes com artrite. 2) Demonstramos também, pela primeira vez, que o receptor Mas está presente no tecido articular e desempenha um papel protetor no contexto da artrite, o que torna, portanto, seu agonista oral, o composto AVE 0991, um novo candidato ao tratamento de doenças inflamatórias como a artrite. Vale ressaltar ainda que este composto também apresenta efeitos cardio e renoprotetores (Benter et al., 2006; Silveira et al., 2009).

6 SUMÁRIO E CONCLUSÃO

- (i) a inibição do receptor AT_1 de Ang II, através do uso de Losartan, apresentou efeitos anti-inflamatórios e anti-hiperalgésicos em modelos de artrite experimental aguda e crônica.
 - (ii) a ativação do receptor Mas, por meio da administração de Ang-(1-7) e de AVE 0991, exerce potente efeito anti-inflamatório nos modelos de artrite aguda e crônica.
 - (iii) a ausência do receptor Mas de Ang-(1-7) provoca uma piora, pouco expressiva da inflamação nos animais submetidos à artrite por mBSA, sugerindo a existência de um papel endógeno do eixo ECA2 – Ang-(1-7) – Mas na artrite.
 - (iv) Do ponto de vista mecanístico, nosso estudo demonstrou que as duas formas de intervenção farmacológica sobre o SRA (bloqueio do receptor AT_1 e estímulo ao receptor Mas) inibem a produção local de citocinas e interferem com as interações leucócito-endoteliais na microvasculatura sinovial.
 - (v) No contexto da inflamação decorrente da artrite, o SRA também funciona como um sistema bidirecional no qual os dois eixos se contra-regulam: a interação entre Ang-(1-7) e receptor Mas exerce efeitos anti-inflamatórios e, em contrapartida, a interação entre Ang II e o receptor AT_1 medeia ações pró-inflamatórias.
 - (vi) O uso dos bloqueadores do receptor AT_1 ou ativadores de receptor Mas podem representar novas opções terapêuticas para pacientes com artrite, premissa a ser avaliada em estudos clínicos.
-
-

7 Referências Bibliográficas

2002. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum* 46, 328-346.

Abu Nabah, Y.N., Losada, M., Estelles, R., Mateo, T., Company, C., Piqueras, L., Lopez-Gines, C., Sarau, H., Cortijo, J., Morcillo, E.J., Jose, P.J., Sanz, M.J., 2007. CXCR2 blockade impairs angiotensin II-induced CC chemokine synthesis and mononuclear leukocyte infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2370-2376.

Aggarwal, B.B., 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.

Aggarwal, B.B., Natarajan, K., 1996. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 7, 93-124.

Akgul, C., Moulding, D.A., Edwards, S.W., 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* 487, 318-322.

Alamanos, Y., Drosos, A.A., 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 4, 130-136.

Alvarez, A., Cerda-Nicolas, M., Naim Abu Nabah, Y., Mata, M., Issekutz, A.C., Panes, J., Lobb, R.R., Sanz, M.J., 2004. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* 104, 402-408.

Andersson, A.K., Li, C., Brennan, F.M., 2008. Recent developments in the immunobiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10, 204.

Anzilotti, C., Pratesi, F., Tommasi, C., Migliorini, P., Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmun Rev* 9, 158-160.

Arenas, I.A., Xu, Y., Lopez-Jaramillo, P., Davidge, S.T., 2004. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C779-784.

Askling, J., Bongartz, T., 2008. Malignancy and biologic therapy in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 20, 334-339.

Auer, J., Blass, M., Schulze-Koops, H., Russwurm, S., Nagel, T., Kalden, J.R., Rollinghoff, M., Beuscher, H.U., 2007. Expression and regulation of CCL18 in synovial fluid neutrophils of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 9, R94.

Aulakh, G.K., Sodhi, R.K., Singh, M., 2007. An update on non-peptide angiotensin receptor antagonists and related RAAS modulators. *Life Sci* 81, 615-639.

Baecklund, E., Iliadou, A., Askling, J., Ekbom, A., Backlin, C., Granath, F., Catrina, A.I., Rosenquist, R., Feltelius, N., Sundstrom, C., Klareskog, L., 2006. Association of chronic inflammation, not its treatment, with increased lymphoma risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54, 692-701.

Barsante, M.M., Cunha, T.M., Allegretti, M., Cattani, F., Policani, F., Bizzarri, C., Tafuri, W.L., Poole, S., Cunha, F.Q., Bertini, R., Teixeira, M.M., 2008. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Br J Pharmacol* 153, 992-1002.

Barsante, M.M., Roffe, E., Yokoro, C.M., Tafuri, W.L., Souza, D.G., Pinho, V., Castro, M.S., Teixeira, M.M., 2005. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* 516, 282-289.

Benter, I.F., Yousif, M.H., Anim, J.T., Cojocel, C., Diz, D.I., 2006. Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H684-691.

Bernal, J., Pitta, S.R., Thatai, D., 2006. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diastolic heart failure: potential for pharmacologic intervention. *Am J Cardiovasc Drugs* 6, 373-381.

Berton, G., Lowell, C.A., 1999. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* 11, 621-635.

Bezerra, M.M., Brain, S.D., Girao, V.C., Greenacre, S., Keeble, J., Rocha, F.A., 2007. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 374, 265-273.

Bhagat, K., Vallance, P., 1997. Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo. *Circulation* 96, 3042-3047.

Bizzarri, C., Beccari, A.R., Bertini, R., Cavicchia, M.R., Giorgini, S., Allegretti, M., 2006. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 112, 139-149.

Bjorkman, L., Dahlgren, C., Karlsson, A., Brown, K.L., Bylund, J., 2008. Phagocyte-derived reactive oxygen species as suppressors of inflammatory disease. *Arthritis Rheum* 58, 2931-2935.

Boers, M., Verhoeven, A.C., Markusse, H.M., van de Laar, M.A., Westhovens, R., van Denderen, J.C., van Zeben, D., Dijkmans, B.A., Peeters, A.J., Jacobs, P., van den Brink, H.R., Schouten, H.J., van der Heijde, D.M., Boonen, A., van der Linden, S., 1997. Randomised comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *Lancet* 350, 309-318.

