



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA



Papel da resistina via CAP1 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em modelo experimental de artrite reumatoide

ALINE GARCIA FEDOCE

Ribeirão Preto
2022

ALINE GARCIA FEDOCE

Papel da resistina via CAP1 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em modelo experimental de artrite reumatoide

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

Ribeirão Preto 2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Fedoce, Aline Garcia

Papel da resistina via CAP1 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em modelo experimental de artrite reumatoide; orientadora Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia; 2022, 97 p.: il.; 30 cm.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022. Área de concentração: Farmacologia.

1.Artrite Reumatoide. 2.Resistina. 3.Disfunção do PVAT. 4. Disfunção vascular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Aline Garcia Fedoce

Título: Papel da resistina via CAP1 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em modelo experimental de artrite reumatoide.

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

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia

APROVADO em: 13/12/2022

Banca Examinadora

Examinadora: Suplente: Votante
Nome: Prof. Dra. Michele Mazzaron de Castro
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FMRP-USP

Examinador: Titular: Votante
Nome: Prof. Dr. Luiz Guilherme Siqueira Branco
Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, de São Paulo, FORP-USP

Examinador: Titular: Votante
Nome: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier
Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS

Examinadora: Presidente: Não votante
Nome: Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, FMRP-USP

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus companheiros de laboratório, técnicos e professores que tornaram a execução deste estudo possível!

Agradecimento

Primeiramente, gostaria de agradecer as agências de fomento que possibilitaram a realização deste trabalho e auxílio com a bolsa de estudo concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho também foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o processo número 2019/24921-4.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Prof^ª. Rita Tostes, no qual sempre proporcionou todo o suporte necessário para a execução deste trabalho, sejam eles materiais, profissionais ou até mesmo emocionais. Durante esta jornada, sempre demonstrou com muita humanidade o caminho da orientação e do sentido de construir o pensamento científico crítico.

Agradeço também ao Prof. Mitchell A Lazar e ao Prof. Anthony Bonavia por gentilmente cederem os animais nocautes do estudo. Além, da equipe de importação do CRID e USP que auxiliaram no manejo dos animais.

A Prof^ª Ana Paula Dantas por ter me recebido por um período em seu laboratório no *August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute* (IDIBAPS), Barcelona, Espanha. Muito obrigada por compartilhar tanto conhecimento e proporcionar experiências incríveis e compartilhar o laboratório com Francisco, Aline, Ana, Marta, entre tantos.

Além disso, pude encontrar pessoas que me auxiliaram tecnicamente, cientificamente e pessoalmente a construir este trabalho. Ao Flávio Protássio, que sempre me motivou e acreditou na execução deste trabalho. Ao Marcos Rosa por tantas noites de citometria, muito aprendizado e amizade. A Ayda, por sempre auxiliar nas questões relacionadas a doença do estudo. A Mirelle por sempre ser amiga de laboratório e pessoal, ajudando no que fosse necessário. As outras pessoas que contribuíram para executar e além disso, tornar a ciência compartilhável. Meu muito obrigada, Isadora, Edismauro e Josiane por tantos ensinamentos. Obrigada aos Professores José Carlos F. Alves Filho e Fernando Cunha pelo suporte técnico.

Aos meus companheiros de laboratório, muito obrigada por tornarem essa jornada mais leve agradável, agradeço por tantos anos compartilhados Mirelle, Juliano, Rafael, Daniel, Teles, Carla, Paula, Aleksander, Teles, Julio, Cintia, Josiane, Tiago, Simone, Jeimison e demais colegas. Ao apoio técnico da Carla Pavan, por sempre auxiliar em tudo que fosse solicitado, incluindo o cuidado dos animais e ao bom funcionamento do laboratório. Ao apoio técnico da Giuliana, por contribuir na

realização dos experimentos. Ao Prof. Fernando Carneiro por compartilhar seu laboratório.

Agradecimento aos demais técnicos do Departamento de Farmacologia, Orlando e Eleni. Em especial, a Gislaine e Ramón por serem tão solícitos e eficientes na resolução de questões burocráticas. A Prof^a Leandra Ramalho e a técnica Deisy. A técnica da clínica médica, Livia e ao Caio, obrigada por tudo. Agradeço também a pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma possibilitaram e auxiliaram a executar este trabalho.

A minha melhor amiga Wanessa Awata, que iniciamos juntas esta jornada de conhecimento e compartilhamos tantos momentos de superação, conquistas e amizade.

A minha família, por tantos anos de suporte. A minha mãe, que sempre acreditou que tudo é possível perante muito esforço e dedicação.

