Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Departamento de Farmacologia

Jeimison Duarte Santos

Avaliação da disfunção vascular induzida pela testosterona em modelo experimental de hormonização: participação de células Th17

> Ribeirão Preto 2021

Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Departamento de Farmacologia

Jeimison Duarte Santos

Avaliação da disfunção vascular induzida pela testosterona em modelo

experimental de hormonização: participação de células Th17

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia

Ribeirão Preto

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte Santos, Jeimison

Avaliação da disfunção vascular induzida pela testosterona em modelo experimental de hormonização: participação de células Th17/ Jeimison Duarte Santos; Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia. – Ribeirão Preto, 2021. 133 f.

Tese (Doutorado em Ciências – Área de Concentração: Farmacologia) --Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2021.

1. Transgênero 2. Testosterona 3. Células T 4. Th17 5. Disfunção vascular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jeimison Duarte Santos

Avaliação da disfunção vascular induzida pela testosterona em modelo experimental de hormonização: participação de células Th17

> Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia

Aprovado em: __/ / 2021

Banca Examinadora

Presidente Assinatura: Nome: Instituição:

Examinador(a) Assinatura: Nome: Instituição:

Examinador(a) Assinatura: Nome: Instituição:

Examinador(a) Assinatura: Nome: Instituição:

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos mais pais, Kátia Maria Duarte e Isaias Barros Santos, e ao meu irmão, Ibson Duarte Santos, por todo o amor, cuidado, apoio, educação, ensinamentos e inspirações durante toda a minha vida. A vocês, todo o meu amor.

Aos meus demais familiares por toda torcida, apoio, carinho e amor.

Aos meus queridos amigos Ivaldo Belém, Timna Varela e Gabriel Victor por, além do auxílio na execução dos experimentos, me apoiaram naquela que foi, talvez, a fase mais desafiadora da minha vida, me oportunizando viver momentos leves, divertidos e de muito acolhimento.

Aos meus queridos amigos Bruno Serpellone e Twane Xavier por todo companheirismo, apoio e amor durante essa trajetória.

Aos muitos amigos que tive o prazer de conhecer e conviver nos últimos anos em Ribeirão Preto, tornando esse período mais divertido e prazeroso. Em especial, agradeço a Mouzarllem Barros, Naielly Rodrigues, Melissa Araújo, Franciele Scarante e Nicole Rodrigues.

À Profa. Dra. Rita Tostes por ter aceitado me orientar e confiar a mim esse projeto. Também ao Prof. Dr. Fernando Carneiro pela oportunidade de executar boa parte dos experimentos apresentados nesse trabalho em seu laboratório.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Paula Barros, Dr. Tiago Dias e, em especial, José Teles pelo auxílio na execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Carlos, pela colaboração, sugestões e críticas. Em especial, ao Eduardo Damasceno pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo e transferência de células, e à Dra. Isadora Marques pelo auxílio nos experimentos de análise de expressão gênica.

Ao Carlos Alberto, Vanessa Nakagi e Prof. Dr. Hélio Salgado pela colaboração e auxílio nos execução dos exames de ecocardiograma (não inseridos nesse trabalho) e experimentos de medida direta da pressão arterial nos animais experimentais.

Aos Profs. Dr. Carlos Sorgi e Dra. Lúcia Faccioli pela pareceria e colaboração na dosagem hormonal por cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas. Aos funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP: Gislaine Marques e José Ramon pela amizade e todo auxílio nas atividades burocráticas durante essa trajetória.

Aos demais funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, em especial a Carla Pavan, Eliane Maciel, Giuliana Bertozi, leda Regina, Kátia dos Santos e Marcella Grando, que contribuíram de diferentes formas para que esse trabalho fosse executado.

Aos funcionários dos biotérios: Central, do campus da USP-RP; do Centro de Criação de Camundongos Especiais da FMRP-USP; e setorial do Departamento de farmacologia da FMRP-USP pelo fornecimento e cuidado com os animais experimentais durante a execução desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) que, apesar do grave desmonte pelo qual vêm passando nos últimos anos, têm resistido e financiado a pesquisa no Brasil, inclusive esse trabalho. Também ao auxílio financeiro proveniente do Center for Research in Inflammatory Diseases (CRID). Em especial, ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida durante essa trajetória.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para realização desse trabalho.

Aos animais utilizados na pesquisa científica, meu respeito.

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."

João Guimarães Rosa



SANTOS, J.D. Avaliação da disfunção vascular induzida pela testosterona em modelo experimental de hormonização: participação de células Th17. 2021. 133 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Fatores sexuais masculinos exercem efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular, dentre outros mecanismos, por aumento de células Th17 e seus mecanismos efetores. Como efeito colateral, a hormonização com testosterona aumenta o risco cardiovascular em indivíduos transmasculinos. Neste trabalho, investigamos se a testosterona induz disfunção vascular por aumento de células Th17 circulantes, em modelo experimental de hormonização. Após protocolos preliminares para padronização do tratamento, camundongos fêmeas (C57/BL6) foram tratadas com cipionato de testosterona (48 mg/Kg/semana) por 8 semanas. Um grupo de fêmeas foi ovariectomizado para investigar se a gonadectomia (outro procedimento utilizado na transição de gênero) modifica os efeitos induzidos pela testosterona. Camundongos machos foram utilizados para comparações fenotípicas (CEUA-FMRP: 079/2019). O tratamento com testosterona aumentou os níveis circulantes do hormônio nas fêmeas a níveis observados nos machos. A testosterona aumentou a massa do músculo gastrocnêmico e o índice de massa corpórea dos animais, além de reduzir a gordura perigonadal, mimetizando achados clínicos. Em aortas isoladas, a testosterona reduziu a vasodilatação dependente do endotélio e intensificou o efeito anticontrátil do tecido adiposo perivascular (PVAT), com participação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A longo prazo (24 semanas), o tratamento com testosterona aumentou a pressão arterial nas fêmeas. A ovariectomia não modificou os efeitos fenotípicos ou cardiovasculares induzidos pela testosterona. O tratamento com testosterona nas fêmeas aumentou o percentual de células Th17 circulantes e, no tecido vascular, aumentou a expressão gênica de RORyt e proteica da p-STAT3 (Y⁷⁵⁰), importantes marcadores para perfil Th17. A testosterona não alterou a vasodilatação em animais deficientes em células T e B [Rag1 knockout (-/-)]. Porém, a transferência de células T CD4+ para esses animais restaurou os efeitos vasculares deletérios induzidos pela testosterona. A testosterona também não modificou a função vascular de fêmeas deficientes para o receptor da IL-17 (IL-17Ra^{-/-}), importante citocina liberada por células Th17. Apesar de o tratamento promover o aumento do percentual de células T γδ produtoras de IL-17 circulantes, estas células não contribuem para os efeitos cardiovasculares da testosterona, uma vez que a hormonização alterou a função vascular em fêmeas deficientes para células T v δ (TCR $\delta^{-/-}$). Não houve diferença na vasoconstrição entre os grupos experimentais. Em conjunto, nossos resultados sugerem que a disfunção vascular induzida pela testosterona é mediada por células Th17 em modelo experimental de hormonização. Esperamos, com esse enfoque, fornecer dados importantes para otimização do processo de hormonização em indivíduos transmasculinos.

Palavras-chave: transgênero, testosterona, células T, Th17, disfunção vascular



SANTOS, J.D. Vascular dysfunction induced by testosterone in a hormonization mice model: role of Th7 cells. 2021. 133 p. Thesis (Doctorate). Ribeirão Preto Medical School. University of São Paulo

Male-related sexual factors have harmful effects on the cardiovascular system, partially by increasing Th17 cells and Th17-related effector mechanisms. Testosterone-induced hormonization increases cardiovascular risk in transmasculine people. In the present study, we investigated whether testosterone induces vascular dysfunction by increasing circulating Th17 levels in a hormonization mouse model. After preliminary studies, female mice (C57/BL6) were treated with testosterone (48 mg/Kg/week) for 8 weeks. A group of mice was ovariectomized to evaluate whether gonadectomy (another approach in the gender transition process) influences the hormonal treatment. Male mice were used for phenotypical comparisons (CEUA FMRP-USP 079/2019). Testosterone treatment increased the circulating levels of the hormone in females to concentrations similar to those in male mice. Testosterone also increased the gastrocnemius muscle mass and body mass index, and decreased perigonadal fat mass, mimicking clinical findings. In aortic rings, testosterone increased the anticontractile effect of perivascular adipose tissue (PVAT) via nitric oxide synthase inducible (iNOS)-dependent mechanisms and decreased endothelium-dependent vasodilation. After a long-term treatment (24 weeks) testosterone increased blood pressure in female mice. Ovariectomy did not affect phenotypical or cardiovascular effects elicited by testosterone. Testosterone increased Th17 (%) circulating cells, RORyt gene expression and p-STAT3 (Y⁷⁵⁰) protein expression in the vasculature. Testosterone did not promote vascular dysfunction in females lacking T and B cells [Rag1 knockout (-/-)]. However, adoptive transfer of T CD4+ cells restored the vascular deleterious effects induced by testosterone. Furthermore, testosterone did not affect vascular function in females lacking IL-17 receptor (IL-17Ra^{-/-}). Although testosterone increased circulating IL-17+ $v\delta$ T cells (%), these cells do not contribute to testosterone effects since the hormonization altered vascular function in female mice lacking $v\delta$ T cells (TCR $\delta^{-/-}$). There was no difference in vasoconstriction responses between the groups. In summary, our results suggest that Th17 mediates vascular dysfunction induced by testosterone in a hormonization mouse model. These new findings may contribute to the optimization of hormonization process in transmasculine people.

Keywords: transgender, testosterone, T cells, Th17, vascular dysfunction

- -/- camundongo knockout
- 1400W inibidor seletivo para iNOS
- ACh acetilcolina
- Ang II angiotensina II
- ANOVA análise de variância
- APC células apresentadoras de antígenos
- AR receptor para andrógenos
- AUC área sob a curva
- CCL2 quimiocina (C-C motif) ligand-2
- CD cluster de diferenciação
- COX-2 cicloxigenase-2
- DHT dihidrotestosterona
- EPM erro padrão da média
- ER receptor para estrógenos
- ERO espécies reativas de oxigênio
- F fêmeas
- FoxP3 fator de transcrição foxP3 (forkhead box P3)
- FSH hormônio folículo estimulante
- GnHR hormônio liberador de gonadotrofinas
- GPER receptor para estrógenos acoplado à proteína G

IFN-γ – interferon gama

- IL interleucina
- IL-17R receptor para IL-17
- im intramuscular
- IMC índice de massa corporal
- iNOS óxido nítrico sintase induzível
- KCI cloreto de potássio

LC-MS/MS – cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas *tandem*

- LH hormônio luteinizante
- M machos
- MHC complexo de histocompatibilidade
- NF-KB fator de transcrição nuclear de células B ativadas (nuclear factor kappa-light-chain-

enhancer)

- NLRP3 complexo inflamassoma (NLR family pyrin domain containing-3)
- NO óxido nítrico
- OVX ovariectomia
- P--anéis de aorta sem PVAT
- P+ anéis de aorta com PVAT
- PBS tampão salina fosfato
- PE fenilefrina

PVAT - tecido adiposo perivascular

Rag – enzima codificada pelo gene de ativação de recombinação (*recombination-activation* gene enzyme)

RORyT - fator de transcrição RAR (related orphan receptor) gamma-T

sem – semanas

- Sham animais submetidos à cirurgia fictícia (controle)
- subc subcutâneo
- T ou testo testosterona
- TCR receptor de célula T
- TGF-β fator de transformação de crescimento beta
- Th célula T helper (auxiliadora)
- Treg célula T reguladora
- V ou vei veículo
- VCAM-1 molécula de adesão de células vasculares-1
- Y tirosina
- WT camundongos wild type (selvagens)

₋ Lista de figuras e tabelas

Figura 1. Massa corporal e IMC de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas antes e após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 2. Massa da gordura perigonadal e do músculo gastrocnêmico de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas, ao final do tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 3. Massa corporal, IMC, massa da gordura perigonadal e do músculo gastrocnêmico de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas, antes e após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 ou 24 semanas.

Figura 4. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 ou 24 semanas.

Figura 5. Resposta contrátil de anéis de aorta, sem e com PVAT, de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 ou 24 semanas.

Figura 6. Pressão arterial média de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 ou 24 semanas.

Figura 7. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J fêmeas e machos tratados com veículo por 8 ou 24 semanas.

Figura 8. Resposta contrátil de anéis de aorta, sem e com PVAT, de camundongos C57BL/6J fêmeas ou machos tratados com veículo por 8 ou 24 semanas.

Figura 9. Pressão arterial média de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas tratadas com veículo por 8 ou 24 semanas.

Figura 10. Massa do útero de camundongos C57BL/6J fêmeas intactas ou ovariectomizadas e tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 11. Massa corporal e IMC, respectivos valores finais, e massa da gordura perigonadal e do músculo gastrocnêmico de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas intactas ou ovariectomizadas, antes e após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 12. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J fêmeas intactas ou ovariectomizadas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 13. Resposta contrátil de anéis de aorta, sem e com PVAT, de camundongos C57BL/6J fêmeas intactas e ovariectomizadas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 14. Pressão arterial média de camundongos C57BL/6J fêmeas intactas ou ovariectomizadas, tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 15. Perfil de células T CD4+ de linfonodos e baço de camundongos C57BL/6J fêmeas, tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 16. Expressão gênica do fator de transcrição RORγt na aorta e PVAT de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 17. Expressão proteica da forma fosforilada (Y⁷⁰⁵) e total do fator de transcrição STAT3 na aorta de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 18. Massa corporal e IMC, respectivos valores finais, e massa da gordura perigonadal e do músculo gastrocnêmico em camundongos fêmeas W*ild Type* ou Rag1^{-/-} antes e após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 19. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos fêmeas W*ild Type* ou Rag1^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 20. Resposta contrátil de anéis de aorta, sem e com PVAT, de camundongos fêmeas W*ild Type* ou Rag1^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 21. Frequência de células T CD4+ de esplenócitos de camundongos fêmeas Rag1⁻, após a transferência adotiva de células CD4+, tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 22. Massa corporal e IMC, respectivos valores finais, e massa da gordura perigonadal e do músculo gastrocnêmico de camundongos fêmeas W*ild Type* ou Rag1^{-/-}, após a transferência de células T CD4+, antes e após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 23. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos fêmeas W*ild Type* ou Rag1^{-/-} após a transferência de células CD4+ e tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 24. Resposta contrátil de anéis de aorta sem e com PVAT de camundongos fêmeas W*ild Type* ou Rag1^{-/-} após a transferência de células CD4+ e tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 25. Massa corporal e IMC, os respectivos valores finais, e massa da gordura perigonadal ou do músculo gastrocnêmico de camundongos fêmeas W*ild Type* ou IL-17Ra⁻ ^{/-} antes e após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 26. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos fêmeas W*ild Type* ou IL-17Ra^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 27. Resposta contrátil de anéis de aorta, sem e com PVAT, de camundongos fêmeas W*ild Type* ou IL-17Ra^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 28. Concentrações séricas de IL-17 em camundongos fêmeas W*ild Type* após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 29. Perfil de células T γδ produtoras de IL-17A ou IFN-γ de linfonodos ou baço de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 30. Massa corporal e IMC, respectivos valores finais, e massa da gordura perigonadal e do músculo gastrocnêmico de camundongos fêmeas W*ild Type* ou TCR $\delta^{-/-}$ antes e após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 31. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos fêmeas W*ild Type* ou TCRδ^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 32. Resposta contrátil de anéis de aorta, sem e com PVAT de camundongos fêmeas W*ild Type* ou TCR $\delta^{-/-}$ durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Figura 33. Resposta contrátil de anéis de aorta, sem e com PVAT, de camundongos fêmeas C57BL/6J na presença de veículo ou do inibidor seletivo para óxido nítrico sintase induzível, após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Tabela 1. Níveis séricos de testosterona de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.

Tabela 2. Níveis séricos de testosterona ou estradiol de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas intactas ou ovariectomizadas, tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas.



SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	27
Hormônios e as diferenças sexuais sobre o sistema cardiovascular	27
Testosterona e a disfunção vascular	29
Células T e o sistema cardiovascular	32
Eixo Th17-IL-17-IL-17R e as diferenças sexuais sobre o sistema cardiovascular	34
Indivíduos transgênero, pessoas transmasculinas e uso da testosterona	36
JUSTIFICATIVA	41
OBJETIVOS	44
Objetivo geral	44
Objetivos específicos	44
MATERIAL E MÉTODOS	47
Animais	47
Padronização do modelo experimental	47
Design experimental de protocolos específicos de tratamento	48
Parâmetros de crescimento corporal e avaliação do fenótipo induzido pela testoste	erona
	50
Procedimento cirúrgico da ovariectomia	50
Isolamento e Purificação de células CD4+	51
Transferência de células CD4+	52
Dosagens hormonais	52
Dosagem da IL-17	54
Estudos de reatividade vascular	55
Pressão arterial	56
Citometria de Fluxo	56
Análise da expressão gênica por RT-qPCR	57
Análise da expressão proteica por Western Blot	59
Análise estatística	60

RESULTADOS
Padronização do modelo experimental de hormonização induzida por testosterona62
Efeitos fenotípicos e cardiovasculares após tratamento com testosterona a curto ou
longo prazo65
Diferenças sexuais sobre o sistema cardiovascular69
Influência da ovariectomia sobre os efeitos induzidos pelo tratamento com testosterona
Perfil de células T CD4+ circulantes e no tecido vascular após o tratamento com
testosterona
Participação de linfócitos na disfunção vascular induzida pela testosterona
Participação de células T CD4+ na disfunção vascular induzida pela testosterona86
Participação do receptor para IL-17 na disfunção vascular induzida pela testosterona .91
Avaliação do papel de células T $\gamma\delta$ na disfunção vascular induzida pela testosterona95
Participação da iNOS no aumento do efeito anticontrátil do PVAT induzido pela
testosterona101
DISCUSSÃO104
CONCLUSÃO118
REFERÊNCIAS120
ANEXO

____ Introdução

INTRODUÇÃO

Hormônios e as diferenças sexuais sobre o sistema cardiovascular

Os hormônios sexuais exercem um papel fundamental no desenvolvimento do sistema reprodutivo e das características sexuais primárias e secundárias. Nos indivíduos do sexo feminino, os hormônios mais abundantes e ativos são o estrógeno e a progesterona, ao passo que nos indivíduos do sexo masculino destacam-se os hormônios androgênicos, dentre eles a testosterona e seu metabólito ativo, a dihidrotestosterona (DHT). A biossíntese desses compostos ocorre através de uma série de reações enzimáticas a partir da molécula do colesterol, o que lhes confere natureza lipofílica.