Boissier, M.C., Assier, E., Biton, J., Denys, A., Falgarone, G., Bessis, N., 2009. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 76, 10-14.

Bolon, B., Campagnuolo, G., Zhu, L., Duryea, D., Zack, D., Feige, U., 2004. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha produce distinct, time-dependent patterns of acute arthritis in the rat knee. *Vet Pathol* 41, 235-243.

Bombini, G., Canetti, C., Rocha, F.A., Cunha, F.Q., 2004. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol* 496, 197-204.

Brennan, F.M., McInnes, I.B., 2008. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 118, 3537-3545.

Bresnihan, B., Alvaro-Gracia, J.M., Cobby, M., Doherty, M., Domljan, Z., Emery, P., Nuki, G., Pavelka, K., Rau, R., Rozman, B., Watt, I., Williams, B., Aitchison, R., McCabe, D., Musikic, P., 1998. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 41, 2196-2204.

Brosnihan, K.B., Li, P., Ferrario, C.M., 1996. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 27, 523-528.

Burger, D., Dayer, J.M., Palmer, G., Gabay, C., 2006. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 20, 879-896.

Bylund, J., MacDonald, K.L., Brown, K.L., Mydel, P., Collins, L.V., Hancock, R.E., Speert, D.P., 2007. Enhanced inflammatory responses of chronic granulomatous disease leukocytes involve ROS-independent activation of NF-kappa B. *Eur J Immunol* 37, 1087-1096.

Canetti, C., Silva, J.S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2001. Tumour necrosis factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. *Br J Pharmacol* 134, 1619-1628.

Carey, R.M., 2005. Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: the AT2 receptor comes of age. *Hypertension* 45, 840-844.

Cascao, R., Rosario, H.S., Souto-Carneiro, M.M., Fonseca, J.E., 2010. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev.*

Catterall, J.B., Carrere, S., Koshy, P.J., Degnan, B.A., Shingleton, W.D., Brinckerhoff, C.E., Rutter, J., Cawston, T.E., Rowan, A.D., 2001. Synergistic induction of matrix metalloproteinase 1 by interleukin-1alpha and oncostatin M in human chondrocytes involves signal transducer and activator of transcription and activator protein 1 transcription factors via a novel mechanism. *Arthritis Rheum* 44, 2296-2310.

Cedergren, J., Forslund, T., Sundqvist, T., Skogh, T., 2007. Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *J Rheumatol* 34, 2162-2170.

Chappell, M.C., 2007. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension* 50, 596-599.

Chappell, M.C., Diz, D.I., Yunis, C., Ferrario, C.M., 1998. Differential actions of angiotensin-(1-7) in the kidney. *Kidney Int Suppl* 68, S3-6.

Chung, O., Unger, T., 1999. Angiotensin II receptor blockade and end-organ protection. *Am J Hypertens* 12, 150S-156S.

Clapp, B.R., Hingorani, A.D., Kharbanda, R.K., Mohamed-Ali, V., Stephens, J.W., Vallance, P., MacAllister, R.J., 2004. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res* 64, 172-178.

Coelho, F.M., Pinho, V., Amaral, F.A., Sachs, D., Costa, V.V., Rodrigues, D.H., Vieira, A.T., Silva, T.A., Souza, D.G., Bertini, R., Teixeira, A.L., Teixeira, M.M., 2008. The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by

regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis Rheum* 58, 2329-2337.

Cotran, R.S., 1987. American Association of Pathologists president's address. New roles for the endothelium in inflammation and immunity. *Am J Pathol* 129, 407-413.

Criswell, L.A., Merlino, L.A., Cerhan, J.R., Mikuls, T.R., Mudano, A.S., Burma, M., Folsom, A.R., Saag, K.G., 2002. Cigarette smoking and the risk of rheumatoid arthritis among postmenopausal women: results from the Iowa Women's Health Study. *Am J Med* 112, 465-471.

Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2003. Peripheral hyperalgesic cytokines. *Adv Exp Med Biol* 521, 22-39.

Cunha, F.Q., Poole, S., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1992. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 107, 660-664.

Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Schivo, I.R., Napimoga, M.H., Parada, C.A., Poole, S., Teixeira, M.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2008a. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol* 83, 824-832.

Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1755-1760.

Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Valerio, D.A., Guerrero, A.T., Nogueira, L.G., Vieira, S.M., Souza, D.G., Teixeira, M.M., Poole, S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2008b. Role of cytokines in mediating mechanical hypernociception in a model of delayed-type hypersensitivity in mice. *Eur J Pain* 12, 1059-1068.

Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Vivancos, G.G., Moreira, I.F., Reis, S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res* 37, 401-407.

Dalbeth, N., Edwards, J., Fairchild, S., Callan, M., Hall, F.C., 2005. The non-thiol angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril suppresses inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44, 24-31.

Dayer, J.M., Bresnihan, B., 2002. Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46, 574-578.

De-Matos, I.M., Talvani, A., Rocha, O.O., Freire-Maia, L., Teixeira, M.M., 2001. Evidence for a role of mast cells in the lung edema induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. *Toxicon* 39, 863-867.

de Gasparo, M., Husain, A., Alexander, W., Catt, K.J., Chiu, A.T., Drew, M., Goodfriend, T., Harding, J.W., Inagami, T., Timmermans, P.B., 1995. Proposed update of angiotensin receptor nomenclature. *Hypertension* 25, 924-927.

de Moura, M.M., dos Santos, R.A., Fontes, M.A., 2005. Evidence for a functional cardiac interaction between losartan and angiotensin-(1-7) receptors revealed by orthostatic tilting test in rats. *Br J Pharmacol* 144, 755-760.

del Rincon, I.D., Williams, K., Stern, M.P., Freeman, G.L., Escalante, A., 2001. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. *Arthritis Rheum* 44, 2737-2745.

Derdau, V., Oekonomopoulos, R., Schubert, G., 2003. ¹⁴C-labeled and large-scale synthesis of the angiotensin-(1-7)-receptor agonist AVE 0991 by cross-coupling reactions. *J Org Chem* 68, 5168-5173.

Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., Acton, S., 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87, E1-9.