Ao meu noivo Andrés, que sempre me motivou e acompanhou esta jornada. Obrigada pelo seu companheirismo e amor. Além disso, obrigada por cuidar tão bem dos nossos gatinhos Chiqui, Ajo e Ramón.

Por fim, sou grata a Deus por permitir que tantas bênçãos, alegrias e pessoas incríveis fizessem parte desta jornada.

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências.
O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada. ”*

Albert Einstein

RESUMO

FEDOCE, A.G. Papel da resistina via CAP1 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em modelo experimental de artrite reumatoide. 97 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Doenças cardiovasculares (DCV) são a maior causa de mortalidade na artrite reumatoide (AR). A inflamação crônica promove a disfunção do tecido adiposo perivascular (PVAT), resulta na perda do seu efeito anti-contrátil e contribui para as DCV. A adipocina resistina via receptores para proteína associada a adenilato ciclase 1 (CAP1) em monócitos/macrófagos promove inflamação do tecido adiposo com aumento da liberação de quimioquinas e recrutamento de macrófagos, eventos intimamente associados à disfunção do PVAT. Além disso, as concentrações circulantes e sinoviais de resistina estão aumentadas na AR. Portanto, neste estudo testamos a hipótese que a resistina via CAP1 contribui para a disfunção do PVAT, pelo aumento de mediadores inflamatórios e recrutamento misto de macrófagos na vasculatura, em modelo experimental de artrite induzida por antígeno (AIA). Camundongos nocautes para a resistina murina ($RTN^{-/-}$), camundongos que não expressam resistina murina, mas que expressam resistina humana em monócitos e macrófagos ($hRTN^{+/-}$) e respectivos controles, machos e fêmeas, ([Wild type: (WT) C57bl/6]) foram submetidos a AIA, em modelo crônico com 2 imunizações seguido de 5 injeções intra-articulares. Parâmetros de avaliação da AIA incluindo frequência de células T CD4+ e interleucina-17 (IL-17) nos linfonodos, diâmetro articular, hipernocicepção mecânica e escore histopatológico não diferiram entre os grupos $RTN^{-/-}$, $hRTN^{+/-}$ e WT. Na imunização, o PVAT ainda manteve seu efeito anti-contrátil, avaliado em resposta à fenilefrina (FE) e vasodilatação à acetilcolina (ACh). Entretanto, na AIA o PVAT perdeu completamente o efeito anti-contrátil, independentemente do endotélio, e a resposta vasodilatadora a ACh, em machos e fêmeas WT, foi comprometida, de modo independente do PVAT. A potência ao nitroprussiato de sódio (NPS) também foi menor nas artérias com PVAT de animais WT AIA. A expressão da resistina aumentou no PVAT e soro de animais WT AIA. A incubação com resistina murina ou resistina humana gerou disfunção do PVAT em animais WT e $hRTN^{+/-}$, similar ao observado na AIA. Ademais, animais $RTN^{-/-}$ AIA foram protegidos da disfunção do PVAT, enquanto animais $hRTN^{+/-}$ AIA perderam o efeito anti-contrátil similar ao observado em WT AIA. Não houve diferenças morfológicas em artérias ou adipócitos entre os grupos com AIA. A expressão gênica de marcadores de macrófagos do tipo 1 (M1) e do tipo 2 (M2) foi mais pronunciada em animais $hRTN^{+/-}$ AIA comparados aos WT AIA, $RTN^{-/-}$ AIA e

controle. As concentrações proteicas de marcadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-6 e IL-10 foram maiores no grupo hRTN^{+/-} AIA em comparação ao WT AIA, RTN^{-/-} AIA e controle. Entretanto, a deleção da resistina, grupo RTN^{-/-} AIA, preveniu o aumento destes marcadores inflamatórios no PVAT. A ICAM1 e IL-17 estavam aumentadas no plasma de animais WT AIA e hRTN^{+/-} AIA em comparação aos grupos controle e RTN^{-/-} AIA. Demonstramos também que a expressão gênica de mediadores macrófagos M1 e M2 estava com aumento exacerbado no PVAT dos animais hRTN^{+/-} AIA. O número absoluto de M1 (F4/80⁺CD11c⁺) aumentou no PVAT de animais WT, RTN^{-/-}, hRTN^{+/-} com AIA em comparação ao controle WT. Porém, o número absoluto de M2 (F4/80⁺CD206⁺) aumentou somente nos grupos WT AIA e hRTN^{+/-} AIA em comparação ao controle WT. A expressão de CAP1 foi maior nos M1 e M2 dos animais hRTN^{+/-} AIA comparada àquela aos demais grupos do estudo. Desta forma, concluímos que a resistina humana possivelmente via CAP1 promove disfunção do PVAT pelo aumento misto de macrófagos M1 e M2 e pela amplificação de mediadores inflamatórios, contribuindo assim para a disfunção vascular na AIA.