A regulação da secreção endógena dos hormônios sexuais ocorre por ação do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnHR) que, por sua vez, estimula a liberação dos hormônios hipofisários folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Sobre o sistema reprodutivo feminino, o FSH estimula a maturação dos folículos ovarianos, que produzem e secretam o estrógeno. No sistema reprodutivo masculino, o LH estimula a produção e liberação dos hormônios androgênicos, em particular a testosterona, pelas células de Leydig testiculares (BURGER, 2002). Embora a maior parte dos hormônios sexuais seja produzida nas gônadas, outros tecidos também são capazes de sintetizar e liberar esses compostos como o córtex da adrenal, tecido adiposo e pele (BASSIL; ALKAADE; MORLEY E, 2009).

Os hormônios sexuais exercem suas funções biológicas através da interação com seus respectivos receptores. Os principais receptores descritos para o estrógeno são o ERα, ERβ e GPER; enquanto o AR é o principal receptor para os hormônios androgênicos. A nível celular, esses receptores estão localizados no citosol e na membrana plasmática, onde desencadeiam efeitos genômicos e não-genômicos, respectivamente. Os receptores para os hormônios sexuais são encontrados em ambos os sexos e estão presentes em diversos tipos celulares e tecidos, incluindo células do sistema cardiovascular e imunológico (NEGRO-VILAR, 1999; NILSSON et al., 2001).

Além do seu papel fundamental sobre o sistema reprodutivo/sexual, os hormônios sexuais também estão envolvidos na homeostase de diversos outros sistemas, incluindo o cardiovascular. Boyton e Tood observaram pela primeira vez (1947) que a pressão arterial é maior em homens que em mulheres cisgênero, demonstrando a influência de fatores relacionados ao sexo na manutenção da homeostase hemodinâmica. Porém, as diferenças sexuais observadas a nível cardiovascular são melhor compreendidas sob o ponto de vista fisiopatológico, uma vez que a incidência de doenças cardiovasculares é maior em homens do que em mulheres cisgênero em idade reprodutiva (BENJAMIN et al., 2018).

Dentre os principais fatores de risco associados às doenças cardiovasculares destaca-se a hipertensão arterial, caracterizada pelo aumento crônico e sustentado da pressão arterial e que tem como principal consequência a lesão e falência de órgãos-alvo como coração, vasos sanguíneos e rins (RAMIREZ; SULLIVAN, 2018). Estudos sugerem que os hormônios sexuais femininos oferecem cardioproteção no que diz respeito aos níveis pressóricos. A pressão arterial é menor em mulheres cisgênero (BURT et al., 1995; KAPIL et al., 2010) e o estrógeno é um dos principais responsáveis por essa modulação (ASHRAF; VONGPATANASIN, 2006), uma vez que, os níveis de pressão arterial se assemelham ou superam os níveis observados em homens cisgênero após a menopausa (BENJAMIN et al., 2018). Já em modelos experimentais de hipertensão, a pressão arterial é menor em fêmeas do que em machos (DUBEY et al., 2002). Além disso, a ovariectomia aumenta os valores de pressão arterial em fêmeas hipertensas e o tratamento com estrógeno reduz os níveis pressóricos nesses animais (CROFTON; SHARE, 1997; HARRISON-BERNARD; SCHULMAN; RAIJ, 2003).

Em contraponto aos hormônios sexuais femininos, diversos estudos demonstram um efeito pró-hipertensivo dos hormônios androgênicos. O tratamento de ratos com DHT aumenta a pressão arterial e aumenta a atividade inflamatória vascular, o que acarreta disfunção endotelial nesses animais (WU et al., 2011). Em diferentes modelos experimentais de hipertensão, como já mencionado, machos possuem níveis maiores de pressão arterial comparados a fêmeas (DUBEY et al., 2002). Além disso, a castração de machos hipertensos reduz a pressão arterial e o tratamento com testosterona nesses animais volta a elevar esses valores (BUBB; KHAMBATA; AHLUWALIA, 2012). O aumento da pressão arterial induzido por andrógenos também é observado em fêmeas. O tratamento de ratas uninefrectomizadas ou intactas com testosterona ou DHT eleva a pressão arterial (COLBY; SKELTON; BROWNIE, 1970; SINGH; SCHWARTZMAN, 2008) e, em ratas hipertensas ovariectomizadas, a testosterona eleva a pressão arterial a níveis semelhantes aos observados em machos (CHEN; MENG, 1991; RECKELHOFF; ZHANG; GRANGER, 1998).

Testosterona e a disfunção vascular

A disfunção vascular é das principais características associadas às doenças cardiovasculares, atuando como causa e/ou consequência dessas comorbidades. A disfunção endotelial e o aumento de mediadores inflamatórios são importantes fatores que contribuem para esse processo (CAMERON; LANG; TOUYZ, 2016). *Ex vivo,* a testosterona possui um efeito vasodilatador direto por mecanismos que incluem a liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais, aumento da atividade de canais para potássio e redução da atividade de canais para cálcio nas células do músculo liso vascular (DOS SANTOS et al., 2014). Entretanto, *in vivo,* a testosterona contribui para aumento no tônus

vascular contrátil e prejuízo na vasodilatação. Para o mesmo nível de pressão arterial, a resistência vascular periférica é maior em homens que em mulheres cisgênero (MESSERLI et al., 1987). Em modelos experimentais, o tratamento com testosterona aumenta a resposta vasoconstritora induzida por diferentes agentes (ALVES et al., 2020; MATSUDA et al., 1994) e diminui a vasodilatação dependente do endotélio em machos e fêmeas por promover o aumento do estresse oxidativo vascular, importante mecanismo associado à disfunção endotelial (ALVES et al., 2020; CEBALLOS et al., 1999; COSTA et al., 2015).

Além da influência sobre o tônus vascular, a testosterona também possui papel importante na indução de mecanismos inflamatórios na vasculatura. O tratamento com testosterona em ratos aumenta a expressão proteica da cicloxigenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a produção da prostaglandina E₂ em vasos cerebrais, contribuindo para a inflamação cerebrovascular em modelo de endotoxemia (RAZMARA; KRAUSE; DUCKLES, 2005). Em células endoteliais humanas, a DHT aumenta a expressão da molécula de adesão celular vascular (VCAM)-1 por ativação indireta do fator de transcrição NF-κB, importante indutor do processo inflamatório (DEATH et al., 2004) e, *in vivo*, promove disfunção endotelial por aumento da atividade desse fator de transcrição (WU et al., 2011). Além disso, o tratamento agudo com testosterona aumenta a migração leucocitária vascular de forma dependente da COX-2 (CHIGNALIA et al., 2015) e, sob tratamento crônico, promove disfunção vascular por ativação do inflamassoma NLRP3 (ALVES et al., 2020).

A influência dos hormônios sexuais sobre a função vascular também é mediada pela função do tecido adiposo perivascular (PVAT), tecido que circunda a maioria dos vasos sanguíneos, localizado imediatamente adjacente à túnica adventícia. Soltis e Cassis (1991) verificaram que a presença do PVAT reduz a vasoconstrição induzida por diferentes agentes, demonstrando pela primeira vez a influência desse tecido sobre a função vascular. Devido à predominância de células adiposas, por muito tempo as principais funções atribuídas ao PVAT eram relacionadas ao metabolismo energético da região perivascular. Hoje, sabe-se que o PVAT possui diversos componentes para síntese e liberação de agentes vasodilatadores, dentre as quais destacam-se o NO, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e angiotensina 1-7, e vasoconstritores. Além disso, o PVAT produz e libera diversas adipocinas e lipocinas, o que lhe confere uma importante função endócrina (SCHEJA; HEEREN, 2019).

No contexto de doenças cardiovasculares, o desbalanço na liberação de agentes vasoativos e alterações na função endócrina do PVAT contribuem de forma crucial para fisiopatologia vascular. Porém, nessas condições o PVAT também assume um importante papel pró-inflamatório, atuando como um depósito para células do sistema imunológico, que liberam citocinas e outras substâncias, dentre elas as espécies reativas de oxigênio (ERO), com ações deletérias sobre a vasculatura (NOSALSKI; GUZIK, 2017).

Os hormônios sexuais femininos estão associados à manutenção da função do PVAT. Em mulheres cisgênero, a redução dos níveis de estrógeno após a menopausa está relacionada ao aumento do recrutamento de células pró-inflamatórias no PVAT (KRALOVA LESNA et al., 2016). Em modelos experimentais, o tratamento de ratas com estradiol preserva a morfologia funcional de adipócitos no PVAT, prejudicada pela ovariectomia (XU et al., 2012). No que diz respeito aos hormônios androgênicos, a resposta vasoconstritora na presença do PVAT é semelhante em vasos provenientes de machos castrados e intactos, indicando que níveis fisiológicos desses hormônios parecem não ter influência sobre a o papel do PVAT sobre a função vascular (BOYDENS; PAUWELS; VAN DE VOORDE, 2016). Entretanto, poucos trabalhos investigam o papel da testosterona ou seus receptores sobre a função do PVAT, principalmente comparando simultaneamente as diferenças sexuais observadas no contexto fisiopatológico (VICTORIO et al., 2020).

Células T e o sistema cardiovascular

Diversos estudos têm demonstrado a influência do sistema imunológico sobre fatores de homeostase do sistema cardiovascular. Um dos primeiros trabalhos a relatar tal interação demonstrou que o tratamento de ratos com drogas imunossupressoras reduziu a pressão arterial nesses animais após a indução de infarto renal (WHITE; GROLLMAN, 1964). Hoje, a relação entre o sistema imunológico e cardiovascular destaca-se como um importante alvo em potencial de medidas preventivas ou de tratamento no controle das doenças cardiovasculares (BOMFIM et al., 2018; RODRIGUEZ-ITURBE; PONS; JOHNSON, 2017).

As células (ou linfócitos) T são componentes da resposta imunológica celular, atuando de maneira fundamental nos processos de reconhecimento de antígenos, eliminação de patógenos, formação de memória imunológica e desenvolvimento de autotolerância. Essas células são originárias de precursores hematopoiéticos na medula óssea e migram para o timo, onde ocorre seu refinado processo de maturação. Durante esse processo, a enzima *Recombination Activation Gene* (Rag) exerce um papel crucial na recombinação gênica para expressão do receptor da célula T (TCR). Esse rearranjo, denominado recombinação V(D)J, garante a funcionalidade do TCR e a ampla diversidade ao reconhecimento de antígenos das células T. Apenas células com TCRs funcionais progridem no processo de maturação, passando a expressar o TCR maduro e são comprometidas para as linhagens CD4+ ou CD8+, a depender da interação com diferentes complexos de histocompatibilidade (MHC).

Nos órgãos linfoides secundários como baço e linfonodos, células T CD4+ [também conhecidas como células T *helper* (Th)] maduras *naïve* recebem continuamente sinais de sobrevivência e são apresentadas a antígenos. Essas células medeiam respostas

imunológicas específicas através de um refinado sistema de regulação e diferenciação, onde cada perfil celular adquirido é responsável por desencadear mecanismos efetores específicos, envolvidos principalmente na eliminação de patógenos extracelulares. Dentre os principais perfis efetores destacam-se o Th1, Th2 e Th17; enquanto células T reguladoras (Treg) possuem papel crucial no controle da resposta imunológica, através da liberação de fatores inibitórios (LUCKHEERAM et al., 2012).

Os diferentes perfis de células T CD4+ possuem o TCR heterodimérico formado pelas cadeias $\alpha \in \beta$. Entretanto, uma subpopulação de células T apresenta o TCR composto por cadeias $\gamma \in \delta$, com desenvolvimento tímico independente da interação com complexos MHC. Diferentemente das células T $\alpha\beta$, O TCR de células $\gamma\delta$ apresenta uma diversidade limitada ao reconhecimento de antígenos. Porém, nos tecidos periféricos essas células são capazes de ser ativadas através do reconhecimento de moléculas não peptídicas, moléculas atípicas apresentadas pelo complexo de MHC-I não clássico ou antígenos não processados por células apresentadoras de antígenos (*Antigen-Presenting Cells*, APC), ao contrário das células T $\alpha\beta$ (PAUL; SHILPI; LAL, 2015). Apesar de corresponderem a menos de 5% da população total de linfócitos periféricos, a liberação de citocinas pelas células T $\gamma\delta$ desencadeia um importante papel na resposta imunológica principalmente em seus estágios iniciais através do recrutamento de outras células imunológicas (CHIEN; MEYER; BONNEVILLE, 2014).

Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento das células T no processo fisiopatológico das doenças cardiovasculares. Guzik e colaboradores (2007) demonstraram pela primeira vez que as células T são fundamentais para o desenvolvimento da disfunção endotelial associada à hipertensão arterial induzida por angiotensina II (Ang II). Essas células também são cruciais para o aumento da pressão arterial induzida pela administração de desoxicorticosterona (DOCA)-Sal (GUZIK et al., 2007) e pelo estresse crônico (MARVAR et al., 2012). De forma mais refinada, Sandberg e colaboradores (2015)

demonstraram que as células CD4+ são cruciais para o aumento dos níveis pressóricos. Além disso, pacientes hipertensos apresentam maior quantidade de células T CD4+ circulantes em relação a indivíduos normotensos (ITANI et al., 2016).

Estudos também demonstram a participação de células T γδ no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, principalmente na hipertensão arterial. Existe correlação positiva entre o número de células T γδ circulantes e os níveis de pressão arterial e em pacientes hipertensos (DELANEY et al., 2021) e, em modelos experimentais, células T γδ são cruciais para o desenvolvimento da hipertensão e disfunção endotelial induzidas pela Ang II (CAILLON et al., 2017).

Eixo Th17-IL-17-IL-17R e as diferenças sexuais sobre o sistema cardiovascular

Após o reconhecimento de antígenos via interação com o MHC, células T CD4+ *naïve* tornam-se ativas (CD4+CD25+) e, sob o estímulo de citocinas como a interleucina-6 (IL-6), a IL-21 e o fator de transformação do crescimento beta [*Transforming Growth Factor beta* (TGF-β)] diferenciam-se em células Th17, que possuem os fatores de transcrição RORγt e STAT3 como principais reguladores de sua atividade (IVANOV et al., 2006). A atividade desses fatores é fundamental para manutenção da estabilidade das células Th17 e também para produção de seus mecanismos efetores (KORN et al., 2009). O perfil Th17 desencadeia resposta imunológica especializada na neutralização de bactérias patogênicas extracelulares e fungos, e também está intimamente relacionado com a fisiopatologia de diversas doenças autoimunes. A IL-17 é a principal citocina liberada por células Th17 e interage com o seu receptor (IL-17R), presente em diversos tipos celulares como células do sistema imunológico, endoteliais e do músculo liso vascular. Um dos principais efeitos da IL-17 é o aumento da expressão de genes quimiotáticos, o que acarreta no recrutamento de outras células imunológicas, contribuindo com o processo inflamatório local (GAFFEN, 2009). Além das células Th17, células T γδ também liberam a IL-17, exercendo um importante papel, principalmente nos estágios iniciais da resposta imunológica (CHIEN; MEYER; BONNEVILLE, 2014).

Estudos sugerem que o perfil Th17 e os componentes da sua resposta efetora estão relacionados aos danos ocasionados pela hipertensão arterial em diferentes órgãos-alvo. Pacientes hipertensos possuem mais células Th17 circulantes em relação a indivíduos saudáveis (ITANI et al., 2016). Em modelos experimentais, animais hipertensos também possuem mais células Th17 e IL-17 nos tecidos cardíaco e renal (AMADOR et al., 2014). Além disso, a disfunção endotelial e a hipertensão arterial induzidas pela Ang II são atenuadas em animais deficientes para produção de IL-17 (MADHUR et al., 2010).

Existe clara influência de fatores sexuais sobre as células T CD4+ e seus diferentes perfis de diferenciação, no que diz respeito à fisiopatologia de doenças cardiovasculares. Em modelos de hipertensão, o tecido renal de machos apresenta maior quantidade de marcadores para o perfil Th17 em relação a fêmeas (TIPTON; BABAN; SULLIVAN, 2012). Em camundongos machos deficientes em linfócitos T e B, a transferência de células T provenientes de machos selvagens (*Wild Type*, WT) restaura a resposta hipertensora induzida pela Ang II e induz o recrutamento de células e citocinas pró-inflamatórias no tecido renal. Quando a transferência de células T ocorre para camundongos fêmeas, elas continuam resistentes ao estímulo hipertensivo e apresentam menos marcadores inflamatórios após infusão de Ang II. Por outro lado, quando as células T são provenientes de fêmeas WT, tanto machos quanto fêmeas não apresentam aumento dos níveis pressóricos em resposta à Ang II (JI et al., 2014; POLLOW et al., 2014). Assim, fatores relacionados ao sexo, que atuam tanto de forma sistêmica quanto diretamente nas células T, exercem importante influência sobre a ativação e mecanismos efetores dessas células no processo fisiopatológico da hipertensão arterial.
Indivíduos transgênero, pessoas transmasculinas e uso da testosterona

A terapia hormonal com testosterona é utilizada em diferentes condições clínicas como no hipogonadismo em homens cisgênero ou reposição hormonal na pós-menopausa em mulheres cisgênero (PETERING; BROOKS, 2017). Entretanto, o uso desse hormônio também é adotado em outros contextos não patológicos, como na hormonização de indivíduos transgênero transmasculinos. O termo "transgênero" é utilizado por diversos indivíduos como autoafirmação de parte de suas identidades e sua definição abrange aspectos subjetivos de âmbito psicológico, social, político e cultural. Porém, segundo a Associação de Psicologia Americana ("Guidelines for psychological practice with transgender and gender nonconforming people.", 2015), indivíduos transgênero são aqueles que possuem uma identidade de gênero diferente daquela que lhes foi atribuída ao nascimento, geralmente designada de acordo com as características sexuais. Diversas razões como a subjetividade de autoidentificação, discriminação, marginalização e carência na oferta de serviços primários de saúde, dificultam a exata quantificação da população transgênero. Contudo, estimativas apontam que de 0,1 a 1,1% dos adultos em idade reprodutiva se identificam como transgênero em todo o mundo (UNAIDS, 2016). No Brasil, aproximadamente 3 milhões de pessoas (2% da população adulta) se declara como transgênero (SPIZZIRRI et al., 2021).

Muitos indivíduos transgênero vivenciam a incongruência de gênero, que está relacionada principalmente a dois aspectos: 1) sociais, quando as outras pessoas reconhecem o indivíduo transgênero com a identidade de gênero previamente atribuída e não alinhada a sua identidade atual; e 2) físicos, que ocorre entre os indivíduos transgêneros e suas características sexuais primárias e/ou secundárias (WINTER et al.,

2016). Infelizmente, uma parte desses indivíduos experimenta a disforia de gênero, condição clínica caracterizada pelo profundo desconforto e estresse associados à incongruência de gênero. Na busca pela melhora da qualidade de vida, algumas dessas pessoas procuram, quando disponíveis, serviços de saúde para realização do processo de transição de gênero. Entretanto, é importante ressaltar que nem todos os indivíduos transgênero passam pelo processo de transição de gênero e que a disforia de gênero não é uma condição indispensável para realização desse processo oferecido pelos serviços de saúde.