Duncia, J.V., Chiu, A.T., Carini, D.J., Gregory, G.B., Johnson, A.L., Price, W.A., Wells, G.J., Wong, P.C., Calabrese, J.C., Timmermans, P.B., 1990. The discovery of potent nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: a new class of potent antihypertensives. *J Med Chem* 33, 1312-1329.

Dunlop, D.D., Manheim, L.M., Yelin, E.H., Song, J., Chang, R.W., 2003. The costs of arthritis. *Arthritis Rheum* 49, 101-113.

Eberhardt, W., Huwiler, A., Beck, K.F., Walpen, S., Pfeilschifter, J., 2000. Amplification of IL-1 beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression by superoxide in rat glomerular mesangial cells is mediated by increased activities of NF-kappa B and activating protein-1 and involves activation of the mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol* 165, 5788-5797.

Edwards, J.C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D.R., Stevens, R.M., Shaw, T., 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 350, 2572-2581.

Engeli, S., 2006. Role of the renin-angiotensin- aldosterone system in the metabolic syndrome. *Contrib Nephrol* 151, 122-134.

Esensten, J.H., Wofsy, D., Bluestone, J.A., 2009. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 5, 560-565.

Eyles, J.L., Roberts, A.W., Metcalf, D., Wicks, I.P., 2006. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2, 500-510.

Faria-Silva, R., Duarte, F.V., Santos, R.A., 2005. Short-term angiotensin(1-7) receptor MAS stimulation improves endothelial function in normotensive rats. *Hypertension* 46, 948-952.

Feldmann, M., 2002. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2, 364-371.

Feldmann, M., Brennan, F.M., Maini, R.N., 1996a. Rheumatoid arthritis. *Cell* 85, 307-310.

Feldmann, M., Brennan, F.M., Maini, R.N., 1996b. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14, 397-440.

Ferrari, P., 2007. Prescribing angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 12, 81-89.

Ferrario, C.M., Jessup, J., Chappell, M.C., Averill, D.B., Brosnihan, K.B., Tallant, E.A., Diz, D.I., Gallagher, P.E., 2005a. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation* 111, 2605-2610.

Ferrario, C.M., Jessup, J., Gallagher, P.E., Averill, D.B., Brosnihan, K.B., Ann Tallant, E., Smith, R.D., Chappell, M.C., 2005b. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int* 68, 2189-2196.

Ferreira, A.J., Santos, R.A., 2005. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol Res* 38, 499-507.

Ferreira, A.J., Santos, R.A., Almeida, A.P., 2001. Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension* 38, 665-668.

Ferreira, P.M., Souza Dos Santos, R.A., Campagnole-Santos, M.J., 2007. Angiotensin-(3-7) pressor effect at the rostral ventrolateral medulla. *Regul Pept* 141, 168-174.

Ferreira, S.H., Nakamura, M., de Abreu Castro, M.S., 1978. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins* 16, 31-37.

Firestein, G.S., 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423, 356-361.

Firestein, G.S., 2005. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 11, S39-44.

Fontana, A., Hengartner, H., Weber, E., Fehr, K., Grob, P.J., Cohen, G., 1982. Interleukin 1 activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2, 49-53.

Fricke, D., Damerau, B., Vogt, W., 1985. Adhesion of guinea pig polymorphonuclear leukocytes to autologous aortic strips: influence of chemotactic factors and of pharmacological agents which affect arachidonic acid metabolism. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 78, 429-437.

Fujii, A., Nakano, D., Katsuragi, M., Ohkita, M., Takaoka, M., Ohno, Y., Matsumura, Y., 2006. Role of gp91phox-containing NADPH oxidase in the deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension. *Eur J Pharmacol* 552, 131-134.

Fujiwara, K., Ohkawara, S., Takagi, K., Yoshinaga, M., Matsukawa, A., 2002. Involvement of CXC chemokine growth-related oncogene-alpha in monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits. *Lab Invest* 82, 1297-1304.

Gallagher, P.E., Tallant, E.A., 2004. Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis* 25, 2045-2052.

Gard, P.R., Rusted, J.M., 2004. Angiotensin and Alzheimer's disease: therapeutic prospects. *Expert Rev Neurother* 4, 87-96.

Gaston, J.S., 2008. Cytokines in arthritis--the 'big numbers' move centre stage. *Rheumatology (Oxford)* 47, 8-12.

Gerard, C., Rollins, B.J., 2001. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2, 108-115.

Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone, M.A., Jr., Luster, A.D., Luscinskas, F.W., Rosenzweig, A., 1999. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398, 718-723.

Gomez-Reino, J.J., Carmona, L., Valverde, V.R., Mola, E.M., Montero, M.D., 2003. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum* 48, 2122-2127.

Gomez, R.A., Norling, L.L., Wilfong, N., Isakson, P., Lynch, K.R., Hock, R., Quesenberry, P., 1993. Leukocytes synthesize angiotensinogen. *Hypertension* 21, 470-475.

Gonzalez-Gay, M.A., Gonzalez-Juanatey, C., Martin, J., 2005. Rheumatoid arthritis: a disease associated with accelerated atherogenesis. *Semin Arthritis Rheum* 35, 8-17.

Grammatopoulos, T.N., Jones, S.M., Ahmadi, F.A., Hoover, B.R., Snell, L.D., Skoch, J., Jhaveri, V.V., Poczobutt, A.M., Weyhenmeyer, J.A., Zawada, W.M., 2007. Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan, reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. *Mol Neurodegener* 2, 1.

Gravallese, E.M., Manning, C., Tsay, A., Naito, A., Pan, C., Amento, E., Goldring, S.R., 2000. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 43, 250-258.

Greene, L.J., Spadaro, A.C., Martins, A.R., Perussi De Jesus, W.D., Camargo, A.C., 1982. Brain endo-oligopeptidase B: a post-proline cleaving enzyme that inactivates angiotensin I and II. *Hypertension* 4, 178-184.

Grespan, R., Fukada, S.Y., Lemos, H.P., Vieira, S.M., Napimoga, M.H., Teixeira, M.M., Fraser, A.R., Liew, F.Y., McInnes, I.B., Cunha, F.Q., 2008. CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 58, 2030-2040.

Grobe, J.L., Mecca, A.P., Lingis, M., Shenoy, V., Bolton, T.A., Machado, J.M., Speth, R.C., Raizada, M.K., Katovich, M.J., 2007. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H736-742.