Palavras-chave: artrite reumatoide, resistina, disfunção do PVAT, disfunção vascular.

ABSTRACT

FEDOCE, A.G. Role of resistin via CAP1 in the vascular changes mediated by the perivascular adipose tissue in an experimental model of rheumatoid arthritis. 97 p. Thesis (Ph.D. in Pharmacology) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2022.

Cardiovascular diseases (CVD) are the major cause of mortality in rheumatoid arthritis (RA). Chronic inflammation results in perivascular adipose tissue (PVAT) dysfunction, i.e. loss of its anti-contractile effect, leading to CVD. The adipokine resistin, via receptors for adenylate cyclase-associated protein 1 (CAP1) on monocytes/macrophages, promotes adipose tissue inflammation with increased chemokines release and macrophage recruitment, events associated with PVAT dysfunction. In addition, circulating and synovial concentrations of resistin are increased in RA. Therefore, in this study, we tested the hypothesis that resistin via CAP1 contributes to PVAT and vascular dysfunction by increasing macrophage recruitment and inflammatory mediators, in an experimental model of antigen-induced arthritis (AIA). Murine resistin knockout mice ($RTN^{-/-}$) and mice that do not express murine resistin but express human resistin on monocytes/macrophages ($hRTN^{+/+}$) and their respective controls [Wild type: (WT) C57bl/6], male and female, underwent a chronic AIA model with 2 immunizations followed by 5 intra-articular injections. AIA assessment parameters, including the frequency of $CD4^{+}$ T cells and interleukin-17 (IL-17) in lymph nodes, joint diameter, pain hypernociception, and the histopathological score, did not differ between the $RTN^{-/-}$, $hRTN^{+/+}$, and WT groups. PVAT still kept its anti-contractile effect, determined in response to contractions to phenylephrine (PE) and acetylcholine (ACh). However, in WT AIA, males and females, the PVAT completely lost its anti-contractile effect, independently of the endothelium, and no longer kept the vasodilatory response to ACh, which was independent on the PVAT. The potency of sodium nitroprusside (NPS) was decreased in arteries with PVAT from WT AIA mice. Resistin expression increased in the PVAT, and serum of WT AIA animals. Incubation of arteries with murine or human resistin lead to PVAT dysfunction in WT and $hRTN^{+/+}$ animals, similar to the observed in AIA. Furthermore, $RTN^{-/-}$ AIA animals were protected from PVAT dysfunction, while $hRTN^{+/+}$ AIA animals lost the PVAT anti-contractile effect similar to WT AIA. There were no differences in the morphological aspects of arteries and adipocytes between the AIA groups. Gene expression of M1 and M2 macrophages' markers was greater in $hRTN^{+/+}$ AIA animals compared to WT AIA and $RTN^{-/-}$ AIA mice. Protein concentration of the inflammatory markers TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-6, and IL-10 were higher in the $hRTN^{+/+}$ AIA group compared to the WT AIA, $RTN^{-/-}$ AIA, and control. However, resistin deletion, $RTN^{-/-}$ AIA mice, prevented the

increase of these inflammatory markers in the PVAT. Plasma concentrations of ICAM1 and IL-17 were increased in WT AIA and hRTN^{+/-} AIA groups compared to control and RTN^{-/-}AIA. Gene expression of M1 and M2 macrophages markers increased in the PVAT of hRTN^{+/-} AIA animals. The absolute number of M1 (F4/80⁺CD11c⁺) increased WT, RTN^{-/-}, hRTN^{+/-} compared to the WT control. However, the absolute number of M2 (F4/80⁺CD206⁺) increased only in WT AIA and hRTN^{+/-} AIA, compared to RTN^{-/-} AIA and control. CAP1 expression was higher in M1 and M2 from hRTN^{+/-} AIA animals compared to the other groups. Therefore, we conclude that human resistin likely via CAP1 promotes PVAT dysfunction by increasing M1 and M2 and amplifying inflammatory mediators, resulting in vascular dysfunction in AIA.