O processo de transição de gênero é multidisciplinar e inclui, dentre outros, aspectos físicos e sociais. Do ponto de vista clínico, diferentes abordagens são utilizadas em adultos ou durante a fase final da adolescência como o acompanhamento psicológico, procedimentos cirúrgicos e o uso de hormônios sexuais para obtenção de características sexuais secundárias. Este último procedimento é denominado como hormonização e, de acordo com os anseios e condições clínicas de cada indivíduo, seu principal objetivo farmacológico é o alcance e manutenção das concentrações séricas do hormônio sexual associado ao gênero de identificação dentro da faixa fisiológica observada em indivíduos cisgênero, além de suprimir a secreção do hormônio sexual endógeno (HEMBREE et al., 2017).

Para além do espectro de gênero binário, indivíduos transmasculinos, que incluem homens transgênero, refere-se a um vasto grupo de pessoas que foram designadas com uma identidade de gênero feminina ao nascimento, mas que se identificam com uma identidade de gênero masculina. A testosterona é o principal composto utilizado para hormonização durante a transição de gênero por esses indivíduos. Geralmente esse procedimento é iniciado com a administração de doses crescentes de testosterona até que seja obtida uma dose de manutenção, quando observado que os níveis circulantes do hormônio estão semelhantes aos observados em homens cisgênero saudáveis e/ou

quando os efeitos de características sexuais secundárias desejadas são alcançados pelo indivíduo transmasculino (HEMBREE et al., 2017; IRWIG, 2017). A testosterona promove diversas mudanças comportamentais, porém um dos principais objetivos da hormonização em pessoas transmasculinas é a obtenção de características sexuais secundárias masculinas que incluem o aumento do volume de pelos no corpo e face, tom de voz mais grave e o aumento da massa corporal pelo aumento da massa muscular e redistribuição e/ou redução da gordura corporal. O desenvolvimento dessas características é variável entre os indivíduos e ocorre de meses a anos após o início da hormonização (IRWIG, 2017).

Ainda que segura, a hormonização em pessoas transmasculinas acarreta efeitos colaterais indesejados no que diz respeito às funções do sistema cardiovascular. A administração de testosterona em homens transexuais eleva a pressão arterial, os níveis séricos de triglicerídeos e de marcadores inflamatórios, além de reduzir os níveis plasmáticos do colesterol HDL, aumentando o risco cardiovascular nesses indivíduos (GILTAY et al., 2000; GOOREN; GILTAY, 2014; IRWIG, 2017; PELUSI et al., 2014). Além disso, a função endotelial em homens transgênero sob hormonização com testosterona é prejudicada em relação a mulheres cisgênero (GULANSKI et al., 2020).

Com base nas seguintes informações:

- Os hormônios androgênicos possuem efeito pró-hipertensivo e ações deletérias sobre a vasculatura;
- Células T CD4+ participam do processo de disfunção vascular;
- Fatores sexuais masculinos contribuem para o dano cardiovascular mediado pelo perfil Th17 e seus mecanismos efetores;

 Como efeitos indesejados, a hormonização em indivíduos transmasculinos aumenta a pressão arterial e acarreta prejuízo vascular;

A hipótese do nosso trabalho é que o tratamento com testosterona promove disfunção vascular em modelo experimental de hormonização, por aumento dos níveis circulantes e vasculares de células Th17.

Justificativa

JUSTIFICATIVA

Pessoas transgênero encontram-se em uma condição de vulnerabilidade social uma vez que são expostas à violência, discriminação e marginalização (WINTER et al., 2016). Existe pouco avanço no que diz respeito à atenção medicinal voltada especificamente para indivíduos transgênero, o que acarreta, em última instância, na escassez dos serviços de saúde ofertados para essa população (REISNER et al., 2016). Diversos fatores estão associados a esse contexto, dentre eles a falta de estudos que objetivam compreender melhor o processo de transição de gênero, incluindo os efeitos biológicos desencadeados pela hormonização (SWEILEH, 2018).

A literatura ainda é controversa no que diz respeito aos efeitos cardiovasculares induzidos pela testosterona na população transmasculina. A maior parte dos estudos realizam inferências acerca dos efeitos da hormonização a partir da observação de outros contextos onde ocorre aumento dos níveis circulantes da testosterona em mulheres cisgênero, como na terapia com testosterona na pós-menopausa. Porém, tais inferências não são adequadas uma vez que, para esse propósito, as doses utilizadas de testosterona são menores em relação àquelas preconizadas para a maioria dos protocolos de hormonização (IRWIG, 2017). Mesmo em doenças onde ocorre aumento dos níveis séricos da testosterona em mulheres cisgênero, os efeitos associados a ação desse hormônio sobre essas populações são distintos. Por exemplo, homens transexuais sob hormonização possuem menores níveis séricos de colesterol HDL e maiores de triglicerídeos comparados a mulheres cisgênero com síndrome do ovário policístico (CUPISTI et al., 2010).

Estudos na literatura demonstram que a testosterona exerce efeitos deletérios sobre a vasculatura através de mecanismos relacionados ao sistema imunológico inato (ALVES et al., 2020; CHIGNALIA et al., 2015). Porém, pouco se sabe a respeito de como componentes do sistema imunológico adaptativo participam desse processo. Diversos estudos demonstram o envolvimento de células T, em especial das células CD4+, no processo fisiopatológico de doenças cardiovasculares e que fatores sexuais estão relacionados ao perfil adquirido por essas células. Nesse sentido, o processo de diferenciação de células CD4+ é fundamentalmente regulado por citocinas, porém outras substâncias participam desse processo, como a Ang II (PLATTEN et al., 2009).

Apesar de as células T possuírem receptores funcionais para testosterona (WUNDERLICH et al., 2002), pouco se sabe acerca do papel desse hormônio no seu processo de diferenciação, principalmente no contexto de processos fisiopatológicos do sistema cardiovascular. Uma vez que a testosterona é amplamente utilizada em diversas abordagens clínicas, é fundamental a investigação de como esse hormônio pode causar efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular mediado por mecanismos dependentes do sistema imunológico adaptativo, em especial pelas células T.



Objetivo geral

Avaliar se o tratamento com testosterona induz disfunção vascular por aumento de células Th17 circulantes em modelo experimental de hormonização.

Objetivos específicos

- Como caracterização do modelo experimental proposto, avaliar se o tratamento com testosterona em camundongos fêmeas WT é capaz de:
- Aumentar os níveis de testosterona circulantes a níveis observados em machos;
- Alterar a composição corporal pelo aumento da massa muscular e redução da massa adiposa, com consequente aumento do índice de massa corporal (IMC).
- Avaliar possíveis diferenças sexuais sobre a função vascular e pressão arterial entre fêmeas e machos.
- 3. Em camundongos fêmeas WT, avaliar:
- Se o tratamento com testosterona aumenta a pressão arterial e induz disfunção vascular com participação do PVAT;
- Se diferentes tempos de tratamento (agudo ou crônico) promovem efeitos distintos sobre o fenótipo "masculino" ou efeitos cardiovasculares induzidos pela testosterona;

- Se a ovariectomia exerce influência sobre o fenótipo "masculino" ou efeitos cardiovasculares induzidos pela testosterona;
- O perfil de células T CD4+ e γδ circulantes após o tratamento com a testosterona;
- Se o tratamento com testosterona aumenta os níveis séricos de IL-17 e de marcadores para o perfil Th17 no tecido vascular.
- 4. Em camundongos fêmeas deficientes em células T ou B, avaliar:
- Se a testosterona induz o fenótipo "masculino";
- Se o tratamento com testosterona promove disfunção vascular com participação do PVAT;
- Se a transferência de células CD4+ altera os efeitos fenotípicos e vasculares induzidos pela testosterona.
- 5. Em camundongos fêmeas deficientes em células T γδ ou o IL-17R, avaliar:
- Se a testosterona induz o fenótipo "masculino";
- Se o tratamento com testosterona promove disfunção vascular com participação do PVAT.
- Avaliar se o efeito do tratamento com testosterona sobre a função vascular do PVAT é modulado pela iNOS, importante mediadora de processos inflamatórios.

__ Material e métodos

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Todos os protocolos experimentais descritos nesse trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da FMRP-USP, com o n° de protocolo: 079/2019. Foram utilizados camundongos machos e fêmeas WT da linhagem C57BL/6J, obtidos do Biotério Central da USP, *campus* de Ribeirão Preto. Também foram utilizados camundongos fêmeas *knockouts* (^{-/-}) para a isoforma 1 da enzima Rag (Rag1), a cadeia δ do receptor TCR (TCR δ) ou para subunidade A do receptor para IL-17 (IL-17Ra), obtidos do Centro de Criação de Camundongos Especiais (CCCE) da FMRP-USP. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Farmacologia (FMRP-USP) com temperatura (22 ± 1 °C) e umidade (50-60%) controladas, em ciclos claro/escuro de 12 horas (h) e acesso *ad libitum* a ração e água.

Padronização do modelo experimental

De forma preliminar, diversos protocolos de tratamento com testosterona foram testados de modo a mimetizar, pelo menos em parte, os efeitos observados em indivíduos transmasculinos desencadeados pela hormonização. Camundongos fêmeas WT com 8 semanas de idade foram tratadas com cipionato de testosterona (Deposteron®, T) por um período de 8 semanas. Diferentes doses, vias de administração e padrões de tratamento foram testados conforme descrito a seguir: 6 mg/Kg/semana (sem), via intramuscular (im); 6 mg/Kg/sem, via subcutânea (subc); 12 mg/Kg/sem, subc; 24 mg/Kg/sem, subc; e 48 mg/Kg/sem, subc. As vias de administração foram escolhidas de acordo com as vias

utilizadas em humanos (IRWIG, 2017). A testosterona foi diluída em óleo de amendoim (*Sigma Aldrich*), que foi administrado como veículo (V) nos respectivos grupos controle. Para comparação do fenótipo "masculino", um grupo de camundongos machos WT também foi tratado com veículo, a fim de evitar interferentes nas análises de crescimento corporal durante o período do tratamento. Um volume de 10 µL foi administrado na pata traseira dos animais ou 100 µL no dorso quando as injeções foram via intramuscular ou subcutânea, respectivamente. Para a maioria dos protocolos, o tratamento foi realizado uma vez por semana (terças-feiras, 08:00-10:00 h). Para o protocolo de 48 mg/Kg/sem, os animais foram tratados duas vezes por semana (terças e sextas-feiras, 08:00-10:00 h), com doses divididas em 24 mg/Kg/dia. Todos os animais que receberam veículo foram tratados também com esse regime de administração.

Design experimental de protocolos específicos de tratamento

Uma vez realizados os estudos de padronização, investigamos a influência de diferentes condições sobre o tratamento com testosterona. Primeiramente, avaliamos se um tratamento a longo prazo seria capaz de intensificar os efeitos induzidos pela testosterona a curto prazo (8 semanas). Assim, um grupo de camundongos fêmeas WT foi tratado com veículo ou testosterona por 24 semanas. Um grupo de machos também foi tratado com veículo e utilizado para comparações fenotípicas. Assim, obtivemos os seguintes grupos experimentais: 1 e 2) Fêmeas tratadas com veículo por 8 ou 24 semanas (F-V 8 ou 24 sem); 3 e 4) Fêmeas tratadas com testosterona por 8 ou 24 semanas (F-T 8 ou 24 sem); 5 e 6) Machos tratados com veículo por 8 ou 24 semanas (M-V 8 ou 24 sem).

Também investigamos se a gonadectomia seria capaz de intensificar os efeitos induzidos pela testosterona. Para isso, fêmeas WT foram submetidas à ovariectomia

bilateral. Um grupo de fêmeas *sham*-operadas também foi submetido a todos os procedimentos cirúrgicos, porém sem a retirada dos ovários, e utilizado como grupo controle. Novamente, um grupo de machos foi utilizado para comparações fenotípicas. Três dias após a cirurgia, os animais foram tratados com veículo ou testosterona. Dessa forma, obtivemos os seguintes grupos experimentais: 7 e 8) Fêmeas *sham*-operadas tratadas com veículo ou testosterona (F-Sham-V ou F-Sham-T); 9 e 10) Fêmeas ovariectomizadas tratadas com veículo ou testosterona (F-OVX-V ou F-OVX-T); 11) Machos tratados com veículo (M-V).

A fim de avaliarmos a participação de células T CD4+ nos efeitos vasculares induzidos pela testosterona, fêmeas Rag1^{-/-} (que não possuem células T e B) foram tratadas após a transferência de células CD4+. Assim, obtivemos os grupos: 12 e 13) Fêmeas Rag1^{-/-} tratadas com veículo ou testosterona (Rag1^{-/-}-V ou Rag1^{-/-}-T); 14 e 15) Fêmeas Rag1^{-/-} que receberam células CD4+ tratadas com veículo ou testosterona (Rag1^{-/-}-CD4+-V ou Rag1^{-/-}-CD4+-T). Como importante mecanismo da resposta efetora de células Th17, investigamos também se o receptor para IL-17 estaria envolvido nos efeitos vasculares induzidos pela testosterona. Assim, fêmeas IL-17Ra^{-/-} (que não possuem IL-17R funcionais) foram tratadas, dando origem aos seguintes grupos: 16 e 17) Fêmeas IL-17Ra^{-/-} tratadas com veículo ou testosterona (IL-17Ra^{-/-}-V ou IL-17Ra^{-/-}-T). Camundongos fêmeas TCRδ^{-/-} (que não possuem células T γδ) também foram tratadas, a fim de investigarmos se essas células estariam envolvidas nos efeitos vasculares induzidos pela testosterona. Dessa forma, obtivemos os grupos: 18 e 19) Fêmeas TCRδ^{-/-} tratadas com veículo ou testosterona.

Todos os animais foram tratados a partir da 8ª semana de vida por um período de 8 semanas, exceto quando por 24 semanas. Todos os tratamentos descritos nesse trabalho foram realizados sob anestesia. Em todos os casos, após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados por exsanguinação após anestesia e diferentes tecidos foram cuidadosamente coletados e armazenados adequadamente para as análises posteriores. Para todos os casos descritos nesse trabalho, a anestesia foi realizada via inalatória com isoflurano (3%).

Parâmetros de crescimento corporal e avaliação do fenótipo induzido pela testosterona

A hormonização com testosterona em indivíduos transmasculinos aumenta a massa muscular e reduz a massa adiposa com consequente aumento do IMC (IRWIG, 2017). Dessa forma, para avaliação do fenótipo "masculino", as mudanças na composição corporal foram avaliadas nas fêmeas e machos após os respectivos tratamentos. Sob anestesia, a massa corporal (com aproximação de 0,1 g) e o comprimento nasoanal (com aproximação de 0,1 g) e o comprimento nasoanal (com aproximação de 0,1 mm) de cada animal foram medidos durante (mensalmente) e após o período de tratamento. O IMC foi determinado pela razão entre a massa corporal e o quadrado do comprimento nasoanal (cm/mm²), conforme descrito por Sjögren e colaboradores (2001) . Após a eutanásia dos animais, o músculo gastrocnêmico e a gordura perigonadal foram coletados como exemplares da massa muscular e adiposa, respectivamente, para inferência indireta da composição corporal. A massa seca [secagem em estufa (37 °C, 24 h)] do músculo gastrocnêmico e a massa da gordura perigonadal foram expressas após a normalização individual pelo comprimento da tíbia (mm).

Procedimento cirúrgico da ovariectomia

A ovariectomia bilateral foi realizada em fêmeas WT com 8 semanas de idade através de incisão abdominal sob anestesia. Nos três dias posteriores ao procedimento, os animais foram tradados com analgésico (flunixina, 2,5 mg/Kg/dia) e antibiótico (enrofloxacina, 10 mg/Kg/dia) via subcutânea. Além da dosagem sérica dos níveis de estradiol, a massa uterina foi utilizada para verificação da eficácia do procedimento cirúrgico. Após a eutanásia dos animais, o útero foi retirado e seco em estufa (37 °C, 24 h). A massa do útero foi expressa após a normalização individual pelo comprimento da tíbia (mm).

Isolamento e Purificação de células CD4+

Para o procedimento da transferência adotiva, células CD4+ foram obtidas de órgãos linfoides secundários de camundongos fêmeas WT naïve com 8 semanas de idade. Após eutanásia sob anestesia, o baco e linfonodos (inquinais, axilares, braquiais, cervicais e mesentérico) dos animais foram cuidadosamente removidos e processados por meio de uma cell strainer (100 µm) em RPMI 1640 incompleto (RPMI-I; Corning) para obtenção de uma suspensão de células. As hemácias foram lisadas com o tampão ACK (ammoniumchloride-potassium). As células obtidas foram centrifugadas (450 g, 5 minutos, 4 °C) e ressuspendidas em RPMI 1640 completo (RPMI-C; suplementado com 200 mmol/L de glutamina, 10.000 unidades de penicilina-estreptomicina, 0,2 µg/ml de anfotericina B, 55 μ mol/L de β-mercaptoetanol (Sigma Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (HyClone-GE Healthcare). Em seguida, a suspensão de células foi colocada em garrafas de cultura e incubadas em estufa (37 °C, 5% CO2 e 8% de umidade) por 30 minutos para serem descartadas células aderentes (macrófagos e células dendríticas, por exemplo). As células em suspensão foram então coletadas e centrifugadas nas mesmas especificações descritas anteriormente. Em seguida, as células foram incubadas com CD4 (L3T4) microbeads para isolamento de células T CD4+ naïve (Miltenyi Biotec), seguindo as

recomendações do fabricante, com posterior separação através de colunas magnéticas. Foi obtida uma pureza >90% de células T CD4+ confirmadas por citometria de fluxo.

Transferência de células CD4+

Camundongos fêmeas Rag1^{-/-} com 5 semanas de idade receberam as células T CD4+. Imediatamente após a obtenção das células, as mesmas foram contadas em câmara de *Neubauer* e cada animal recebeu 6x10⁶ células ressuspendidas em 50 µL de tampão salina fosfato (PBS) estéril através da veia caudal, sob anestesia. A transferência de células ocorreu três semanas antes do início do tratamento com veículo ou testosterona, conforme descrito por Guzik e colaboradores (2007) . A eficácia da transferência foi verificada por citometria de fluxo dos órgãos linfoides secundários, após a eutanásia dos animais.

Dosagens hormonais

Durante a eutanásia, amostras de soro foram obtidas dos animais WT e armazenadas em freezer -80 °C até o momento das análises.