Grobe, J.L., Mecca, A.P., Mao, H., Katovich, M.J., 2006. Chronic angiotensin-(1-7) prevents cardiac fibrosis in DOCA-salt model of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H2417-2423.

Guerrero, A.T., Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Silva, T.A., Schivo, I.R., Dal-Secco, D., Canetti, C., Rocha, F.A., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2008. Involvement of LTB4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE2. *J Leukoc Biol* 83, 122-130.

Guo, Y.J., Li, W.H., Wu, R., Xie, Q., Cui, L.Q., 2008. ACE2 overexpression inhibits angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in macrophages. *Arch Med Res* 39, 149-154.

Hagiwara, S., Iwasaka, H., Matumoto, S., Hidaka, S., Noguchi, T., 2009. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the inflammatory response in in vivo and in vitro models. *Crit Care Med* 37, 626-633.

Hallert, E., Husberg, M., Jonsson, D., Skogh, T., 2004. Rheumatoid arthritis is already expensive during the first year of the disease (the Swedish TIRA project). *Rheumatology (Oxford)* 43, 1374-1382.

Haulica, I., Branisteanu, D.D., Haulica-Boisteanu, D., Lozneanu, S., 1986. [Role of the endothelium in vascular reactivity to angiotensin]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 90, 87-91.

Heitsch, H.W., Wiemer G., 2000. Patent number: WO200068226-A1.

Hernandez-Presa, M., Bustos, C., Ortego, M., Tunon, J., Renedo, G., Ruiz-Ortega, M., Egido, J., 1997. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 95, 1532-1541.

Horai, R., Saijo, S., Tanioka, H., Nakae, S., Sudo, K., Okahara, A., Ikuse, T., Asano, M., Iwakura, Y., 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 191, 313-320.

Irace, C., Mancuso, G., Fiaschi, E., Madia, A., Sesti, G., Gnasso, A., 2004. Effect of anti TNFalpha therapy on arterial diameter and wall shear stress and HDL cholesterol. *Atherosclerosis* 177, 113-118.

Iwai, M., Horiuchi, M., 2009. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis. *Hypertens Res* 32, 533-536.

Iwata, M., Cowling, R.T., Gurantz, D., Moore, C., Zhang, S., Yuan, J.X., Greenberg, B.H., 2005. Angiotensin-(1-7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H2356-2363.

Iyer, S.N., Ferrario, C.M., Chappell, M.C., 1998. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 31, 356-361.

Jacobi, J., Kristal, B., Chezar, J., Shaul, S.M., Sela, S., 2005. Exogenous superoxide mediates pro-oxidative, proinflammatory, and procoagulatory changes in primary endothelial cell cultures. *Free Radic Biol Med* 39, 1238-1248.

Jacquot, C., Idatte, J.M., Bedrossian, J., Weiss, Y., Safar, M., Bariety, J., 1978. Long-term blood pressure changes in renal homotransplantation. *Arch Intern Med* 138, 233-236.

Janeway, C., 2005. *Immunobiology : the immune system in health and disease*, 6th ed. Garland Science, New York.

Johnson, A.G., 1997. NSAIDs and increased blood pressure. What is the clinical significance? *Drug Saf* 17, 277-289.

Kannel, W.B., McGee, D., Gordon, T., 1976. A general cardiovascular risk profile: the Framingham Study. *Am J Cardiol* 38, 46-51.

Kasama, T., Miwa, Y., Isozaki, T., Odai, T., Adachi, M., Kunkel, S.L., 2005. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 273-279.

Kaschina, E., Unger, T., 2003. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press* 12, 70-88.

Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., Kollias, G., 1991. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 10, 4025-4031.

Khasar, S.G., McCarter, G., Levine, J.D., 1999. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol* 81, 1104-1112.

Klareskog, L., Catrina, A.I., Paget, S., 2009. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373, 659-672.

Klareskog, L., Padyukov, L., Alfredsson, L., 2007. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 19, 49-54.

Klareskog, L., van der Heijde, D., de Jager, J.P., Gough, A., Kalden, J., Malaise, M., Martin Mola, E., Pavelka, K., Sany, J., Settas, L., Wajdula, J., Pedersen, R., Fatenejad, S., Sanda, M., 2004. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 363, 675-681.

Kranzhofer, R., Browatzki, M., Schmidt, J., Kubler, W., 1999. Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 826-828.

Krege, J.H., Hodgin, J.B., Hagan, J.R., Smithies, O., 1995. A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 25, 1111-1115.

Kremer, J.M., Dougados, M., Emery, P., Durez, P., Sibia, J., Shergy, W., Steinfeld, S., Tindall, E., Becker, J.C., Li, T., Nuamah, I.F., Aranda, R., Moreland, L.W., 2005. Treatment of rheumatoid arthritis with the selective costimulation modulator

abatacept: twelve-month results of a phase iib, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 52, 2263-2271.

Kremer, J.M., Westhovens, R., Leon, M., Di Giorgio, E., Alten, R., Steinfeld, S., Russell, A., Dougados, M., Emery, P., Nuamah, I.F., Williams, G.R., Becker, J.C., Hagerty, D.T., Moreland, L.W., 2003. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N Engl J Med* 349, 1907-1915.

Kuba, K., Imai, Y., Penninger, J.M., 2006. Angiotensin-converting enzyme 2 in lung diseases. *Curr Opin Pharmacol* 6, 271-276.

Kuwabara, K., Yasui, K., Jyoyama, H., Maruyama, T., Fleisch, J.H., Hori, Y., 2000. Effects of the second-generation leukotriene B(4) receptor antagonist, LY293111Na, on leukocyte infiltration and collagen-induced arthritis in mice. *Eur J Pharmacol* 402, 275-285.

Lapteva, N., Ide, K., Nieda, M., Ando, Y., Hatta-Ohashi, Y., Minami, M., Dymshits, G., Egawa, K., Juji, T., Tokunaga, K., 2002. Activation and suppression of renin-angiotensin system in human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 194-200.

Lehrer, R.I., Ganz, T., Selsted, M.E., Babior, B.M., Curnutte, J.T., 1988. Neutrophils and host defense. *Ann Intern Med* 109, 127-142.

Lemos, V.S., Silva, D.M., Walther, T., Alenina, N., Bader, M., Santos, R.A., 2005. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 46, 274-279.

Leung, P.S., 2007. Mechanisms of protective effects induced by blockade of the renin-angiotensin system: novel role of the pancreatic islet angiotensin-generating system in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 24, 110-116.

Levine, J.D., Gooding, J., Donatoni, P., Borden, L., Goetzl, E.J., 1985. The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. *J Neurosci* 5, 3025-3029.

Li, P., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J., Ma, L., Boyce, B.F., Xing, L., 2004. RANK signaling is not required for TNFalpha-mediated increase in CD11(hi) osteoclast precursors but is essential for mature osteoclast formation in TNFalpha-mediated inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 19, 207-213.

Li, X., Rayford, H., Uhal, B.D., 2003. Essential roles for angiotensin receptor AT1a in bleomycin-induced apoptosis and lung fibrosis in mice. *Am J Pathol* 163, 2523-2530.

Lipsky, P.E., Brooks, P., Crofford, L.J., DuBois, R., Graham, D., Simon, L.S., van de Putte, L.B., Abramson, S.B., 2000a. Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med* 160, 913-920.

Lipsky, P.E., van der Heijde, D.M., St Clair, E.W., Furst, D.E., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Weisman, M., Emery, P., Feldmann, M., Harriman, G.R., Maini, R.N., 2000b. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* 343, 1594-1602.

Loot, A.E., Roks, A.J., Henning, R.H., Tio, R.A., Suurmeijer, A.J., Boomsma, F., van Gilst, W.H., 2002. Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation* 105, 1548-1550.

Lubberts, E., Koenders, M.I., van den Berg, W.B., 2005. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 7, 29-37.

Maini, R.N., Breedveld, F.C., Kalden, J.R., Smolen, J.S., Davis, D., Macfarlane, J.D., Antoni, C., Leeb, B., Elliott, M.J., Woody, J.N., Schaible, T.F., Feldmann, M., 1998.

Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 41, 1552-1563.

Mantovani, A., Dejana, E., 1987. Modulation of endothelial function by interleukin-1. A novel target for pharmacological intervention? *Biochem Pharmacol* 36, 301-305.

Marques-Lopes, J., Pinho, D., Albino-Teixeira, A., Tavares, I., The hyperalgesic effects induced by the injection of angiotensin II into the caudal ventrolateral medulla are mediated by the pontine A5 noradrenergic cell group. *Brain Res* 1325, 41-52.

Marques-Lopes, J., Pinto, M., Pinho, D., Morato, M., Patinha, D., Albino-Teixeira, A., Tavares, I., 2009. Microinjection of angiotensin II in the caudal ventrolateral medulla induces hyperalgesia. *Neuroscience* 158, 1301-1310.

Marques Neto, J., 1993. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. . *Rev Bras Reumatol* 33, 5.

Martel-Pelletier, J., McCollum, R., Fujimoto, N., Obata, K., Cloutier, J.M., Pelletier, J.P., 1994. Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 70, 807-815.

Mateo, T., Abu Nabah, Y.N., Abu Taha, M., Mata, M., Cerda-Nicolas, M., Proudfoot, A.E., Stahl, R.A., Issekutz, A.C., Cortijo, J., Morcillo, E.J., Jose, P.J., Sanz, M.J., 2006. Angiotensin II-induced mononuclear leukocyte interactions with arteriolar and venular endothelium are mediated by the release of different CC chemokines. *J Immunol* 176, 5577-5586.

Matsukawa, A., Yoshimura, T., Fujiwara, K., Maeda, T., Ohkawara, S., Yoshinaga, M., 1999. Involvement of growth-related protein in lipopolysaccharide-induced rabbit arthritis: cooperation between growth-related protein and IL-8, and interrelated

regulation among TNFalpha, IL-1, IL-1 receptor antagonist, IL-8, and growth-related protein. *Lab Invest* 79, 591-600.

McDougall, J.J., 2006. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Res Ther* 8, 220.

McInnes, I.B., Gracie, J.A., 2005. Targeting cytokines beyond tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Pain Headache Rep* 9, 405-411.

McInnes, I.B., Liew, F.Y., 2005. Cytokine networks--towards new therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 1, 31-39.

McInnes, I.B., Schett, G., 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7, 429-442.

McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., 1986. Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2204-2208.

McMillan, R.M., Foster, S.J., 1988. Leukotriene B4 and inflammatory disease. *Agents Actions* 24, 114-119.

Melzack, R., 1999. Pain--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 43, 880-884.

Merskey, H.B., N, 1994. Pain terms. In: Merskey, H.B., N (Ed.), *Classification of Chronic Pain*. IASP Press, Seattle, pp. 210-213.

Minaur, N.J., Jacoby, R.K., Cosh, J.A., Taylor, G., Rasker, J.J., 2004. Outcome after 40 years with rheumatoid arthritis: a prospective study of function, disease activity, and mortality. *J Rheumatol Suppl* 69, 3-8.

Morgan, S.L., Baggott, J.E., Lee, J.Y., Alarcon, G.S., 1998. Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during longterm, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular disease prevention. *J Rheumatol* 25, 441-446.

Mottonen, T., Hannonen, P., Leirisalo-Repo, M., Nissila, M., Kautiainen, H., Korpela, M., Laasonen, L., Julkunen, H., Luukkainen, R., Vuori, K., Paimela, L., Blafield, H., Hakala, M., Ilva, K., Yli-Kerttula, U., Puolakka, K., Jarvinen, P., Hakola, M., Piirainen, H., Ahonen, J., Palvimaki, I., Forsberg, S., Koota, K., Friman, C., 1999. Comparison of combination therapy with single-drug therapy in early rheumatoid arthritis: a randomised trial. FIN-RACo trial group. *Lancet* 353, 1568-1573.

Mukherjee, D., Nissen, S.E., Topol, E.J., 2001. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 286, 954-959.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A., 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52, 145-176.

Nabah, Y.N., Mateo, T., Estelles, R., Mata, M., Zagorski, J., Sarau, H., Cortijo, J., Morcillo, E.J., Jose, P.J., Sanz, M.J., 2004. Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines. *Circulation* 110, 3581-3586.