Para análise da testosterona sérica, realizamos o protocolo adaptado descrito por Wang e colaboradores (2014) de extração, aquisição e análises por cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS) de hormônios esteroides. Para extração, as amostras de soro diluídas em metanol (1:1 *v/v*) foram evaporadas e ressuspendidas em 250 µL de tampão acetato de sódio (0,5 mol/L, pH 5.5). Em seguida, as amostras foram mantidas sob agitação por 2 h, à temperatura ambiente. Foram adicionados 10 µL de solução contendo padrão interno para quantificação

hormonal (5-a-dihidro-11-keto-testosterona-d3, 2 µg/mL, Sigma). Para extração líquidolíquido, foram adicionados 800 µL de solução acetato:hexano (6:4, v/v). Então, as amostras foram homogeneizadas com Bead-ruptor (Omni, 3 minutos, 10 Hz). A fase orgânica foi coletada e transferida para tubos de 2 mL. A fase aquosa foi submetida a nova extração, com adição de 800 µL de ácido fórmico (10%) em acetato de etila com posterior homogeneização, seguida de centrifugação (10 min, 2000 g, 4°C). A fase orgânica foi coletada e adicionada à primeira fase coletada. As fases orgânicas foram evaporadas usando um sistema concentrador a vácuo (speed vacuum) (Eppendorf, 30 °C) e redissolvidas em 300 µL de tampão carbonato de amônio (0,2 mol/L, pH 9.8). Em seguida, 600 μ L de acetato:hexano (6:4, ν/ν) foram adicionados para outra fase de extração. Após agitação dessas amostras, a fase orgânica foi coletada e foram adicionados 600 µL de acetato de etila à fase aquosa, que foram novamente homogeneizadas. As fases orgânicas coletadas foram novamente evaporadas. As amostras finais contendo os hormônios esteroides foram ressuspendidas em 50 µL de solução metanol:água (7:3, v/v), homogeneizadas por 5 minutos e centrifugadas (10 minutos, 2000 g, 4 °C). O sobrenadante foi transferido para tubos de injeção em sistema de injeção em HPLC.

Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massas *tandem* (LC-MS/MS)

A separação cromatográfica foi realizada no sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Kyoto, HO, JP) conforme descrito por Peti e colaboradores (2018). As fases móveis utilizadas foram (A) ácido fórmico (0,1%) em água e (B) ácido fórmico (0,1%) em aceto nitrilo. A coluna utilizada foi a *Ascentis Express C18* (100 x 2.1 mm; 2.7 µm), Supelco (St. Louis, MO, EUA). Um volume de 10 µL numa taxa de 0,5 mL/minuto foi

injetado no sistema. A condição de gradiente foi 1 minuto de 30% fase B, que foi então elevada a 50% para 2 minutos e, em seguida, a 60% para 5 minutos, que então foi mantida até 8 minutos. Em seguida foi elevada para 98% fase B para 9 minutos e essa condição foi mantida até 11 minutos. As configurações de canais MRM, a energia de colisão e o potencial de decomposição foram otimizados para dosagem da testosterona. A análise da espectrometria de massas foi realizada usando TripleTOF® 5600+ (Sciex -Foster, CA, EUA), operado em modo positivo. Os parâmetros otimizados foram: gás 1: 60 psi; gás 2: 40 psi; cortina de gás: 25 psi; voltagem de íon spray: 5 kV; temperatura turbo: 550 °C; faixa de m/z dos produtos iônicos experimentais: 50 a 400 e tempo de permanência: 100 ms. A calibração de massa (< 2 ppm) foi realizada usando solução de ionização química pressãoatmosférica (APCI) de calibração negativa (Sciex - Foster, CA, EUA). A aquisição dos dados por realizada usando o software Analyst[™] (SCIEX- Foster, CA, EUA). A identificação hormonal foi realizada com o PeakView[™] (SCIEX- Foster, CA, EUA) e a quantificação com o MultiQuant[™] (SCIEX- Foster, CA, EUA), que normaliza o pico de intensidade dos íons moleculares individuais de acordo com o padrão interno da testosterona. A concentração final da testosterona foi normalizada pelo volume inicial de soro e os resultados foram expressos como ng/dL.

Os níveis séricos de Estradiol foram medidos por *kit* de ELISA imunoensaio (*Cayman Chemical*, 501890), conforme instruções do fabricante.

Dosagem da IL-17

Os níveis circulantes de IL-17 foram dosados em amostras de soro de fêmeas WT tratadas com veículo ou testosterona através de *kit* de ELISA imunoensaio (*R&D Systems*,

M1700) conforme recomendações do fabricante. Amostras de soro de camundongos machos com psoríase induzida por Imiquimod® (IMQ) foram utilizadas como controle positivo.

Estudos de reatividade vascular

Após a eutanásia, a aorta torácica foi removida e transferida para placas de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit modificada com a seguinte composição (em mol/L): NaCl: 130; KCl: 4,7; NaHCO₃: 14,9; KH₂PO₄: 1,18; MgSO₄.7H₂O: 1,17; Glucose 5,5: CaCl₂.2H₂O: 1,56; EDTA: 0,026. A aorta foi dividida em anéis com 2 mm de comprimento e o PVAT foi cuidadosamente removido de alguns anéis, de acordo com os protocolos propostos. Os anéis de aorta foram montados em miógrafo (modelo: 620 M; *Danish Myo Technology* – DMT, Copenhague, Dinamarca) contendo a solução de Krebs-Henseleit, gaseificada com 5% CO₂/95% O₂, com pH mantido a 7,4 e a 37 °C para registro de tensão isométrica. Após um período de 60 minutos de estabilização, as artérias foram estimuladas com cloreto de potássio (KCl, 120 mmol/L) a fim de verificarmos a integridade funcional do tecido. Em nosso estudo utilizamos apenas preparações com endotélio, cuja integridade foi confirmada através do relaxamento ≥ 80% induzido por concentração única de acetilcolina (ACh, 1 µmol/L, *Sigma Aldrich*) em aortas pré-contraídas com fenilefrina (PE, 0,3 µmol/L, *Sigma Aldrich*).

Para todos os grupos, a vasodilatação dependente do endotélio foi avaliada por curvas concentração-efeito para ACh (0,1 nmol/L – 30 µmol/L) em anéis de aorta sem PVAT e os valores foram expressos como percentual de relaxamento sobre uma concentração estável induzida por PE (0,3 µmol/L). A resposta vasoconstritora foi avaliada por curvas concentração-efeito para PE (0,1 nmol/L – 30 µmol/L) em anéis de aorta com e sem PVAT

e os valores foram expressos após a normalização pela resposta contrátil ao estímulo prévio com KCI (120 mmol/L). A contração ao KCI foi semelhante entre os anéis de aorta com (7,6 ± 0,2 mN) e sem PVAT (7,2 ± 0,2 mN). Para investigarmos a participação da enzima iNOS na resposta contrátil induzida pela PE, curvas concentração-efeito foram realizadas na ausência (controle) ou presença do inibidor seletivo para iNOS (1400W, 1µmol/L), em anéis de aorta com ou sem PVAT de camundongos fêmeas WT tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. As preparações foram incubadas com o 1400W por 30 minutos antes da realização das curvas.

Pressão arterial

A pressão arterial foi medida nos grupos de animais WT após os respectivos períodos de tratamento. Para isso, os animais foram anestesiados e, após cervicotomia, cateteres de polipropileno PE-10 (0,61 mm de diâmetro externo e 0,28 mm interno, *Clay-Adams*) foram cuidadosamente inseridos no lúmen da artéria carótida esquerda para o registro da pressão arterial. Uma dose única de tramadol (12,5 mg/Kg, subc) foi administrada para analgesia pós operatória. Vinte e quatro horas após a canulação, os cateteres foram acoplados a um transdutor de pressão e a pressão arterial foi registrada através de um computador equipado com interface analógico-digital (PowerLab/4SP, ADInstruments, Colorado Springs, CO). Após 30 minutos de estabilização, a pressão arterial foi continuamente registrada nos animais acordados e com livre movimentação.

Citometria de Fluxo

Após o tratamento com testosterona por 8 semanas, o perfil de células T CD4+ nos órgãos linfoides secundários de fêmeas WT foi analisado através de citometria de fluxo. Após a eutanásia dos animais, a suspenção de células de baço e linfonodos foi obtida conforme descrito anteriormente. Para marcação de citocinas intracelulares, as células foram estimuladas com éster de forbol 12-miristato-13-acetato (PMA: 50 ng/ml; Sigma Aldrich), ionomicina (500 ng/ml; Sigma Aldrich) e um inibidor do transporte do complexo de Golgi (Golgi stop: 1,5 µl/ml; BD Biosciences) por 4 h na estufa (37 °C, 5% CO₂ e 8% de umidade) em meio de cultura completo. A marcação extracelular foi realizada com um marcador de viabilidade celular (Fixable viability dye; 1:3000; eBioscence), anticorpos anti-CD4 (1:200; BD Biosciences) e TCR γδ (1:200; BD Biosciences) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após isso, as células foram centrifugadas e fixadas utilizando o fixador do kit (transcription factor staining buffer set; eBioscence) por 10 minutos à temperatura ambiente, com posterior centrifugação. Em seguida, as células foram permeabilizadas com Perm/Wash buffer (BD Biosciences) e marcadas com anticorpos monoclonais anti- IL-17A (1:200; BD Biosciences), IFN-y (1:200; BD Biosciences) e FoxP3 (1:200; BD Biosciences) por 15 minutos. Todas as incubações foram realizadas em temperatura ambiente. As células foram centrifugadas, ressuspendidas em tampão PBS e adquiridas no citômetro de fluxo (FACSVerse™, BD Biosciences). A análise dos dados foi realizada usando o software FlowJo® X.

Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Para avaliação da expressão gênica do fator de transcrição RORγt, marcador sugestivo para células Th17, no tecido vascular, a aorta e o PVAT foram coletados de fêmeas WT após 8 semanas de tratamento com veículo ou testosterona. O RNA total foi

extraído através da técnica de fenol-clorofórmio (Trizol®, ThermoFischer). Após a homogeneização das amostras com 500 µL (para aorta) ou 1 mL (para PVAT) do reagente, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio (Sigma Aldrich) e, após agitação, as mesmas foram centrifugadas (13 000 g, 4 °C, 15 minutos). A fase aquosa, contendo o RNA, foi retirada e transferida para um novo tubo e o material genético foi precipitado com a adição de isopropanol (Sigma Aldrich). Após centrifugação (13 000 g, 4 °C, 15 minutos), o sobrenadante foi desprezado e o pellet contendo RNA foi lavado duas vezes com álcool 70% com sucessivas centrifugações (7 000 g, 4 °C, 10 minutos). Após secagem, o RNA foi ressuspendido em água DPEC (ThermoFischer) e a concentração foi verificada por espectrofotometria (260 nm) (NanoDrop®, ThermoFisher). 500 ng (para aorta) ou 1 µg (para PVAT) de RNA foram convertidos a cDNA usando o kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (ThermoFisher), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o cDNA, os primers e o master mix Syber Green (PCR Biosystems) contendo componentes da reação como nucleotídeos e a DNA polimerase. As reações foram realizadas com o aparelho StepOnePlus® (ThermoFisher). As placas contendo as amostras de cDNA e os reagentes foram submetidas ao seguinte protocolo de ciclagem: 1 ciclo a 95 °C (10 minutos) + 40 ciclos a 95 °C (15 seg) e 60 °C (1 minuto). As curvas de dissociação (melting) foram obtidas em três etapas: 15 seg a 95 °C, 1 minuto a 60 °C e mais 15 seg a 95 °C. Os resultados foram analisados através do cycle threshold (Ct), sendo os dados normalizados pela expressão gênica de GAPDH e a diferença entre os grupos calculada através do método 2^{-ΔΔCt}. As sequências dos primers utilizados foram: Rorc: forward: TTCAGTATGTGGTGGAGTTTGC, AAAAGACTGTGTGGTTGTTGG; reverse: Gapdh: forward: AGGAGCGAGACCCCACTAAC, reverse: GTGGTTCACACCCATCACAA. Nenhum dos primers apresentou amplificação nos respectivos controles negativos ou mais de um pico

na curva de melting. Além disso, todos os primers apresentaram eficiência superior a 90%.

Análise da expressão proteica por Western Blot

Para análise da expressão proteica da forma fosforilada (p-) no resíduo 705 de tirosina (Y⁷⁰⁵) e forma total do fator de transcrição STAT3, foram coletadas as aortas torácicas de fêmeas WT após 8 semanas de tratamento com veículo ou testosterona. As amostras foram maceradas e homogeneizadas em tampão RIPA acrescentado de inibidores de proteases e fosfatases sob refrigeração. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (13 000 rpm, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante contendo o extrato proteico foi coletado. A concentração de proteínas do extrato foi mensurada pelo método descrito por Bradford (BRADFORD, 1976) e, após diluição em tampão Laemmli, 20 µg de proteínas de cada amostra foram separadas por eletroforese em géis de poliacrilamida (10%) com dodecil sulfato de sódio. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose que, em seguida, foram incubadas (1 h, a temperatura ambiente) com solução de bloqueio [leite desnatado (5%) diluído em tampão Tris Buffered Saline-Tween) para redução de ligações inespecíficas dos anticorpos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários anti- p-STAT3 (Y⁷⁰⁵) (1:2000) ou STAT3 (1:1000) overnight, a 4 °C. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit (1:4000) conjugado a peroxidase (1 h, a temperatura ambiente). A expressão proteica de β-actina foi utilizada para normalização da expressão proteica da forma total da STAT3 e controle de carregamento proteico do gel. Para isso, as membranas foram incubadas (1 h, a temperatura ambiente) com anticorpo anti-β-actina já conjugado à peroxidase (1:10000). As bandas de expressão proteica foram detectadas e visualizadas através de fotodocumentador ImageQuant 350 (GE Healthcare Piscata Way,

NJ, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através do software ImageJ® (*NIH, EUA*). Os dados foram expressos em unidades arbitrárias.

Análise estatística

Para os estudos de função vascular, as curvas concentração-efeito foram plotadas individualmente e analisadas por regressão não linear, gerando curvas sigmoides. A área sob a curva (*Area Under the Curve*, AUC) foi calculada em unidades arbitrárias, como inferência da magnitude do efeito de vasodilatação ou constrição. A diferença das AUC (Δ AUC) também foi quantificada para avaliação da modulação de fatores isolados sobre as respostas vasomotoras. Os dados foram representados como média ± erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados usando o teste *t* de *Student* bicaudal (quando comparados dois grupos) ou com a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguidas pelo teste de *Dunnett* (quando comparados ao grupo controle) ou *Tukey* (para comparações múltiplas). As análises estatísticas foram realizadas com o software *GraphPad Prism*® (versão 9,0) com nível de significância estatística quando *p*<0,05.



Padronização do modelo experimental de hormonização induzida por testosterona.

Foram realizados diferentes protocolos de tratamento com testosterona em camundongos fêmeas WT a fim de mimetizar, pelo menos em parte, os efeitos desencadeados pela hormonização em indivíduos transmasculinos. Dentre os efeitos decorrentes do processo de hormonização (IRWIG, 2017), a mudança da composição corporal através do aumento da massa muscular e redução da massa adiposa, com consequente aumento do IMC, e o aumento dos níveis circulantes de testosterona foram adotados como critério da avaliação do fenótipo "masculino" para validação do modelo murino proposto. Um grupo de camundongos machos foi utilizado para fins de comparação fenotípica. As figuras 1 e 2 demonstram os efeitos induzidos pelos diferentes protocolos de administração. Após 8 semanas de tratamento, apenas a dose de 48 mg/Kg/sem, subc, foi capaz de aumentar significativamente a massa corporal e o IMC dos camundongos fêmeas, este último a níveis similares aos observados nos machos (Fig. 1E, 1F). Todas os regimes de tratamento com testosterona com administração subcutânea reduziram a massa da gordura perigonadal (Fig. 2A). Porém, apenas a dose de 48 mg/Kg/sem aumentou a massa do músculo gastrocnêmico nas fêmeas (Fig. 2B). Essa mesma dose também aumentou os níveis séricos de testosterona nas fêmeas a níveis similares observados nos machos como mostra a tabela 1. Nenhum dos protocolos testados promoveu mudança aparente no comportamento diurno, sinais de toxicidade ou morte nos animais. Como apenas a dose de 48 mg/Kg/sem induziu o fenótipo "masculino" nas fêmeas, esse foi o protocolo de tratamento adotado para os próximos experimentos do trabalho.



Figura 1. Valores e ganho de massa corporal (A, C) e IMC (B, D)_de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas antes e após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Valores da massa corporal (E) e IMC (F) ao final do tratamento. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma-via seguida pelo teste de *Dunnett* (F-V como grupo controle) e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo F-V. F: fêmeas; M: machos; V: veículo; T: testosterona; sem: semanas; im: intramuscular; subc: subcutâneo.



Figura 2. Massa da gordura perigonadal (A) e do músculo gastrocnêmico (B) de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas ao final do tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma-via seguida pelo teste de *Dunnett* (F-V como grupo controle) e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo F-V. F: fêmeas; M: machos; V: veículo; T: testosterona; sem: semana; im: intramuscular; subc: subcutâneo.

Tabela 1. Níveis séricos de testosterona de camundongos C57BL/6J machos (M) e fêmeas (F) tratados com veículo (V) ou testosterona (T, 48 mg/Kg/sem) por 8 semanas.

	F-V	F-T	M-V
Testosterona (ng/dL)	36.0 ± 34.3	207.6 ± 53.2*	254.1 ± 92.5*

Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma-via seguida pelo teste de *Dunnett* (F-V como grupo controle) e indicadas quando *p*<0,05. * *vs*. F-V.

Efeitos fenotípicos e cardiovasculares após tratamento com testosterona a

curto ou longo prazo

Uma vez estabelecido o regime de administração da testosterona, primeiramente investigamos se o tratamento a longo prazo (24 semanas) seria capaz de intensificar o fenótipo "masculino" observado nas fêmeas no regime de tratamento a curto prazo (8 semanas). Em seguida, avaliamos os efeitos cardiovasculares induzidos pela testosterona após os dois períodos de tratamento. Em termos de composição corporal, a testosterona aumentou a massa corpórea, o IMC e a massa músculo gastrocnêmico após 24 semanas de tratamento de forma semelhante ao observado após o tratamento a curto prazo (Fig. 3).

Sobre o sistema cardiovascular, o tratamento com testosterona diminuiu a vasodilatação dependente do endotélio nas fêmeas de forma semelhante após os dois períodos de tratamento (Fig. 4). A testosterona não modificou a vasoconstrição na ausência do PVAT após 8 (AUC, em unidades arbitrárias: F-V: 426,0 ± 17,9, n=6; F-T: 484,2 ± 19,6, n=10) ou 24 semanas (AUC: F-V: 340,9 ± 26,8, n=8; F-T: 344,9 ± 17,7, n=8) de tratamento. Entretanto, o efeito anticontrátil do PVAT foi maior nas fêmeas após o tratamento de curto prazo (Fig. 5A). Apenas após 24 semanas de tratamento, a testosterona produziu aumento da pressão arterial nas fêmeas (Fig. 6), sugerindo que a disfunção vascular induzida pelo tratamento precede o aumento pressórico nesses animais. A testosterona não modificou o efeito anticontrátil do PVAT após o regime de tratamento a longo prazo (Fig. 5B). Assim, para investigarmos os possíveis mecanismos envolvidos na disfunção vascular induzida pela testosterona, apenas o tratamento de 8 semanas foi escolhido para os próximos experimentos.



Figura 3. Ganho de massa corporal (A) e valores de IMC (B) de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 ou 24 semanas. Valores de massa corporal (C), IMC (D), massa da gordura perigonadal (E) e do músculo gastrocnêmico (F) ao final do tratamento. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de uma-via seguida pelo teste de *Dunnett* (F-V como grupo controle) dentro de cada grupo com a mesma idade e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo F-V. F: fêmeas; M: machos; V: veículo; T: testosterona.



Figura 4. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 ou 24 semanas. Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) (A) e área sob a curva (AUC) (B) para resposta vasodilatadora. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; T: testosterona; sem: semanas.



Figura 5. Resposta contrátil de anéis de aorta sem (controle, P-) e com PVAT (P+) de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 (A) ou 24 (B) semanas. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A, B) e diferença da área sob a curva (Δ AUC) (C) calculada para a resposta vasoconstritora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; Testo: testosterona; sem: semanas.



Figura 6. Valores de pressão arterial média de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 ou 24 semanas. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; T: testosterona; sem: semanas.

Diferenças sexuais sobre o sistema cardiovascular

Os hormônios androgênicos, em doses suprafisiológicas, estão associados a efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular e nós observamos que, de fato, a testosterona induziu disfunção vascular e aumentou a pressão arterial nas fêmeas (Fig. 4, 5 e 6). Assim, investigamos se os efeitos decorrentes do tratamento hormonal também são observados no contexto fisiológico através da comparação dos parâmetros cardiovasculares entre fêmeas e machos nos diferentes tempos avaliados. Após 8 semanas de tratamento com veículo, a vasodilatação dependente do endotélio (Fig. 7), a vasoconstrição em anéis de aorta sem PVAT (AUC, em unidades arbitrárias: F: 426,0 ± 17,9, n=6; M: 398,1 ± 19,8, n=5) e a pressão arterial (Fig. 9) foram semelhantes entre fêmeas e machos. Contudo, o efeito anticontrátil do PVAT foi maior nos machos, como observado na figura 8. Após 24 semanas de tratamento, a vasoconstrição foi similar entre fêmeas e machos independente da

presença do PVAT [AUC (P-), em unidades arbitrárias: F: $340,9 \pm 26,8$, n=8; M: $365,8 \pm 27,8$, n=8]. O relaxamento vascular dependente do endotélio foi menor apenas nos machos (Fig. 7), porém sem alteração nos níveis de pressão arterial (Fig. 9).



Figura 7. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J fêmeas e machos tratados com veículo por 8 ou 24 semanas. Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) (A) e área sob a curva (AUC) (B) calculada para resposta vasodilatadora. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* M (8 sem) veículo. F: fêmeas; M: machos; V: veículo; sem: semanas.



Figura 8. Resposta contrátil de anéis de aorta sem (controle, P-) e com PVAT (P+) de camundongos C57BL/6J fêmeas e machos tratados com veículo por 8 (A) ou 24 (B) semanas. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A, B) e diferença da área sob a curva (Δ AUC) (C) calculada para resposta vasoconstritora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo F. F: fêmeas; M: machos; V: veículo; sem: semanas.


Figura 9. Valores de pressão arterial média de camundongos C57BL/6J fêmeas e machos tratados com veículo por 8 ou 24 semanas. Os dados estão representados como média ± EPM. F: fêmeas; M: machos; V: veículo; sem: semanas.

Influência da ovariectomia sobre os efeitos induzidos pelo tratamento com testosterona

Uma vez que os ovários são a principal fonte de estrógenos nas fêmeas e dada a escassez de estudos que associam diferentes abordagens do processo de transição de gênero em indivíduos transgênero (como hormonização e gonadectomia, por exemplo), avaliamos o impacto da ovariectomia nos camundongos fêmeas sobre o tratamento com testosterona. A eficácia da cirurgia foi verificada pela redução dos níveis séricos de estradiol (tabela 2) e da massa uterina (Fig. 10) em relação às fêmeas sham-operadas.

Primeiramente verificamos se a cirurgia alterou o fenótipo "masculino" induzido pela testosterona nas fêmeas. Como observado na Fig. 11, a ovariectomia promoveu aumento da massa corporal e da gordura perigonadal sem modificar a massa do músculo gastrocnêmico ou IMC nas fêmeas. O tratamento com testosterona promoveu aumento da massa corporal (Fig. 11C) e do músculo gastrocnêmico (Fig. 11F), do IMC (Fig. 11D) e dos

níveis circulantes de testosterona (tabela 2), além de reduzir a massa da gordura perigonadal (Fig. 11E) de forma semelhante entre fêmeas OVX e sham-operadas.

Após a avaliação fenotípica, investigamos o impacto da cirurgia sobre os efeitos cardiovasculares induzidos pelo tratamento com a testosterona nas fêmeas. A ovariectomia diminuiu a vasodilatação dependente do endotélio e o tratamento com testosterona nesses animais promoveu maior redução do relaxamento vascular à ACh em comparação às fêmeas sham-operadas (Fig. 12B). Contudo, a cirurgia demonstrou efeito aditivo (e não potencializador) ao tratamento (Fig. 12C). A ovariectomia ou o tratamento hormonal não modificou a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta sem PVAT (AUC, em unidades arbitrárias: F-Sham-V: 426,0 ± 17,9, n=6; F-Sham-T: 484,2 ± 19,6, n=10; F-OVX-V: 487,8 ± 28,6, n=9; F-OVX-T: 447,4 ± 45,1, n=9) e o tratamento com testosterona intensificou o efeito anticontrátil do PVAT de forma semelhante entre fêmeas OVX e shamoperadas (Fig. 13). Também não observamos diferenças entre os níveis pressóricos entre as fêmeas OVX ou sham-operadas tratadas com veículo ou testosterona (Fig. 14). Uma vez que a ovariectomia não exerceu influência sobre o fenótipo "masculino" ou efeitos cardiovasculares promovidos pela testosterona, apenas fêmeas intactas foram utilizadas para os próximos passos do estudo.

Tabela 2. Níveis séricos de testosterona ou estradiol de camundongos C57BL/6J machos (M) e fêmeas (F) intactas (sham) ou ovariectomizadas (OVX) tratados com veículo (V) ou testosterona (T) por 8 semanas (48 mg/Kg/sem).

	F-Sham-V	F-Sham-T	F-OVX-V	F-OVX-T	M-V
Testosterona	36.0 ± 34.3	207.6 ±	10.7 ± 4.4	224.6 ±	254.1 ±
(ng/dL)		53.2*		96.30*	92.5#
Estradiol	76.1 ± 6.3	79.2 ± 13.2	38.6 ± 4.0#	69.9 ± 5.6*	38.3 ± 5.4#
(pg/mL)					

Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste *t* de Student (entre fêmeas e machos) ou ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* (entre os grupos de fêmeas) e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V; # *vs.* F-Sham-V.



Figura 10. Massa do útero de camundongos C57BL/6J fêmeas intactas (Sham) ou ovariectomizadas (OVX) tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* (B) e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V; # *vs.* Sham-V. V: veículo; T: testosterona.



Figura 11. Ganho de massa corporal (A) e valores de IMC (B) de camundongos C57BL/6J machos e fêmeas intactas (Sham) ou ovariectomizadas (OVX) durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. A massa corporal (C), o IMC (D), a massa da gordura perigonadal (E) e do músculo gastrocnêmico (F) também foram avaliados ao final do tratamento. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* dentre os grupos de fêmeas e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V; *# vs.* F-Sham-V. F: fêmeas; M: machos; V: veículo; T: testosterona.



Figura 12. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos C57BL/6J fêmeas intactas (Sham) ou ovariectomizadas (OVX) tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curva concentração-efeito para acetilcolina (ACh) (A), área sob a curva (AUC) (B) e diferença da AUC (Δ AUC) (C) calculadas pra resposta vasodilatadora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* Sham-V. V: veículo; T: testosterona.



Figura 13. Análise da resposta contrátil de anéis de aorta sem (controle, P-) e com PVAT (P+) de camundongos C57BL/6J fêmeas intactas (Sham) ou ovariectomizadas (OVX) tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A, B) e diferença da área sob a curva (Δ AUC) (C) calculada para resposta vasoconstritora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; T: testosterona.



Figura 14. Valores de pressão arterial média de camundongos C57BL/6J fêmeas intactas (Sham) ou ovariectomizadas (OVX) tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. Os dados estão representados como média ± EPM. V: veículo; T: testosterona.

Perfil de células T CD4+ circulantes e no tecido vascular após o tratamento com testosterona

Uma vez que linfócitos T CD4+ participam da disfunção vascular associada a doenças cardiovasculares, investigamos se a testosterona modifica o perfil dessas células em órgãos linfoides periféricos de fêmeas sob tratamento. Como observado na figura 15, a testosterona aumentou a frequência de células T IL-17A+CD4+ nos linfonodos e reduziu a frequência de células T IFNγ+CD4+ no baço das fêmeas, sugerindo um amento de células Th17 e redução de células Th1 circulantes, respectivamente. Não observamos diferença na frequência de células T Foxp3+CD4+ (Tregs) em nenhum dos órgãos linfoides (Fig. 15). O tratamento com testosterona aumentou a expressão gênica do fator de transcrição RORγt na aorta (Fig. 16A) e no PVAT (Fig. 16B), sugerindo o aumento da população de células Th17 na vasculatura. Além disso, a testosterona também aumentou a fosforilação do resíduo Y⁷⁰⁵ do fator de transcrição STAT3 (Fig. 17B), sugerindo o aumento de sua atividade (GUANIZO et al., 2018), na aorta dos animais.



Figura 15. Perfil de células T CD4+ de linfonodos (A, B) ou baço (C, D) de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. Histogramas representativos (A, C) e frequência (B, D) de células T CD4+ positivas para os marcadores IL-17A, FoxP3 e IFN γ , indicativas da população de células Th17, Tregs e Th1, respectivamente. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por teste *t* de *Student* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V. V: veículo; T: testosterona.



Figura 16. Expressão gênica do fator de transcrição ROR γ t na aorta (A) e PVAT (B) de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por teste *t* de *Student* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V. V: veículo; T: testosterona.



Figura 17. Expressão proteica das formas fosforilada (Y^{705}) (B) e total (C) do fator de transcrição STAT3 na aorta de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. Bandas representativas do *imunoblotting* estão apresentadas no painel A. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por teste *t* de *Student* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V. V: veículo; T: testosterona.

Participação de linfócitos na disfunção vascular induzida pela testosterona

Com base na análise do perfil de células T CD4+, primeiramente investigamos a participação de linfócitos na disfunção vascular induzida pela testosterona nas fêmeas. Para isso, foram utilizados camundongos fêmeas Rag1^{-/-} para avaliação da função vascular após o tratamento com testosterona.

Avaliamos se o tratamento com testosterona também foi capaz de induzir o fenótipo "masculino" nesses animais. Como observado na figura 18, a testosterona promoveu aumento da massa corporal (Fig. 18C) e do músculo gastrocnêmico (Fig. 18F), do IMC (Fig. 18D) e reduziu a massa da gordura perigonadal (Fig. 18E) nos animais Rag1^{-/-}, reproduzindo os efeitos observados nos animais WT.

Em termos de função vascular, a testosterona não reduziu a vasodilatação dependente do endotélio (Fig. 19) ou intensificou o efeito anticontrátil do PVAT (Fig. 20) nas fêmeas Rag1^{-/-}, em contraste ao observado nas fêmeas WT, demonstrando que, de fato, linfócitos estão envolvidos na disfunção vascular induzida pelo tratamento. A contração vascular nos anéis de aorta sem PVAT foi semelhante entre os grupos experimentais (AUC, em unidades arbitrárias: WT-V: $426,0 \pm 17,9$, n=6; WT-T: $484,2 \pm 19,6$, n=10; Rag1^{-/-}-V: $447,7 \pm 16,9$, n=6; Rag1^{-/-}-T: $412,1 \pm 20,5$, n=6)



Figura 18. Ganho de massa corporal (A) e valores de IMC (B) de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou Rag1^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. A massa corporal (C), o IMC (D), a massa da gordura perigonadal (E) e do músculo gastrocnêmico (F) também foram avaliados ao final do tratamento. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* dentre os grupos de fêmeas e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V. V: veículo; T: testosterona.



Figura 19. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou Rag1^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) (A) e área sob a curva (AUC) (B) calculada para resposta vasodilatadora. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; Testo: testosterona.



Figura 20. Resposta contrátil de anéis de aorta sem (controle, P-) e com PVAT (P+) de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou Rag1^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A, B) e diferença da área sob a curva (Δ AUC) (C) calculada para resposta vasoconstritora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; T: testosterona.

Participação de células T CD4+ na disfunção vascular induzida pela

testosterona

A fim de confirmar o envolvimento de células CD4+ na disfunção vascular induzida pela testosterona, estudos de reatividade vascular também foram realizados em fêmeas Rag1^{-/-} tratadas com testosterona após a transferência de células CD4+ para esses animais. A eficácia da transferência das células foi avaliada por citometria de fluxo e confirmada pelo aumento da frequência de células CD4+ dentre os esplenócitos das fêmeas Rag1^{-/-}, sem influência do tratamento com testosterona (Fig. 21).

Primeiramente, investigamos se a transferência de células CD4+ exerceu influência sobre o fenótipo "masculino" nas fêmeas Rag1^{-/-} induzido pelo tratamento com testosterona. Como observado na figura 22, a transferência células CD4+ não modificou os efeitos sobre a composição corporal induzidos pelo tratamento com testosterona nas fêmeas Rag1^{-/-}. Em seguida, avaliamos a função vascular desses animais e observamos que a transferência das células CD4+ restaurou os efeitos de redução da vasodilatação dependente do endotélio (Fig. 23) e aumento do efeito anticontrátil do PVAT (Fig. 24) induzidos pela testosterona nos animais Rag1^{-/-} de forma semelhante ao observado nos animais WT, confirmando o envolvimento dessas células na disfunção vascular induzida pelo tratamento hormonal. A transferência de células T CD4+ não modificou a resposta contrátil à PE em anéis de aorta sem PVAT dos animais Rag1^{-/-} (AUC, em unidades arbitrárias: Rag1^{-/-}-V: 447,7 ± 16,9, n=6; Rag1^{-/-}-T: 412,1 ± 20,5, n=6; Rag1^{-/-}-CD4+-V: 465,1 ± 34,2, n=7; Rag1^{-/-}-CD4+-T: 456,1 ± 57,6, n=8).



Figura 21. Frequência de células T CD4+ de esplenócitos de camundongos fêmeas Rag1^{-/-}, após a transferência adotiva de células CD4+ (←), tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. Histogramas representativos da frequência de células positivas para o marcador CD4.



Figura 22. Ganho de massa corporal (A) e IMC (B) de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou Rag1^{-/-}, após a transferência de células CD4+ (\leftarrow), durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. A massa corporal (C), o IMC (D), a massa da gordura perigonadal (E) e do músculo gastrocnêmico (F) também foram avaliados ao final do tratamento. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste *t* de *Student* (entre os grupos WT) ou ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* (entre os grupos Rag1^{-/-}) e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V. V: veículo; T: testosterona.



Figura 23. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos fêmeas Wild Type (WT) (A) ou Rag1^{-/-} após a transferência de células CD4+ (\leftarrow) (B) e tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) (A) e área sob a curva (AUC) (C) calculada para a resposta vasodilatadora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste *t* de *Student* (entre os grupos WT) ou ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* (entre os grupos Rag1^{-/-}) e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; T: testosterona.



Figura 24. Resposta contrátil de anéis de aorta sem (controle, P-) e com PVAT (P+) de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) (A) ou Rag1^{-/-} após a transferência de células CD4+ (\leftarrow) (B) e tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A, B) e diferença da área sob a curva (Δ AUC) (C) calculada para a resposta vasoconstritora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste *t* de *Student* (entre os grupos WT) ou ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* (entre os grupos Rag1^{-/-}) e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; T: testosterona.

Participação do receptor para IL-17 na disfunção vascular induzida pela testosterona

A disfunção vascular induzida pela testosterona foi dependente de células T CD4+ (Fig. 23 e 24) e o tratamento hormonal promoveu aumento do perfil Th17 circulante (Fig. 15) e aumento da expressão de marcadores para essas células no tecido vascular nas fêmeas (Fig. 16 e 17). Assim, realizamos estudos de reatividade vascular em fêmeas deficientes em IL-17R funcionais (IL-17Ra^{-/-}) tratadas com testosterona, a fim de avaliarmos o papel desse receptor no dano vascular decorrente do tratamento hormonal, uma vez que a IL-17 é a principal citocina efetora do perfil Th17.

Primeiramente, avaliamos se o tratamento com a testosterona também foi capaz de induzir o fenótipo "masculino" nas fêmeas IL-17Ra^{-/-}. Exceto por não modificar a massa perigonadal (Fig. 25E), a testosterona promoveu aumento da massa corporal (Fig. 25C), da massa do músculo gastrocnêmico (Fig. 25F) e do IMC (Fig. 25D) nas fêmeas IL-17Ra^{-/-}, de forma similar aos achados observados nos animais WT. Após a avaliação fenotípica, avaliamos a função vascular nas fêmeas IL-17Ra^{-/-} após o tratamento com testosterona. A vasoconstrição induzida pela PE foi semelhante entre os grupos experimentais (AUC, em unidades arbitrárias: WT-V: 426,0 ± 17,9, n=6; WT-T: 484,2 ± 19,6, n=10; IL-17Ra^{-/-}-V: 394,1 ± 30,2, n=5; IL-17Ra^{-/-}-T: 421,7 ± 35,9, n=7). Diferente dos efeitos observados nos animais WT, nos animais deficientes para IL-17R funcionais, o tratamento com testosterona não foi capaz de induzir o prejuízo no relaxamento vascular dependente do endotélio (Fig. 26) ou aumento do efeito anticontrátil do PVAT (Fig. 27), evidenciando a participação da ativação desse receptor no processo da disfunção vascular induzida pela testosterona. Apesar desses resultados, observamos que os níveis de IL-17 circulantes não foram alterados após o tratamento com testosterona nas fêmeas WT (Fig. 28).



Figura 25. Ganho de massa corporal (A) e valores de IMC (B) de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou IL-17Ra^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. A massa corporal (C), o IMC (D), a massa da gordura perigonadal (E) e do músculo gastrocnêmico (F) também foram avaliados após o tratamento. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* dentre os grupos de fêmeas e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V. V: veículo; T: testosterona.



Figura 26. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou IL-17Ra^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) (A) e área sob a curva (AUC) (B) calculada para a resposta vasodilatadora. Os dados estão representados como média \pm EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; Testo: testosterona.



Figura 27. Resposta contrátil de anéis de aorta sem (controle, P-) e com PVAT (P+) de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou IL-17Ra^{-/-} durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A, B) e diferença da área sob a curva (Δ AUC) (C) calculada para a resposta vasoconstritora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; T: testosterona.