Nahmod, K.A., Vermeulen, M.E., Raiden, S., Salamone, G., Gamberale, R., Fernandez-Calotti, P., Alvarez, A., Nahmod, V., Giordano, M., Geffner, J.R., 2003. Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II. *FASEB J* 17, 491-493.

Nashel, D.J., 1986. Is atherosclerosis a complication of long-term corticosteroid treatment? *Am J Med* 80, 925-929.

Nathan, C., 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852.

Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173-182.

Nathan, C.F., 1987. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J Clin Invest* 80, 1550-1560.

Nishimura, A., Akahoshi, T., Takahashi, M., Takagishi, K., Itoman, M., Kondo, H., Takahashi, Y., Yokoi, K., Mukaida, N., Matsushima, K., 1997. Attenuation of monosodium urate crystal-induced arthritis in rabbits by a neutralizing antibody against interleukin-8. *J Leukoc Biol* 62, 444-449.

O'Dell, J.R., Haire, C.E., Erikson, N., Drymalski, W., Palmer, W., Eckhoff, P.J., Garwood, V., Maloley, P., Klassen, L.W., Wees, S., Klein, H., Moore, G.F., 1996. Treatment of rheumatoid arthritis with methotrexate alone, sulfasalazine and hydroxychloroquine, or a combination of all three medications. *N Engl J Med* 334, 1287-1291.

Ohkawa, F., Ikeda, U., Kanbe, T., Kawasaki, K., Shimada, K., 1995. Effects of inflammatory cytokines on vascular tone. *Cardiovasc Res* 30, 711-715.

Okamura, A., Rakugi, H., Ohishi, M., Yanagitani, Y., Takiuchi, S., Moriguchi, K., Fennessy, P.A., Higaki, J., Ogihara, T., 1999. Upregulation of renin-angiotensin system during differentiation of monocytes to macrophages. *J Hypertens* 17, 537-545.

Oparil, S., Haber, E., 1974a. The renin-angiotensin system (first of two parts). *N Engl J Med* 291, 389-401.

Oparil, S., Haber, E., 1974b. The renin-angiotensin system (second of two parts). *N Engl J Med* 291, 446-457.

Otsuka, M., Takahashi, H., Shiratori, M., Chiba, H., Abe, S., 2004. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor antagonist. *Thorax* 59, 31-38.

Oudit, G.Y., Kassiri, Z., Patel, M.P., Chappell, M., Butany, J., Backx, P.H., Tsushima, R.G., Scholey, J.W., Khokha, R., Penninger, J.M., 2007. Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice. *Cardiovasc Res* 75, 29-39.

Owen, C.A., Campbell, E.J., 1998. Angiotensin II generation at the cell surface of activated neutrophils: novel cathepsin G-mediated catalytic activity that is resistant to inhibition. *J Immunol* 160, 1436-1443.

Page, J., Henry, D., 2000. Consumption of NSAIDs and the development of congestive heart failure in elderly patients: an underrecognized public health problem. *Arch Intern Med* 160, 777-784.

Parada, C.A., Vivancos, G.G., Tambeli, C.H., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2003. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2923-2928.

Pasceri, V., Yeh, E.T., 1999. A tale of two diseases: atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 100, 2124-2126.

Passos, G.F., Fernandes, E.S., Campos, M.M., Araujo, J.G., Pesquero, J.L., Souza, G.E., Avellar, M.C., Teixeira, M.M., Calixto, J.B., 2004. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *J Immunol* 172, 1839-1847.

Pease, J.E., Williams, T.J., 2006. The attraction of chemokines as a target for specific anti-inflammatory therapy. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1, S212-221.

Pelegri-da-Silva, A., Martins, A.R., Prado, W.A., 2005. A new role for the renin-angiotensin system in the rat periaqueductal gray matter: angiotensin receptor-mediated modulation of nociception. *Neuroscience* 132, 453-463.

Peng, J., Gurantz, D., Tran, V., Cowling, R.T., Greenberg, B.H., 2002. Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ Res* 91, 1119-1126.

Pereira, R.M., Dos Santos, R.A., Teixeira, M.M., Leite, V.H., Costa, L.P., da Costa Dias, F.L., Barcelos, L.S., Collares, G.B., Simoes e Silva, A.C., 2007. The renin-angiotensin system in a rat model of hepatic fibrosis: evidence for a protective role of Angiotensin-(1-7). *J Hepatol* 46, 674-681.

Pettipher, E.R., Higgs, G.A., Henderson, B., 1986. Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 8749-8753.

Pinheiro, S.V., Simoes e Silva, A.C., Sampaio, W.O., de Paula, R.D., Mendes, E.P., Bontempo, E.D., Pesquero, J.B., Walther, T., Alenina, N., Bader, M., Bleich, M., Santos, R.A., 2004. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 44, 490-496.

Pinto, L.G., Cunha, T.M., Vieira, S.M., Lemos, H.P., Verri, W.A., Jr., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* 148, 247-256.

Poubelle, P.E., Chakravarti, A., Fernandes, M.J., Doiron, K., Marceau, A.A., 2007. Differential expression of RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. *Arthritis Res Ther* 9, R25.

Price, A., Lockhart, J.C., Ferrell, W.R., Gsell, W., McLean, S., Sturrock, R.D., 2007. Angiotensin II type 1 receptor as a novel therapeutic target in rheumatoid arthritis: in vivo analyses in rodent models of arthritis and ex vivo analyses in human inflammatory synovitis. *Arthritis Rheum* 56, 441-447.

Reilly, P.A., Cosh, J.A., Maddison, P.J., Rasker, J.J., Silman, A.J., 1990. Mortality and survival in rheumatoid arthritis: a 25 year prospective study of 100 patients. *Ann Rheum Dis* 49, 363-369.

Ridker, P.M., Cushman, M., Stampfer, M.J., Tracy, R.P., Hennekens, C.H., 1997. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 336, 973-979.

Ridker, P.M., Rifai, N., Rose, L., Buring, J.E., Cook, N.R., 2002. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 347, 1557-1565.

Ritchlin, C.T., Haas-Smith, S.A., Li, P., Hicks, D.G., Schwarz, E.M., 2003. Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 111, 821-831.