Figura 28. Concentrações séricas de IL-17 de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Amostras de soro de camundongos com psoríase induzida por Imiquimode (IMQ) foram utilizadas como controle positivo. Os dados estão representados como média ± EPM. V: veículo; T: testosterona.

Avaliação do papel de células T γδ na disfunção vascular induzida pela testosterona

Uma vez que células T $\gamma\delta$ também secretam IL-17 e estão envolvidas com a disfunção vascular associadas ao aumento da pressão arterial, investigamos se elas também participam da disfunção vascular induzida pela testosterona no nosso modelo. Como observado na figura 29, o tratamento de fêmeas WT com testosterona aumentou a frequência de células T IL-17A+ $\gamma\delta$ + e IFN- γ + $\gamma\delta$ + nos linfonodos desses animais, sugerindo um amento na população circulante de células T $\gamma\delta$ produtoras dessas citocinas.

Em seguida, avaliamos a função vascular de fêmeas TCR $\delta^{-/-}$, que não possuem células T $\gamma\delta$, após o tratamento com testosterona. Primeiramente, verificamos se a testosterona induziu o fenótipo "masculino" também nos animais TCR $\delta^{-/-}$. Como observado nos animais WT, o tratamento com testosterona também aumentou a massa corpórea (Fig.

30C), do músculo gastrocnêmico (Fig. 30F) e o IMC (Fig. 30D), porém não modificou a massa da gordura perigonadal (Fig. 30E). Em termos de função vascular, o tratamento com testosterona nos animais TCR $\delta^{-/-}$ promoveu prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio (Fig. 31) e intensificou o efeito anticontrátil do PVAT (Fig. 32), de forma semelhante ao observado em animais WT. Esses resultados sugerem que, de fato, células T CD4+, e não células $\gamma\delta$, participam da disfunção vascular induzida pela testosterona no modelo de hormonização. Não houve diferença na vasoconstrição à PE na ausência do PVAT entre os grupos experimentais (AUC, em unidades arbitrárias: WT-V: 426,0 ± 17,9, n=6; WT-T: 484,2 ± 19,6, n=10; TCR $\delta^{-/-}$ -V: 536,0 ± 48,6, n=6; TCR $\delta^{-/-}$ -T: 520,4 ± 44,2, n=8).



Figura 29. Perfil de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17A ou IFN- γ de linfonodos (A, B) ou baço (C, D) de camundongos C57BL/6J fêmeas tratadas com veículo ou testosterona por 8 semanas. Histogramas representativos (A, C) e frequência (B, D) de células T $\gamma\delta$ positivas para os marcadores IL-17A ou IFN- γ . Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por teste *t* de *Student* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V. V: veículo; T: testosterona.



Figura 30. Ganho de massa corporal (A) e valores de IMC (B) de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou TCR $\delta^{-/-}$ durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. A massa corporal (C), o IMC (D), a massa da gordura perigonadal (E) e do músculo gastrocnêmico (F) também foram avaliados após o tratamento. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* dentre os grupos de fêmeas e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo V. V: veículo; T: testosterona.



Figura 31. Vasodilatação dependente do endotélio em anéis de aorta de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou TCR $\delta^{-/-}$ durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) (A), área sob a curva (AUC) (B) e a diferença das AUC (Δ AUC) (C) calculadas para a resposta vasodilatadora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; Testo: testosterona.



Figura 32. Resposta contrátil de anéis de aorta sem (controle, P-) e com PVAT (P+) de camundongos fêmeas W*ild Type* (WT) ou TCR $\delta^{-/-}$ durante o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A, B) e diferença da área sob a curva (Δ AUC) (C) calculada para resposta vasoconstritora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo veículo. V: veículo; T: testosterona.

Participação da iNOS no aumento do efeito anticontrátil do PVAT induzido pela testosterona

Uma vez que o aumento do efeito anticontrátil do PVAT induzido pela testosterona foi dependente de mecanismos pró-inflamatórios e que o NO é um dos principais agentes anticontráteis liberados por esse tecido, avaliamos a participação da iNOS sobre o efeito induzido pelo tratamento com hormonal sobre o PVAT. Para isso, em anéis de aorta de fêmeas WT tratadas com testosterona, a vasoconstrição foi avaliada na ausência (controle) ou presença do inibidor seletivo para iNOS, 1400W (1 µmol/L). Como observado na figura 33, a inibição da iNOS foi capaz de reverter o aumento do efeito anticontrátil do PVAT em vasos de fêmeas tratadas com testosterona, sugerindo a participação dessa enzima nesse processo.





Figura 33. Resposta contrátil de anéis de aorta sem (P-, controle) e com PVAT (P+) de camundongos fêmeas C57BL/6J na presença de veículo (controle) e do inibidor seletivo para óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (1400W, 1 μ mol/L) após o tratamento com veículo ou testosterona por 8 semanas. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A, B) e diferença da área sob a curva (Δ AUC) (C) calculada para resposta vasoconstritora. Os dados estão representados como média ± EPM. As diferenças estatísticas foram avaliadas por ANOVA de duas-vias seguida pelo teste de *Tukey* e indicadas quando *p*<0,05. * *vs.* respectivo controle.



DISCUSSÃO

A terminologia utilizada no campo de pesquisas voltadas à população transgênero sofre constantes adaptações. No nosso trabalho, adotamos termos emergentes de acordo com o contexto histórico e aspectos socioculturais e políticos nos quais esse documento foi publicado. Utilizamos o termo "transmasculino" ao invés de "homem transgênero/sexual", de modo a abarcar outras identidades masculinas para além do espectro binário homemmulher, relacionadas a aspectos subjetivos de comportamentos sociais, expressões de gênero e autoidentidade. De forma semelhante, os termos "terapia hormonal cruzada" ou "hormonoterapia", utilizados para designar o uso hormonal por pessoas transgênero, foi substituído por "hormonização", uma vez que esses termos estão associados a aspectos pejorativos devido ao uso da palavra "terapia", que denota o reparo de processos em desordem ou patológicos. É importante ressaltar que o termo "transexualismo", utilizado anteriormente como diagnóstico para desordem psiguiátrica, foi abolido e atualmente a incongruência de gênero, que nem sempre é vivenciada por indivíduos transgênero, é descrita como condição relacionada à identidade de gênero conforme publicado na 11ª edição da Classificação Internacional de Doenças (CID-11) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2021).

Uma parte dos indivíduos transgênero buscam os serviços de saúde para assistência ao processo de transição de gênero. No Brasil, o chamado "processo transexualizador" foi regulamentado pelo Ministério da Saúde no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) através das Portarias GM/MS 1707 revogada pela 2803 de 2013 (BRASIL, 2013), e 457 de 2008 (BRASIL, 2008); garantindo suporte aos indivíduos que optam pela realização desse processo. A hormonização com testosterona é uma das principais abordagens utilizadas na transição de gênero para pessoas transmasculinas, o que está diretamente associado à melhora da saúde mental e qualidade de vida nesses indivíduos (ROWNIAK; BOLT; SHARIFI, 2019). Apesar da assistência oferecida, uma parcela expressiva dos indivíduos transmasculinos que fazem uso da testosterona realiza esse procedimento sem supervisão médica, aumentando a incidência de efeitos indesejados decorrentes da hormonização. Esse quadro é observado principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, onde a oferta de serviços de saúde para essa população é ainda mais escassa (GOOREN et al., 2015). Embora o número de estudos voltados para população transgênero tenha aumentado nos últimos anos, a falta de trabalhos que investigam aspectos biológicos específicos dessa população está diretamente relacionada à falta de serviços ou direcionamento inadequado aos serviços de saúde oferecidos (SWEILEH, 2018). Nesse sentido, estudos pré-clínicos tornam-se essenciais na elucidação de diversos aspectos biológicos envolvidos em diferentes processos vivenciados por pessoas transgênero, incluindo o processo da hormonização.

No nosso trabalho, propomos um modelo murino de hormonização com o propósito de mimetizar, ao menos em parte, a utilização da testosterona e algumas das principais observações clínicas na população transmasculina. O tratamento com testosterona aumentou a concentração sérica do hormônio nas fêmeas a níveis semelhantes aos observados nos machos (Tabela 1). Em pessoas transmasculinas, um dos parâmetros farmacológicos utilizados para ajustes individuais nos protocolos de hormonização é o monitoramento dos níveis circulantes de testosterona, os quais podem alcançar, na maioria dos casos, níveis semelhantes aos observados em homens cisgênero saudáveis (HEMBREE et al., 2017). Assim, nossos resultados atendem a um primeiro critério de validação para o modelo. O efeito anabólico da testosterona é um dos mais desejados por pessoas transmasculinas, sendo o aumento da massa muscular e redução da massa adiposa fatores que contribuem de forma crucial para o aumento da massa corpórea nesses indivíduos (IRWIG, 2017). No nosso trabalho, o tratamento de fêmeas com testosterona promoveu essas mesmas mudanças na composição corporal (Fig. 2), contribuindo para aumento do IMC a níveis semelhantes aos observados nos machos (Fig. 1). Assim, a

eficácia da indução do fenótipo "masculino/masculinizante" pelo tratamento com testosterona foi confirmada. De modo interessante, apesar do aumento da massa do músculo gastrocnêmico induzido pela testosterona, verificamos que os valores obtidos foram inferiores aos observado nos machos, sugerindo um limitado efeito anabólico desse hormônio. Entretanto, esses resultados corroboram observações em humanos, como descrito por Nokoff e colaboradores (2020), onde a hormonização de homens transgênero aumentou a massa muscular em relação a mulheres cisgênero, mas não ao mesmo nível observado em homens cisgênero.

Os efeitos dos hormônios androgênicos sobre organismos de sexo feminino são amplamente investigados utilizando diferentes modelos experimentais. Apesar disso, estudos com a proposta de estabelecer modelos específicos para processo de hormonização com a testosterona seguindo critérios específicos têm sido publicados apenas recentemente. Goetz e colaboradores (2017) relataram pela primeira vez uma dessas propostas, onde o tratamento de camundongos fêmeas ovariectomizadas com testosterona não alterou a composição corporal depois de 6 ou 10 semanas de tratamento, apesar do aumento dos níveis hormonais circulantes. A testosterona também não modificou a massa corporal em fêmeas no modelo proposto por Kinnear e colaboradores (2019). Para esses modelos, a dose de testosterona utilizada foi menor e não ajustada em função do aumento de massa corporal dos animais durante o período de tratamento, diferentemente da abordagem utilizada no nosso trabalho. Além disso, a ausência de grupos de animais do sexo masculino como controles fenotípicos nos estudos citados impossibilita a mimetização do processo de hormonização utilizada em humanos, dadas as peculiaridades de cada espécie. Assim, esses fatores podem explicar as diferenças dos efeitos induzidos pela testosterona observadas entre os modelos. Corroborando nossos achados (Fig. 3A e B), ratas tratadas com testosterona apresentaram maior ganho de massa corporal em relação a ratas ou ratos controle, no modelo proposto por Lichtenecker e colaboradores (2021).

Um dos fatores associados às diferenças sexuais observadas no sistema cardiovascular deve-se à ação dos hormônios androgênicos. Estudos apontam que, *in vivo*, a testosterona exerce um efeito deletério na vasculatura, o que está associado ao processo fisiopatológico de diferentes doenças cardiovasculares. Apesar de a hormonização acarretar em alterações cardiovasculares na população transmasculina (GOOREN; WIERCKX; GILTAY, 2014), ainda não existe um consenso se tais efeitos estão necessariamente associados à maior incidência de doenças cardiovasculares nessa população (IRWIG, 2017). Como já discutido, parte da discrepância entre as informações relatadas na literatura, deve-se à interpretação equivocada dos efeitos da testosterona sobre organismos femininos em outros contextos, onde há aumento dos níveis circulantes do hormônio. Além disso, a maior parte dos estudos avalia apenas os efeitos biológicos desencadeados pela hormonização em indivíduos transmasculinos por um período relativamente curto da administração hormonal. Poucos trabalhos investigam o impacto desse procedimento a longo prazo, principalmente sob o ponto de vista cardiovascular (GOOREN; T'SJOEN, 2018; STANHEWICZ; WENNER; STACHENFELD, 2018)

No nosso trabalho, o tratamento com testosterona reduziu a vasodilatação dependente do endotélio, intensificou o efeito anticontrátil do PVAT e, a longo prazo, aumentou a pressão arterial nas fêmeas. Nossos resultados reproduzem achados clínicos, onde a hormonização com testosterona reduz a função endotelial e aumenta a pressão arterial em homens transgênero (GOOREN; WIERCKX; GILTAY, 2014; GULANSKI et al., 2020). A nível experimental, o prejuízo das funções cardiovasculares induzido por hormônios androgênicos em fêmeas em diferentes modelos também é observado. Em modelo de reposição hormonal na pós-menopausa, a testosterona reduz a vasodilatação dependente do endotélio de ratas por aumento do estresse oxidativo vascular (COSTA et
al., 2015). O aumento da pressão arterial induzido por andrógenos em fêmeas também foi relatado por outros autores (CHEN; MENG, 1991; COLBY; SKELTON; BROWNIE, 1970; RECKELHOFF; ZHANG; GRANGER, 1998; SINGH; SCHWARTZMAN, 2008). Já em modelos experimentais de hormonização, Goetz e colaboradores (2018) demonstraram que a testosterona aumenta a deposição de placas ateroscleróticas em fêmeas propensas à aterosclerose (ApoE^{-/-}) independentemente da dieta.

De modo interessante, após o regime de longo prazo, apenas fêmeas tratadas com testosterona apresentaram aumento da pressão arterial (Fig. 6) em relação aos machos (Fig. 9), apesar de ambos apresentarem os mesmos níveis circulantes do hormônio (tabela 1) e redução da vasodilatação dependente do endotélio (Fig. 4 e 7). Estudos recentes do nosso laboratório demonstraram que o tratamento de camundongos com doses suprafisiológicas de testosterona induz disfunção vascular por indução de mecanismos inflamatórios (ALVES et al., 2020). É importante notar que, embora os objetivos fenotípicos tenham sido alcançados, o tratamento das fêmeas com testosterona no nosso modelo as expõe a níveis suprafisiológicos de testosterona, evidenciando a importância da avaliação dos efeitos desse hormônio entre machos e fêmeas dentro de uma faixa crítica de concentração.

Além da hormonização, durante o processo de transição de gênero, outras abordagens também podem ser adotadas de acordo com os anseios e condições clínicas do indivíduo transgênero. Dentre elas destacam-se procedimentos cirúrgicos, uma vez que a sua realização melhora significativamente o bem-estar mental e a qualidade de vida desses indivíduos (COLE et al., 1997). Para a população transmasculina, a mastectomia, histerectomia e salpingo-ovariectomia são alguns dos procedimentos cirúrgicos mais procurados (HADJ-MOUSSA et al., 2019).

Poucos trabalhos investigam o impacto da associação de diferentes procedimentos adotados durante o processo de transição de gênero. Uma vez que os ovários são a principal fonte de estrógenos, no nosso modelo investigamos se a ovariectomia exerceu algum impacto sobre os efeitos induzidos pela testosterona. Verificamos que a cirurgia não alterou o fenótipo "masculino" promovido pelo tratamento hormonal (Fig. 11). Sobre a função vascular, observamos que a ovariectomia por si reduziu o relaxamento vascular dependente do endotélio (Fig. 12), reproduzindo achados prévios descritos por outros autores em diferentes modelos (COSTA et al., 2015; KEANEY et al., 1994). No nosso trabalho, a redução do relaxamento vascular induzido pela testosterona foi mais acentuada nas fêmeas castradas em relação às intactas (Fig. 12). Esses achados corroboram os resultados descritos por Ciccone e colaboradores (2017), que demonstraram que, em indivíduos transgênero sob hormonização, a retirada das gônadas piora a função endotelial e aumenta a espessura da parede vascular, fatores que contribuem adicionalmente para a disfunção vascular.

No nosso trabalho, apesar de reduzir a vasodilatação dependente do endotélio, a ovariectomia não potencializou o efeito de redução da resposta à ACh induzido pela testosterona (Fig. 12C). Um dos pontos cruciais no metabolismo da testosterona refere-se à sua conversão a estradiol pela ação da enzima aromatase, expressa em diferentes tecidos. Diversos estudos apontam essa conversão como um importante mecanismo dos efeitos benéficos da testosterona sobre o sistema cardiovascular. Animais deficientes para expressão da aromatase (Ar^{-/-}) apresentam disfunção endotelial (KIMURA et al., 2003) e, em células endoteliais humanas, a redução da expressão de VCAM-1 em resposta à testosterona é dependente de sua conversão a estradiol (MUKHERJEE et al., 2002).

Ye e Leung (2008) verificaram que que o tratamento de fêmeas com andrógenos aumenta a atividade da aromatase em tecidos extragonadais. Assim, mesmo com o aumento dos níveis circulantes de testosterona (tabela 1) e indução do fenótipo "masculino" (Fig. 11), confirmando a eficácia do tratamento com a testosterona nas fêmeas OVX, a conversão de parte desse hormônio a estradiol (tabela 2) pode resultar em efeitos vasoprotetores, em contraponto às ações deletérias desencadeadas pela testosterona. Corroborando essa ideia, a administração de baixas doses de estradiol reduz a deposição de placas ateroscleróticas e a gravidade da lesão no modelo de hormonização proposto por Goetz e colaboradores (2018). Além disso, homens transgênero que fazem uso da testosterona apresentam uma correlação positiva entre os níveis séricos de estradiol e parâmetros vasoprotetores (BUNCK et al., 2006).

A interação entre os sistemas imunológico e cardiovascular tem sido alvo de ampla investigação, o que contribui para o entendimento de diferentes processos fisiopatológicos, fornecendo importantes mecanismos como potenciais alvos terapêuticos. No nosso trabalho, o tratamento com testosterona não promoveu disfunção vascular nas fêmeas deficientes em células T e B (Fig. 19 e 20) e a transferência de células T CD4+ restaurou os efeitos deletérios sobre a vasculatura (Fig. 23 e 24), evidenciando o papel crucial dessas células no dano vascular que precede o aumento da pressão arterial induzida por andrógenos. Esses resultados corroboram estudos prévios que demonstram a participação crucial de células T em processos fisiopatológicos no sistema cardiovascular.

Guzik e colaboradores (2007) demonstraram pela primeira vez que células T e B são fundamentais para o desenvolvimento da hipertensão induzido pela Ang II e para as complicações associadas, como a disfunção endotelial decorrente do recrutamento vascular de leucócitos. Em outros modelos experimentais de hipertensão, as células T são fundamentais para o aumento da pressão arterial e lesão em diferentes órgãos-alvo (MARVAR et al., 2012; TIPTON; BABAN; SULLIVAN, 2012). Como importantes mediadoras da resposta imunológica celular, um dos principais mecanismos efetores das células T CD4+ é o recrutamento de células do sistema imunológico inato, intensificando o processo inflamatório local. Em um estudo recente publicado por lannantuoni e colaboradores (2021), foi verificado que a testosterona aumenta a interação entre leucócitos polimorfonucleares e as células endoteliais, e os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias de fase aguda em homens transgênero. Assim, células T CD4+ podem estar relacionadas ao dano vascular mediado pelo sistema imunológico observado nessa população.

Diferentes estudos mostram uma clara influência de fatores sexuais sobre o papel de células T no processo fisiopatológico cardiovascular. A transferência de células T provenientes de machos WT para camundongos machos Rag1^{-/-} restaura a resposta pressora induzida pela infusão com Ang II por 14 dias. Quando a transferência ocorre para fêmeas, elas permanecem resistentes ao aumento da pressão arterial. Por outro lado, quando as células T são provenientes de fêmeas WT, a hipertensão induzida pela Ang II é abolida nos animais Rag1^{-/-} independentemente do sexo (JI et al., 2014; POLLOW et al., 2014). Esses trabalhos sugerem, portanto, que fatores sexuais atuam tanto de forma sistêmica quanto diretamente nas células T, influenciando o seu papel nos efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular. Em contraste, no nosso modelo verificamos que a disfunção vascular induzida pela testosterona ocorreu nas fêmeas Rag1^{-/-}, mesmo após a transferência das células CD4+ provenientes de fêmeas WT (Fig. 23 e 24). Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato que, em nossa abordagem, o tempo de exposição ao estímulo androgênico hipertensivo foi consideravelmente maior, sendo esse um importante fator modulatório sobre a função da célula T. Corroborando essa ideia, o aumento de células T efetoras em órgãos-alvo ocorre em ratos SHR em relação a ratas após 13 semanas de vida, o que não é observado com 5 semanas (SULLIVAN; GILLIS, 2017).

O rearranjo gênico mediado pela enzima Rag é de fundamental importância não apenas para o desenvolvimento e maturação de células T, mas também para células B. Assim, animais Rag1^{-/-} são deficientes para ambas as células e suas subpopulações. Células T CD8+ e células B também possuem um importante papel no desenvolvimento no

aumento da pressão arterial e dano vascular associado à hipertensão (CHAN et al., 2015; TROTT et al., 2014). Dessa forma, nos nossos achados é possível que a disfunção vascular induzida pela testosterona também seja mediada, pelo menos em parte, por essas células.

Existe uma clara relação entre o eixo Th17-IL-17-IL-17R e as doenças cardiovasculares. Pacientes com doenças autoimunes dependentes da IL-17 como a artrite reumatoide e psoríase apresentam maior risco cardiovascular (KHRAISHI et al., 2014; PANOULAS et al., 2007). Por outro lado, pacientes hipertensos possuem maior número de células Th17 circulantes (ITANI et al., 2016) e existe uma correlação positiva entre os níveis séricos de IL-17 e o aumento da pressão arterial em indivíduos pré-hipertensos (YAO et al., 2015). Em modelos experimentais, a hipertensão arterial induzida pela Ang II é atenuada e a disfunção endotelial é abolida em camundongos deficientes para IL-17 (IL-17^{-/-}) (MADHUR et al., 2010).

No nosso estudo, embora não tenhamos detectado diferenças entre as concentrações séricas de IL-17 (Fig. 28), verificamos que o tratamento com a testosterona nas fêmeas WT aumentou os níveis circulantes de células Th17 (Fig. 15), a expressão gênica de RORγt na aorta (Fig. 16A) e no PVAT (Fig. 16B), e a fosforilação da STAT3 (Y⁷⁰⁵) na aorta desses animais (Fig. 17A). Além disso, fêmeas deficientes para o IL-17R (IL-17Ra^{-/-}) tiveram a função vascular preservada após o tratamento hormonal (Fig. 24 e 25). Esses resultados corroboram estudos prévios que sugerem que fatores sexuais masculinos contribuem para a diferenciação do perfil efetor Th17 e seus efeitos deletérios sobre o sistema cardiovascular. Tipton e colaboradores (2012) verificaram que a presença de marcadores para células Th17 é maior no tecido renal de ratos SHR quando comparados a fêmeas. Além disso, apenas machos demonstram a participação de células Th17 no dano cardíaco em modelo de miocardite induzido por vírus (LI; YUE; XIONG, 2013). Em contraste, o estrógeno inibe a liberação da IL-17 por linfócitos (WANG et al., 2009) e reverte os efeitos deletérios mediado por células Th17 no tecido ósseo (TYAGI et al., 2012).

Um dos principais alvos de investigação acerca do envolvimento da IL-17 nos processos fisiopatológicos do sistema cardiovascular diz respeito à fonte de liberação dessa citocina (HIGAKI et al., 2021). Apesar das diferenças nos mecanismos de ativação e sinalização, aspectos da resposta efetora de células T γδ são semelhantes àqueles observados pela resposta imunológica celular mediada por células T CD4+. Nesse sentido, analogamente ao perfil Th17, a liberação da IL-17 por células T γδ exerce um papel fundamental no recrutamento de outras células imunológicas, incluindo neutrófilos e outras células T CD4+, inclusive no contexto cardiovascular (CHIEN; MEYER; BONNEVILLE, 2014). Em camundongos hipertensos por infusão de Ang II, ocorre aumento da população de células T γδ produtoras de IL-17 na aorta e rins desses animais, o que contribui para a lesão nesses órgãos-alvo (SALEH; NORLANDER; MADHUR, 2016).

No nosso trabalho, observamos que a testosterona aumentou a população de células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17 circulantes (Fig. 29). Apesar disso, o tratamento com testosterona promoveu disfunção vascular nas fêmeas deficientes em células T $\gamma\delta$ (TCR $\delta^{-/-}$), de modo semelhante ao observado nas fêmeas WT (Fig. 28 e 29). Esses dados reforçam que, no nosso modelo, a disfunção vascular induzida pela testosterona é mediada, de fato, por células Th17. De modo interessante, Schüler e colaboradores (2019) demonstraram que a IL-17 proveniente de células T CD4+ induz disfunção vascular por redução da biodisponibilidade do NO e fibrose perivascular, corroborando os nossos achados que mostram que essas células, e não células T $\gamma\delta$, contribuem para a disfunção vascular induzida pela testosterona.

O fato de os efeitos vasculares induzidos pela testosterona serem dependentes de células T CD4+, e não de células T $\gamma\delta$, sugere que o tratamento induz a geração de "neoantígenos" que podem ser o gatilho de respostas imunológicas deletérias sobre o sistema vascular. De fato, através de uma refinada abordagem *in vivo*, Hevia e colaboradores (2018) demonstraram que a presença de células dendríticas, uma das

principais APC, é essencial para o aumento da pressão arterial e hipertrofia cardíaca decorrentes da hipertensão induzida por Ang II. Diversos autores sugerem diferentes mecanismos relacionados à geração desses neoantígenos, dentro os quais destaca-se o estresse oxidativo.

Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a investigar os diferentes mecanismos pelos quais a testosterona prejudica a função vascular. Em células do músculo liso vascular, a testosterona aumenta a produção de ERO, sendo esse efeito mais evidente quando as células são provenientes de animais hipertensos (CHIGNALIA et al., 2012). *In vivo*, o aumento do estresse oxidativo vascular induzido pela testosterona está relacionado com a disfunção endotelial (ALVES et al., 2020) e é crucial para a permeabilidade e recrutamento de neutrófilos (CHIGNALIA et al., 2015). Dessa forma, os danos vasculares mediados pelas células T CD4+ induzidos pela testosterona observados no nosso modelo pode estar associado ao aumento do estresso oxidativo. Sustentando essa ideia, estudos demonstram que a superexpressão de proteínas com modificações oxidativas em células T participam do processo de hipertensão mediado por essas células (KIRABO et al., 2014; PONS et al., 2013). Além disso, as células T possuem um papel fundamental no dano vascular e no desenvolvimento da hipertensão em animais com superexpressão da enzima NADPH oxidase (principal fonte de ERO na vasculatura) nas células do músculo liso vascular, (WU et al., 2015).

Diversos estudos descrevem uma importante influência de fatores sexuais sobre a função do PVAT e sua repercussão sobre a vasculatura. A ovariectomia reduz a vasodilatação mediada pelo PVAT em artérias mesentéricas por aumento do estresse oxidativo (WANG et al., 2014a) e, após a menopausa, ocorre maior recrutamento de células inflamatórias para o PVAT em mulheres cisgênero (KRALOVA LESNA et al., 2016), demonstrando o papel protetor dos hormônios sexuais femininos sobre a função do PVAT. Por outro lado, poucos trabalhos investigam a ação dos hormônios androgênicos sobre o

PVAT e seus efeitos vasculares, principalmente em comparação simultânea entre os dois sexos (VICTORIO et al., 2020).

No nosso trabalho, a vasoconstrição na presença do PVAT foi menor em vasos provenientes de fêmeas sob o tratamento hormonal (Fig. 5), sugerindo que a testosterona parece intensificar o efeito anticontrátil do PVAT. De fato, machos também apresentaram maior efeito anticontrátil do PVAT quando comparado a fêmeas (Fig. 8). Apesar disso, Boydens e colaboradores (2016) não observaram diferenças no papel do PVAT sobre a contração de vasos obtidos de machos castrados ou intactos, sugerindo que a função do PVAT não é alterada sob concentrações fisiológicas de testosterona em machos. Entretanto, como já mencionado, no nosso trabalho as concentrações circulantes de testosterona obtidas após o tratamento alcançaram níveis suprafisiológicos para as fêmeas e, sob essas condições, a testosterona exerce efeitos deletérios sobre a vasculatura (ALVES et al., 2020). Essas diferenças reforçam a necessidade no avanço dos estudos acerca das diferenças sexuais sobre o sistema cardiovascular sob um rigoroso critério de concentrações hormonais administradas e/ou obtidas nos diferentes modelos experimentais.

A influência do PVAT sobre a vasculatura tem sido cada vez mais alvo de investigações, uma vez que as alterações funcionais nesse tecido desempenham um importante papel no processo fisiopatológico de diversas doenças cardiovasculares (SCHEJA; HEEREN, 2019). Além da função de liberar agentes vasoativos, o PVAT também atua como um "depósito" para células do sistema imunológico. Fisiologicamente, a presença de células de caráter anti-inflamatório mantém o equilíbrio metabólico e das funções endócrinas do PVAT. Entretanto, no contexto fisiopatológico, a mudança fenotípica e/ou o recrutamento de células pró-inflamatórias contribuem de forma essencial para o dano vascular (GUZIK et al., 2017; NOSALSKI; GUZIK, 2017). De fato, verificamos que o tratamento com testosterona aumentou a expressão gênica de RORyt (Fig. 16) e proteica

da p-STAT3 (Y⁷⁰⁵) (Fig. 17) na vasculatura das fêmeas tratadas, marcadores sugestivos para células Th17, sugerindo um recrutamento dessas células para esse tecido.

No nosso trabalho, o aumento do efeito anticontrátil do PVAT induzido pela testosterona foi dependente de células T CD4+ (Fig. 24), IL-17R (Fig. 27) e mediado, pelo menos em parte, pela iNOS (Fig. 33), demonstrando uma importante contribuição de mecanismos inflamatórios nesse processo. Corroborando nossos resultados, Mikolajczyk e colaboradores (2016) observaram que, em camundongos tratados com Ang II, ocorre aumento no recrutamento de células T para o PVAT, levando ao aumento do estresse oxidativo nesse tecido, o que contribui para a disfunção endotelial. O envolvimento da iNOS na disfunção do PVAT também é observado em outros contextos. A hiperatividade da iNOS no PVAT está relacionada à hipocontratilidade vascular em modelo experimental de sepse (AWATA et al., 2019).

O perfil Th17 tem como principal mecanismo efetor a liberação da IL-17 que, por interação com o seu receptor, desencadeia efeitos pró-inflamatórios por diferentes mecanismos, dentre eles o recrutamento de células mieloides (KORN et al., 2009). Nesse sentido, a síntese de NO pela iNOS é descrita como um importante mecanismo efetor de células como macrófagos e neutrófilos no combate a infecções e/ou no desenvolvimento do processo inflamatório (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000). Assim, no nosso modelo experimental, é possível que o recrutamento de células inflamatórias mediado por células Th17 esteja relacionado ao aumento na quantidade de NO liberado pelo PVAT, intensificando seu efeito anticontrátil. Corroborando essa ideia, a testosterona aumentou a expressão gênica para CCL2, importante fator quimiotático para células mieloides, e citocinas de fase aguda no tecido adiposo de mulheres cisgênero em idade reprodutiva (CRISOSTO et al., 2017).



CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que o tratamento de fêmeas com testosterona aumenta a pressão arterial, evento precedido por disfunção vascular, caracterizada por alterações nas respostas do PVAT e vasodilatação dependente do endotélio. Estes efeitos em modelo experimental de hormonização ocorrem independentemente de ovariectomia, e estão relacionados à ativação do eixo Th17-IL-17-IL-17R.

Esperamos, com esse enfoque, fornecer informações importantes para otimização do processo de hormonização realizado por pessoas transmasculinas, a fim de diminuir o risco cardiovascular para essa população.



REFERÊNCIAS

- ALVES, J. V. et al. Supraphysiological Levels of Testosterone Induce Vascular Dysfunction via Activation of the NLRP3 Inflammasome. Frontiers in Immunology, v. 11, 31 jul. 2020.
- AMADOR, C. A. et al. Spironolactone Decreases DOCA–Salt–Induced Organ Damage by Blocking the Activation of T Helper 17 and the Downregulation of Regulatory T Lymphocytes. Hypertension, v. 63, n. 4, p. 797–803, abr. 2014.
- ASHRAF, M. S.; VONGPATANASIN, W. Estrogen and hypertension. Current Hypertension Reports, v. 8, n. 5, p. 368–376, set. 2006.
- AWATA, W. M. C. et al. Perivascular adipose tissue contributes to lethal sepsis-induced vasoplegia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 863, p. 172706, 15 nov. 2019.
- BASSIL, N.; ALKAADE, S.; MORLEY E, J. The benefits and risks of testosterone replacement therapy: a review. Therapeutics and Clinical Risk Management, v. 5, n. 1, p. 427–448, jun. 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 457/SAS de 19/08/2008. Regulamenta o Processo Transexualizador no SUS. **Diário Oficial da União**, DF, 20 ago, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 2.803/GM, de 19/11/2013. Redefine e amplia o Processo Transexualizador no Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial da União, DF, 20 nov, 2013.
- BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2018 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137, n. 12, p. E67–E492, 20 mar. 2018.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Reviews**, v. 173, n. 1, p. 17–26, fev. 2000.
- BOMFIM, G. F. et al. Hypertension: a new treatment for an old disease? Targeting the immune system. **British Journal of Pharmacology**, 31 jul. 2018.
- BOYDENS, C.; PAUWELS, B.; VAN DE VOORDE, J. Effect of resveratrol and orchidectomy on the vasorelaxing influence of perivascular adipose tissue. **Heart and Vessels**, v. 31, n. 4, p. 608–615, 1 abr. 2016.
- BOYNTON, R. E.; TODD, R. L. Blood pressure readings of 75,258 university students.

Archives of internal medicine (Chicago, III.: 1908), v. 80, n. 4, p. 454–62, out. 1947.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.
- BUBB, K. J.; KHAMBATA, R. S.; AHLUWALIA, A. Sexual dimorphism in rodent models of hypertension and atherosclerosis. British Journal of Pharmacology, v. 167, n. 2, p. 298–312, set. 2012.
- BUNCK, M. C. M. et al. The effects of the aromatase inhibitor anastrozole on bone metabolism and cardiovascular risk indices in ovariectomized, androgen-treated femaleto-male transsexuals. European Journal of Endocrinology, v. 154, n. 4, p. 569–575, abr. 2006.
- BURGER, H. G. Androgen production in women. **Fertility and Sterility**, v. 77, p. 3–5, 15 abr. 2002.
- BURT, V. L. et al. Prevalence of Hypertension in the US Adult Population. **Hypertension**, v. 25, n. 3, p. 305–313, mar. 1995.
- CAILLON, A. et al. γδ T Cells Mediate Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Injury. **Circulation**, v. 135, n. 22, p. 2155–2162, 30 maio 2017.
- CAMERON, A. C.; LANG, N. N.; TOUYZ, R. M. Drug Treatment of Hypertension: Focus on Vascular Health. **Drugs**, v. 76, n. 16, p. 1529–1550, 26 out. 2016.
- CEBALLOS, G. et al. Acute and Nongenomic Effects of Testosterone on Isolated and Perfused Rat Heart. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 33, n. 5, p. 691– 697, maio 1999.
- CHAN, C. T. et al. Obligatory Role for B Cells in the Development of Angiotensin II– Dependent Hypertension. **Hypertension**, v. 66, n. 5, p. 1023–1033, 1 nov. 2015.
- CHEN, Y.-F.; MENG, Q.-C. Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent. Life Sciences, v. 48, n. 1, p. 85–96, jan. 1991.
- CHIEN, Y.; MEYER, C.; BONNEVILLE, M. γδ T Cells: First Line of Defense and Beyond. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 121–155, 21 mar. 2014.

CHIGNALIA, A. Z. et al. Testosterone Induces Vascular Smooth Muscle Cell Migration by

NADPH Oxidase and c-Src–Dependent Pathways. **Hypertension**, v. 59, n. 6, p. 1263– 1271, jun. 2012.

- CHIGNALIA, A. Z. et al. Testosterone induces leucocyte migration by NADPH oxidasedriven ROS- and COX2-dependent mechanisms. Clinical Science, v. 129, n. 1, p. 39– 48, 1 jul. 2015.
- CICCONE, M. M. et al. Surgical and pharmacological reassignment: influence on transsexual cardiovascular risk profile. **Internal Medicine Journal**, v. 47, n. 11, p. 1255–1262, nov. 2017.
- COLBY, H. D.; SKELTON, F. R.; BROWNIE, A. C. Testosterone-Induced Hypertension in the Rat. **Endocrinology**, v. 86, n. 5, p. 1093–1101, maio 1970.
- COLE, C. M. et al. Comorbidity of gender dysphoria and other major psychiatric diagnoses. Archives of sexual behavior, v. 26, n. 1, p. 13–26, fev. 1997.
- COSTA, T. J. et al. Association of testosterone with estrogen abolishes the beneficial effects of estrogen treatment by increasing ROS generation in aorta endothelial cells.
 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 308, n. 7, p. H723–H732, abr. 2015.
- CRISOSTO, N. et al. Testosterone increases CCL-2 expression in visceral adipose tissue from obese women of reproductive age. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 444, p. 59–66, mar. 2017.
- CROFTON, J. T.; SHARE, L. Gonadal Hormones Modulate Deoxycorticosterone-Salt Hypertension in Male and Female Rats. **Hypertension**, v. 29, n. 1, p. 494–499, jan. 1997.
- CUPISTI, S. et al. The impact of testosterone administration to female-to-male transsexuals on insulin resistance and lipid parameters compared with women with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 7, p. 2647–2653, dez. 2010.
- DEATH, A. K. et al. Dihydrotestosterone Promotes Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Male Human Endothelial Cells via a Nuclear Factor-κB-Dependent Pathway. **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1889–1897, abr. 2004.
- DELANEY, J. A. C. et al. Natural killer cells, gamma delta T cells and classical monocytes are associated with systolic blood pressure in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 21, n. 1, p. 45, 22 dez. 2021.