Robertson, M.J., Dougall, I.G., Harper, D., McKechnie, K.C., Leff, P., 1994. Agonist-antagonist interactions at angiotensin receptors: application of a two-state receptor model. *Trends Pharmacol Sci* 15, 364-369.

Rossi, D., Zlotnik, A., 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.

Roubenoff, R., Dellaripa, P., Nadeau, M.R., Abad, L.W., Muldoon, B.A., Selhub, J., Rosenberg, I.H., 1997. Abnormal homocysteine metabolism in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40, 718-722.

Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Konig, S., Wittig, B., Egido, J., 2000. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res* 86, 1266-1272.

Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Suzuki, Y., Egido, J., 2001a. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. *Nephrol Dial Transplant* 16 Suppl 1, 27-33.

Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Suzuki, Y., Ruperez, M., Egido, J., 2001b. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 321-329.

Ruster, C., Wolf, G., 2006. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2985-2991.

Saag, K.G., Cerhan, J.R., Kolluri, S., Ohashi, K., Hunninghake, G.W., Schwartz, D.A., 1997. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. *Ann Rheum Dis* 56, 463-469.

Sagawa, K., Nagatani, K., Komagata, Y., Yamamoto, K., 2005. Angiotensin receptor blockers suppress antigen-specific T cell responses and ameliorate collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum* 52, 1920-1928.

Santos, R.A., Ferreira, A.J., 2006. Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. *Cardiovasc Drug Rev* 24, 239-246.

Santos, R.A., Ferreira, A.J., Nadu, A.P., Braga, A.N., de Almeida, A.P., Campagnole-Santos, M.J., Baltatu, O., Iliescu, R., Reudelhuber, T.L., Bader, M., 2004. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* 17, 292-299.

Santos, R.A., Ferreira, A.J., Simoes, E.S.A.C., 2008a. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol* 93, 519-527.

Santos, R.A., Frezard, F., Ferreira, A.J., 2005. Angiotensin-(1-7): blood, heart, and blood vessels. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3, 383-391.

Santos, R.A., Simoes e Silva, A.C., Maric, C., Silva, D.M., Machado, R.P., de Buhr, I., Heringer-Walther, S., Pinheiro, S.V., Lopes, M.T., Bader, M., Mendes, E.P., Lemos, V.S., Campagnole-Santos, M.J., Schultheiss, H.P., Speth, R., Walther, T., 2003. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8258-8263.

Santos, R.A.S., Ferreira, A., Simões e Silva, A., 2008b. Angiotensins. In: *Cardiovascular Hormone systems*, Co, W.-V.V.G. (Ed.), pp. 67-100.

Sasaki, K., Yamano, Y., Bardhan, S., Iwai, N., Murray, J.J., Hasegawa, M., Matsuda, Y., Inagami, T., 1991. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351, 230-233.

Schaible, H.G., Ebersberger, A., Von Banchet, G.S., 2002. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 966, 343-354.

Schaible, H.G., Grubb, B.D., 1993. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 55, 5-54.

Schett, G., Firestein, G.S., 2010. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*.

Schiavone, M.T., Santos, R.A., Brosnihan, K.B., Khosla, M.C., Ferrario, C.M., 1988. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4095-4098.

Schulze-Koops, H., Kalden, J.R., 2001. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15, 677-691.

Shiozawa, S., Shiozawa, K., Fujita, T., 1983. Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus. *Arthritis Rheum* 26, 472-478.

Silman, A.J., Newman, J., MacGregor, A.J., 1996. Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum* 39, 732-735.

Silveira, K.D., Santos, R.A.S., Barroso, L.C., Lima, C.X., Teixeira, M.M., Simões e Silva, A.C., 2009. The oral agonist of angiotensin-(1-7) Mas receptor, AVE 091, exerts renoprotective and anti-inflammatory effects in an experimental model of nephrotic syndrome., In: *World Congress of Nephrology* (poster), Milan, Italy.

Silver, R.B., Reid, A.C., Mackins, C.J., Askwith, T., Schaefer, U., Herzlinger, D., Levi, R., 2004. Mast cells: a unique source of renin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13607-13612.

Simoese e Silva, A.C., Diniz, J.S., Pereira, R.M., Pinheiro, S.V., Santos, R.A., 2006a. Circulating renin Angiotensin system in childhood chronic renal failure: marked increase of Angiotensin-(1-7) in end-stage renal disease. *Pediatr Res* 60, 734-739.

Simoese e Silva, A.C., Pinheiro, S.V., Pereira, R.M., Ferreira, A.J., Santos, R.A., 2006b. The therapeutic potential of Angiotensin-(1-7) as a novel Renin-Angiotensin System mediator. *Mini Rev Med Chem* 6, 603-609.

Singh, G., Miller, J.D., Huse, D.M., Pettitt, D., D'Agostino, R.B., Russell, M.W., 2003. Consequences of increased systolic blood pressure in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30, 714-719.

Smith, R.D., Timmermans, P.B., 1994. Human angiotensin receptor subtypes. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3, 112-122.

Snow, M.H., Mikuls, T.R., 2005. Rheumatoid arthritis and cardiovascular disease: the role of systemic inflammation and evolving strategies of prevention. *Curr Opin Rheumatol* 17, 234-241.

Suzuki, Y., Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, O., Ruperez, M., Esteban, V., Egido, J., 2003. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 881-900.

Svensson, B., Boonen, A., Albertsson, K., van der Heijde, D., Keller, C., Hafstrom, I., 2005. Low-dose prednisolone in addition to the initial disease-modifying antirheumatic drug in patients with early active rheumatoid arthritis reduces joint destruction and increases the remission rate: a two-year randomized trial. *Arthritis Rheum* 52, 3360-3370.

Sweeney, S.E., Firestein, G.S., 2004. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 372-378.

Takemura, S., Klimiuk, P.A., Braun, A., Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 2001. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. *J Immunol* 167, 4710-4718.

Tallant, E.A., Ferrario, C.M., Gallagher, P.E., 2005. Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H1560-1566.

Tanahashi, N., 2006. [Stroke and renin-angiotensin system]. *Nippon Rinsho* 64, 1191-1199.

Taylor, P.C., Williams, R.O., Feldmann, M., 2004. Tumour necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. *Curr Opin Biotechnol* 15, 557-563.

Theuer, J., Dechend, R., Muller, D.N., Park, J.K., Fiebeler, A., Barta, P., Ganten, D., Haller, H., Dietz, R., Luft, F.C., 2002. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2, 3.

Tipnis, S.R., Hooper, N.M., Hyde, R., Karran, E., Christie, G., Turner, A.J., 2000. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275, 33238-33243.

Tox, U., Steffen, H.M., 2006. Impact of inhibitors of the Renin-Angiotensin-aldosterone system on liver fibrosis and portal hypertension. *Curr Med Chem* 13, 3649-3661.

Uemura, H., Ishiguro, H., Kubota, Y., 2006. Angiotensin II receptor blocker: possibility of antitumor agent for prostate cancer. *Mini Rev Med Chem* 6, 835-844.

Urech, D.M., Feige, U., Ewert, S., Schlosser, V., Ottiger, M., Polzer, K., Schett, G., Lichtlen, P., Anti-inflammatory and cartilage-protecting effects of an intra-articularly injected anti-TNF{alpha} single-chain Fv antibody (ESBA105) designed for local therapeutic use. *Ann Rheum Dis* 69, 443-449.

van der Helm-van Mil, A.H., Wesoly, J.Z., Huizinga, T.W., 2005. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 17, 299-304.

Veale, D., Yanni, G., Bresnihan, B., FitzGerald, O., 1992. Production of angiotensin converting enzyme by rheumatoid synovial membrane. *Ann Rheum Dis* 51, 476-480.

Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Parada, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 112, 116-138.

Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., Tummino, P., 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 277, 14838-14843.

Vivancos, G.G., Verri, W.A., Jr., Cunha, T.M., Schivo, I.R., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz J Med Biol Res* 37, 391-399.

Vossenaar, E.R., Nijenhuis, S., Helsen, M.M., van der Heijden, A., Senuki, T., van den Berg, W.B., van Venrooij, W.J., Joosten, L.A., 2003. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48, 2489-2500.

Walsh, D.A., Mapp, P.I., Wharton, J., Polak, J.M., Blake, D.R., 1993. Neuropeptide degrading enzymes in normal and inflamed human synovium. *Am J Pathol* 142, 1610-1621.

Walsh, D.A., Suzuki, T., Knock, G.A., Blake, D.R., Polak, J.M., Wharton, J., 1994. AT1 receptor characteristics of angiotensin analogue binding in human synovium. *Br J Pharmacol* 112, 435-442.

Wang, R., Ibarra-Sunga, O., Verlinski, L., Pick, R., Uhal, B.D., 2000. Abrogation of bleomycin-induced epithelial apoptosis and lung fibrosis by captopril or by a caspase inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L143-151.

Wassmann, S., Stumpf, M., Strehlow, K., Schmid, A., Schieffer, B., Bohm, M., Nickenig, G., 2004. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* 94, 534-541.

Weber, K.T., 1997. Fibrosis, a common pathway to organ failure: angiotensin II and tissue repair. *Semin Nephrol* 17, 467-491.

Wei, S., Kitaura, H., Zhou, P., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L., 2005. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 115, 282-290.

Weinblatt, M.E., Keystone, E.C., Furst, D.E., Moreland, L.W., Weisman, M.H., Birbara, C.A., Teoh, L.A., Fischkoff, S.A., Chartash, E.K., 2003. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* 48, 35-45.

Welches, W.R., Santos, R.A., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B., Greene, L.J., Ferrario, C.M., 1991. Evidence that prolyl endopeptidase participates in the processing of brain angiotensin. *J Hypertens* 9, 631-638.

Whitesall, S.E., Hoff, J.B., Vollmer, A.P., D'Alecy, L.G., 2004. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H2408-2415.

Wiemer, G., Dobrucki, L.W., Louka, F.R., Malinski, T., Heitsch, H., 2002. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension* 40, 847-852.

Williams, A.S., Richards, P.J., Thomas, E., Carty, S., Nowell, M.A., Goodfellow, R.M., Dent, C.M., Williams, B.D., Jones, S.A., Topley, N., 2007. Interferon-gamma protects against the development of structural damage in experimental arthritis by regulating polymorphonuclear neutrophil influx into diseased joints. *Arthritis Rheum* 56, 2244-2254.

Wipke, B.T., Allen, P.M., 2001. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 167, 1601-1608.

Wolf, G., Ziyadeh, F.N., Thaiss, F., Tomaszewski, J., Caron, R.J., Wenzel, U., Zahner, G., Helmchen, U., Stahl, R.A., 1997. Angiotensin II stimulates expression of

the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest* 100, 1047-1058.

Wolfe, F., 2000. The effect of smoking on clinical, laboratory, and radiographic status in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 27, 630-637.

Wolfe, F., Freundlich, B., Straus, W.L., 2003. Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 30, 36-40.

Wolfe, F., Michaud, K., 2004. Heart failure in rheumatoid arthritis: rates, predictors, and the effect of anti-tumor necrosis factor therapy. *Am J Med* 116, 305-311.

Wong, P.C., Price, W.A., Chiu, A.T., Duncia, J.V., Carini, D.J., Wexler, R.R., Johnson, A.L., Timmermans, P.B., 1990a. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. IX. Antihypertensive activity in rats of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 252, 726-732.

Wong, P.C., Price, W.A., Jr., Chiu, A.T., Duncia, J.V., Carini, D.J., Wexler, R.R., Johnson, A.L., Timmermans, P.B., 1990b. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174: an active metabolite of DuP 753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 255, 211-217.

Yamamoto, K., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B., Ferrario, C.M., 1992. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 19, 692-696.

Zaman, M.A., Oparil, S., Calhoun, D.A., 2002. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov* 1, 621-636.

Zhang, J., Noble, N.A., Border, W.A., Huang, Y., Infusion of angiotensin-(1-7) reduces glomerulosclerosis through counteracting angiotensin II in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 298, F579-588.

Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., McIntyre, T.M., 1992. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today* 13, 93-100.

Ziolkowska, M., Kurowska, M., Radzikowska, A., Luszczkiewicz, G., Wiland, P., Dziewczopolski, W., Filipowicz-Sosnowska, A., Pazdur, J., Szechinski, J., Kowalczewski, J., Rell-Bakalarska, M., Maslinski, W., 2002. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum* 46, 1744-1753.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)