- DOS SANTOS, R. L. et al. Sex hormones in the cardiovascular system. Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation, v. 18, n. 2, p. 89–103, 1 jan. 2014.
- DUBEY, R. et al. Sex hormones and hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 53, n. 3, p. 688–708, 15 fev. 2002.
- GAFFEN, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 8, p. 556–567, 3 ago. 2009.
- GILTAY, E. J. et al. In Vivo Effects of Sex Steroids on Lymphocyte Responsiveness and Immunoglobulin Levels in Humans. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 85, n. 4, p. 1648–1657, abr. 2000.
- GOETZ, L. G. et al. Addition of Estradiol to Cross-Sex Testosterone Therapy Reduces Atherosclerosis Plaque Formation in Female ApoE-/- Mice. Endocrinology, v. 159, n. 2, p. 754–762, 1 fev. 2018.
- GOETZ, T. G. et al. Cross-sex testosterone therapy in ovariectomized mice: addition of lowdose estrogen preserves bone architecture. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 313, n. 5, p. E540–E551, 1 nov. 2017.
- GOOREN, L. J. et al. Cross-sex hormone use, functional health and mental well-being among transgender men (Toms) and Transgender Women (Kathoeys) in Thailand. Culture, Health and Sexuality, v. 17, n. 1, p. 92–103, 2 jan. 2015.
- GOOREN, L. J.; GILTAY, E. J. Men and women, so different, so similar: observations from cross-sex hormone treatment of transsexual subjects. **Andrologia**, v. 46, n. 5, p. 570– 575, jun. 2014.
- GOOREN, L. J.; T'SJOEN, G. Endocrine treatment of aging transgender people. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 19, n. 3, p. 253–262, 19 set. 2018.
- GOOREN, L. J.; WIERCKX, K.; GILTAY, E. J. Cardiovascular disease in transsexual persons treated with cross-sex hormones: reversal of the traditional sex difference in cardiovascular disease pattern. **European Journal of Endocrinology**, v. 170, n. 6, p. 809–819, jun. 2014.
- GUANIZO, A. C. et al. STAT3: a multifaceted oncoprotein. **Growth Factors**, v. 36, n. 1–2, p. 1–14, 4 mar. 2018.
- GUIDELINES FOR PSYCHOLOGICAL PRACTICE WITH TRANSGENDER AND GENDER NONCONFORMING PEOPLE. American Psychologist, v. 70, n. 9, p. 832–864, 1 dez.

2015.

- GULANSKI, B. I. et al. Compromised endothelial function in transgender men taking testosterone. **Clinical Endocrinology**, v. 92, n. 2, p. 138–144, 13 fev. 2020.
- GUZIK, T. J. et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II–induced hypertension and vascular dysfunction. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 10, p. 2449– 2460, 1 out. 2007.
- GUZIK, T. J. et al. The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovascular Research**. v. 113, n. 9, p. 1001-1023, 1 jul. 2017.
- HADJ-MOUSSA, M. et al. Masculinizing Genital Gender Confirmation Surgery. **Sexual Medicine Reviews**, v. 7, n. 1, p. 141–155, 1 jan. 2019.
- HARRISON-BERNARD, L. M.; SCHULMAN, I. H.; RAIJ, L. Postovariectomy Hypertension Is Linked to Increased Renal AT1 Receptor and Salt Sensitivity. Hypertension, v. 42, n. 6, p. 1157–1163, dez. 2003.
- HEMBREE, W. C. et al. Endocrine Treatment of Gender-Dysphoric/Gender-Incongruent Persons: An Endocrine Society* Clinical Practice Guideline. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 102, n. 11, p. 3869–3903, 1 nov. 2017.
- HEVIA, D. et al. Myeloid CD11c + Antigen-Presenting Cells Ablation Prevents Hypertension in Response to Angiotensin II Plus High-Salt Diet. Hypertension, v. 71, n. 4, p. 709– 718, abr. 2018.
- HIGAKI, A. et al. Role of interleukin-23/interleukin-17 axis in T-cell-mediated actions in hypertension. **Cardiovascular Research**, v. 117, n. 5, p. 1274–1283, 23 abr. 2021.
- IANNANTUONI, F. et al. Testosterone administration increases leukocyte-endothelium interactions and inflammation in transgender men. **Fertility and Sterility**, v. 115, n. 2, p. 483–489, 1 fev. 2021.
- IRWIG, M. S. Testosterone therapy for transgender men. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 5, n. 4, p. 301–311, 1 abr. 2017.
- ITANI, H. A. et al. Activation of Human T Cells in Hypertension. **Hypertension**, v. 68, n. 1, p. 123–132, 1 jul. 2016.
- IVANOV, I. I. et al. The Orphan Nuclear Receptor RORγt Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121–1133, set. 2006.

- JI, H. et al. Sex-Specific T-Cell Regulation of Angiotensin II–Dependent Hypertension. **Hypertension**, v. 64, n. 3, p. 573–582, set. 2014.
- KAPIL, V. et al. Inorganic Nitrate Supplementation Lowers Blood Pressure in Humans. **Hypertension**, v. 56, n. 2, p. 274–281, ago. 2010.
- KEANEY, J. F. et al. 17β-Estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits lowdensity lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. **Circulation**, v. 89, n. 5, p. 2251–2259, 1994.
- KHRAISHI, M. et al. Prevalence of cardiovascular risk factors in patients with psoriatic arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 10, p. 1495–1500, 18 out. 2014.
- KIMURA, M. et al. Impaired Acetylcholine-Induced Release of Nitric Oxide in the Aorta of Male Aromatase-Knockout Mice. Circulation Research, v. 93, n. 12, p. 1267–1271, 12 dez. 2003.
- KINNEAR, H. M. et al. A mouse model to investigate the impact of testosterone therapy on reproduction in transgender men. **Human Reproduction**, v. 34, n. 10, p. 2009–2017, 2 out. 2019.
- KIRABO, A. et al. DC isoketal-modified proteins activate T cells and promote hypertension. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 10, p. 4642–4656, 1 out. 2014.
- KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 485– 517, abr. 2009.
- KRALOVA LESNA, I. et al. Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue. Journal of Translational Medicine, v. 14, n. 1, p. 208, 11 dez. 2016.
- LI, Z.; YUE, Y.; XIONG, S. Distinct Th17 inductions contribute to the gender bias in CVB3induced myocarditis. **Cardiovascular Pathology**, v. 22, n. 5, p. 373–382, set. 2013.
- LICHTENECKER, D. C. K. et al. Cross-sex testosterone therapy modifies the renal morphology and function in female rats and might underlie increased systolic pressure.
 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, v. 48, n. 7, p. 978–986, 8 jul. 2021.
- LUCKHEERAM, R. V. et al. CD4 + T Cells: Differentiation and Functions. Clinical and Developmental Immunology, v. 2012, n. 9, p. 1–12, 2012.

- MADHUR, M. S. et al. Interleukin 17 Promotes Angiotensin II–Induced Hypertension and Vascular Dysfunction. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 500–507, fev. 2010.
- MARVAR, P. J. et al. T Lymphocytes and Vascular Inflammation Contribute to Stress-Dependent Hypertension. **Biological Psychiatry**, v. 71, n. 9, p. 774–782, 1 maio 2012.
- MATSUDA, K. et al. Testosterone increases thromboxane A₂ receptor density and responsiveness in rat aortas and platelets. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 267, n. 3, p. H887–H893, 1 set. 1994.
- MESSERLI, F. H. et al. Disparate cardiovascular findings in men and women with essential hypertension. **Annals of Internal Medicine**, v. 107, n. 2, p. 158–161, 1 ago. 1987.
- MIKOLAJCZYK, T. P. et al. Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. The FASEB Journal, v. 30, n. 5, p. 1987–1999, 12 maio 2016.
- MUKHERJEE, T. K. et al. Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: Implications in atherosclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 99, n. 6, p. 4055–4060, 19 mar. 2002.
- NEGRO-VILAR, A. Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs): A Novel Approach to Androgen Therapy for the New Millennium. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 84, n. 10, p. 3459–3462, out. 1999.
- NILSSON, S. et al. Mechanisms of Estrogen Action. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 4, p. 1535–1565, 10 jan. 2001.
- NOKOFF, N. J. et al. Body Composition and Markers of Cardiometabolic Health in Transgender Youth Compared With Cisgender Youth. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 105, n. 3, p. e704–e714, 1 mar. 2020.
- NOSALSKI, R.; GUZIK, T. J. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 20, p. 3496–3513, out. 2017.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. ICD.HOW.INT, versão 05/2021. ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics. Disponível em ">https://icd.who.int/browse11/l-m/en>. Acesso em: 04 de outubro de 2021.

PANOULAS, V. F. et al. Prevalence and associations of hypertension and its control in

patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 46, n. 9, p. 1477–1482, 27 jun. 2007.

- PAUL, S.; SHILPI; LAL, G. Role of gamma-delta (γδ) T cells in autoimmunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 2, p. 259–271, fev. 2015.
- PELUSI, C. et al. Effects of Three Different Testosterone Formulations in Female-to-Male Transsexual Persons. The Journal of Sexual Medicine, v. 11, n. 12, p. 3002–3011, 1 dez. 2014.
- PETERING, R. C.; BROOKS, N. A. Testosterone Therapy: Review of Clinical Applications Physiology of Testosterone and Causes of Hypogonadism in Males. American Family Physician, v. 96, n. 7, p. 441–449, 2017.
- PETI, A. P. F. et al. High-resolution multiple reaction monitoring method for quantification of steroidal hormones in plasma. Journal of Mass Spectrometry, v. 53, n. 5, p. 423–431, 1 maio 2018.
- PLATTEN, M. et al. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, n. 35, p. 14948–14953, 1 set. 2009.
- POLLOW, D. P. et al. Sex Differences in T-Lymphocyte Tissue Infiltration and Development of Angiotensin II Hypertension. **Hypertension**, v. 64, n. 2, p. 384–390, ago. 2014.
- PONS, H. et al. Immune reactivity to heat shock protein 70 expressed in the kidney is cause of salt-sensitive hypertension. American Journal of Physiology-Renal Physiology, v. 304, n. 3, p. F289–F299, 1 fev. 2013.
- RAMIREZ, L. A.; SULLIVAN, J. C. Sex Differences in Hypertension: Where We Have Been and Where We Are Going. American Journal of Hypertension, v. 31, n. 12, p. 1247– 1254, 13 nov. 2018.
- RAZMARA, A.; KRAUSE, D. N.; DUCKLES, S. P. Testosterone augments endotoxinmediated cerebrovascular inflammation in male rats. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 289, n. 5, p. H1843–H1850, nov. 2005.
- RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; GRANGER, J. P. Testosterone Exacerbates Hypertension and Reduces Pressure-Natriuresis in Male Spontaneously Hypertensive

Rats. **Hypertension**, v. 31, n. 1, p. 435–439, jan. 1998.

- REISNER, S. L. et al. Global health burden and needs of transgender populations: a review. **The Lancet**, v. 388, n. 10042, p. 412–436, jul. 2016.
- RODRIGUEZ-ITURBE, B.; PONS, H.; JOHNSON, R. J. Role of the Immune System in Hypertension. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 3, p. 1127–1164, jul. 2017.
- ROWNIAK, S.; BOLT, L.; SHARIFI, C. Effect of cross-sex hormones on the quality of life, depression and anxiety of transgender individuals. JBI Database of Systematic Reviews and Implementation Reports, v. 17, n. 9, p. 1826–1854, 1 set. 2019.
- SALEH, M. A.; NORLANDER, A. E.; MADHUR, M. S. Inhibition of Interleukin-17A, But Not Interleukin-17F, Signaling Lowers Blood Pressure, and Reduces End-Organ Inflammation in Angiotensin II–Induced Hypertension. JACC: Basic to Translational Science, v. 1, n. 7, p. 606-616, dez. 2016.
- SANDBERG, K.; JI, H.; HAY, M. Sex-specific immune modulation of primary hypertension. **Cellular Immunology**, v. 294, n. 2, p. 95–101, abr. 2015.
- SCHEJA, L.; HEEREN, J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 9, p. 507–524, 11 set. 2019.
- SCHÜLER, R. et al. T Cell-Derived IL-17A Induces Vascular Dysfunction via Perivascular Fibrosis Formation and Dysregulation of · NO/cGMP Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–15, 18 jul. 2019.
- SINGH, H.; SCHWARTZMAN, M. L. Renal vascular cytochrome P450-derived eicosanoids in androgen-induced hypertension. **Pharmacological reports : PR**, v. 60, n. 1, p. 29– 37, 2008.
- SJÖGREN, K. et al. Body Fat Content Can Be Predicted In Vivo in Mice Using a Modified Dual-Energy X-Ray Absorptiometry Technique. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 11, p. 2963–2966, 1 nov. 2001.
- SOLTIS, E. E.; CASSIS, L. A. Influence of Perivascular Adipose Tissue on Rat Aortic Smooth Muscle Responsiveness. Clinical and Experimental Hypertension. Part A: Theory and Practice, v. 13, n. 2, p. 277–296, 3 jan. 1991.

SPIZZIRRI, G. et al. Proportion of people identified as transgender and non-binary gender

in Brazil. Scientific Reports, v. 11, n. 1, p. 2240, 26 dez. 2021.

- STANHEWICZ, A. E.; WENNER, M. M.; STACHENFELD, N. S. Sex differences in endothelial function important to vascular health and overall cardiovascular disease risk across the lifespan. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, v. 315, n. 6, p. H1569–H1588, dez. 2018.
- SULLIVAN, J. C.; GILLIS, E. E. Sex and gender differences in hypertensive kidney injury.
 American Journal of Physiology-Renal Physiology, v. 313, n. 4, p. F1009–F1017, out. 2017.
- SWEILEH, W. M. Bibliometric analysis of peer-reviewed literature in transgender health (1900 – 2017). BMC International Health and Human Rights, v. 18, n. 1, p. 16, 21 dez. 2018.
- TIPTON, A. J.; BABAN, B.; SULLIVAN, J. C. Female spontaneously hypertensive rats have greater renal anti-inflammatory T lymphocyte infiltration than males. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 303, n. 4, p. R359–R367, 15 ago. 2012.
- TROTT, D. W. et al. Oligoclonal CD8 + T Cells Play a Critical Role in the Development of Hypertension. **Hypertension**, v. 64, n. 5, p. 1108–1115, 1 nov. 2014.
- TYAGI, A. M. et al. Estrogen Deficiency Induces the Differentiation of IL-17 Secreting Th17 Cells: A New Candidate in the Pathogenesis of Osteoporosis. PLoS ONE, v. 7, n. 9, p. e44552, 10 set. 2012.
- UNAIDS. unaids.org, c2021. Documents, Prevention gap report, 11 July 2016. Disponível em < https://www.unaids.org/en/resources/documents/2016/prevention-gap>. Acesso em: 04 de outubro de 2021.
- VICTORIO, J. A. et al. Modulation of Vascular Function by Perivascular Adipose Tissue: Sex Differences. Current Pharmaceutical Design, v. 26, n. 30, p. 3768–3777, 4 set. 2020.
- WANG, C. et al. Oestrogen modulates experimental autoimmune encephalomyelitis and interleukin-17 production via programmed death 1. Immunology, v. 126, n. 3, p. 329– 335, mar. 2009.
- WANG, D. et al. Endothelial Dysfunction and Enhanced Contractility in Microvessels From Ovariectomized Rats. **Hypertension**, v. 63, n. 5, p. 1063–1069, maio 2014a.

- WANG, Y. et al. Total testosterone quantitative measurement in serum by LC-MS/MS. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 263–267, 25 set. 2014b.
- WHITE, F. N.; GROLLMAN, A. Autoimmune factors associated with infarction of the kidney. **Nephron**, v. 1, p. 93–102, 1964.
- WINTER, S. et al. Transgender people: health at the margins of society. **The Lancet**, v. 388, n. 10042, p. 390–400, jul. 2016.
- WU, C.-C. et al. Androgen-Dependent Hypertension Is Mediated by 20-Hydroxy-5,8,11,14 Eicosatetraenoic Acid–Induced Vascular Dysfunction. Hypertension, v. 57, n. 4, p. 788–794, abr. 2011.
- WU, J. et al. Immune activation caused by vascular oxidation promotes fibrosis and hypertension. **Journal of Clinical Investigation**, v. 126, n. 1, p. 50–67, 23 nov. 2015.
- WUNDERLICH, F. et al. Testosterone signaling in T cells and macrophages. **Steroids**, v. 67, n. 6, p. 535–538, maio 2002.
- XU, J. et al. Estrogen improved metabolic syndrome through down-regulation of VEGF and HIF-1α to inhibit hypoxia of periaortic and intra-abdominal fat in ovariectomized female rats. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 8, p. 8177–8185, 9 ago. 2012.
- YAO, W. et al. Elevated Serum Level of Interleukin 17 in a Population With Prehypertension. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 17, n. 10, p. 770–774, 1 out. 2015.
- YE, L.; LEUNG, L. K. Effect of dioxin exposure on aromatase expression in ovariectomized rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 229, n. 1, p. 102–108, 15 maio 2008.

Anexo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS





CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "Avaliação da disfunção vascular induzida pelo tratamento com testosterona em fêmeas: função de células T CD4+", registrado com o número 079/2019, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 27 de maio de 2019.

Este Protocolo prevê a utilização de 240 camundongos Rag-1 -/- fêmeas pesando 18g e 120 camundongos AT1aR -/- fêmeas pesando 18g oriundos oriundos dos Laboratórios Jackson (EUA); 70 camundongos C57Bl 6 machos pesando 20g e 250 camundongos C57Bl 6 fêmeas pesando 18g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 27/05/2019 a 28/02/2021.

We certify that the Protocol n° 079/2019, entitled "Evaluation of vascular dysfunction induced by testosterone in female mice: the role of CD4+ T cells" is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 05/27/2019. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans) for research purposes, and includes the use of 240 female Rag-1 -/- mice weighing 18g and 120 female AT1aR -/- mice weighing 18g from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA); 70 male C57Bl 6 mice weighing 20g and 250 female C57Bl 6 mice weighing 18g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 02/28/2021.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP - Brasil -14049-900 - Tel.: (16) 3315-3301 / 3315-3275 - e-mail: ceua@/mrp.usp.br

Ribeirão Preto, 27 de maio de 2019 Alun Afans Jordão Juno: Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior Vice-Coordenador da CEUA-FMRP - USP

de.