Keywords: rheumatoid arthritis, resistin, PVAT dysfunction, vascular dysfunction

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar
Akt	proteína quinase B
Ang II	angiotensina II
ANOVA	análise de variância
AUC	área sob a curva
AIA	artrite induzida por antígeno
APCs	células apresentadoras de antígenos
BH ₄	tetraidrobiopterina
mBSA	albumina de soro bovino
Ca ²⁺	cálcio
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cAMP	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CAP1	receptor de proteína associada a adenilato ciclase 1
CCL2	proteína quimioatraente de monócitos 1
CCL3	proteína inflamatória de macrófagos 1-alfa
CCL5	ligante de quimiocina 5
CD4	grupamento de diferenciação 4
CD8	grupamento de diferenciação 8
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CD206	receptor de manose de macrófago
CD11C	integrina alfa x
CFA	adjuvante completo de Freund
CMLV	células de músculo liso vascular
CSF2	fator estimulador de colônias 2

CO ₂	dióxido de carbono
Ct	ciclo threshold
DA	diâmetro articular
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
E.P.M.	erro padrão da média
EC ₅₀	concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo
EDCF	fatores contráteis derivados do endotélio
EDH	hiperpolarização derivada do endotélio
EDHF	fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
E _{max}	efeito máximo
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EBPβ	proteína beta de ligação potencializada
Erk1/2	quinase regulada por sinal extracelular
EROs	espécies reativas de oxigênio
ET-1	endotelina-1
FE	fenilefrina
g	grama
GAPDH	glicerol-3-fosfato desidrogenase
HE	hematoxilina & eosina
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
H ₂ S	sulfeto de hidrogênio
HUVECs	células endoteliais da veia umbilical humana
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10

IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-18	interleucina 18
IL-17	interleucina 17
IL-23	interleucina 23
IL-33	interleucina 33
IL-1 β	interleucina-1 beta
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
JNK	quinases N-terminais c-Jun
K ⁺	potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato monobásico de potássio
L-NAME	L-arginina metil éster
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1/CCL2	proteína 1 quimiotática de monócitos
Mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
MHCII	complexoprincipal de histocompatibilidade de classe II
ml	mililitro
mm	milímetro
mN	milinewton
NaCl	cloreto de sódio
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaH ₂ PO ₄	fosfato de sódio monobásico
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
ng	nanogramas

NF-κB	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
NPS	nitroprussiato de sódio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
O ₂	oxigênio
PCR	proteína C reativa
pEC ₅₀ máximo	logaritmo negativo da concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito
PKC	proteína quinase C
PKA	proteína quinase A
PPAR _γ	receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama
PVAT	tecido adiposo perivascular
PVRF	fatores relaxantes derivados do PVAT
RELMs	moléculas do tipo resistina
Retn	resistina
Retnla	resistina do tipo alfa
Retnlb	resistina do tipo beta
Retnlg	resistina do tipo gama
RT-PCR	reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
RNA	ácido ribonucleico
ROR1	receptor órfão tipo tirosina quinase 1
SKH	solução Krebs-Henseleit
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
Th1	linfócitos T auxiliares 1
Th2	linfócitos T auxiliares 2
Th4	linfócitos T auxiliares 4
Th17	linfócito T auxiliar 17
T reg	linfócitos T auxiliares

Tiron	4,5-dihidroxi-ácido 1,3-benzenodisulfônico dissódico monohidratado
TLR-4	receptor Toll do tipo 4
TLRs	receptores do tipo Toll
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
U	unidade
URF	unidade relativa de fluorescência
URL	unidade relativa de luminescência
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VEGRF2	receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular-1
WT	tipo selvagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Possíveis mecanismos envolvidos na disfunção do PVAT promovendo DCV	26
Figura 2. Esquema representativo da hipótese do estudo	32
Figura 3. Esquema representativo de indução da AIA	38
Figura 4. Caracterização do modelo experimental de AIA	46
Figura 5. Parâmetros de caracterização da AIA não diferem entre WT machos e fêmeas, RTN ^{-/-} AIA, hRTN ^{+/-} AIA	47
Figura 6. A AIA promove disfunção do PVAT	50
Figura 7. O PVAT de animais machos e fêmeas está disfuncional na AIA	53
Figura 8. A resistina está aumentada em PVAT e plasma de animais AIA machos	55
Figura 9. A resistina promove disfunção do PVAT similar ao observado na AIA. A resistina murina promove suas ações via TLR4, enquanto a resistina humana não apresenta este efeito.	59
Figura 10. A resistina humana derivada de monócitos-macrófagos promove perda do efeito anti-contrátil do PVAT na AIA, enquanto a ausência da resistina murina reduz esses efeitos.	62
Figura 11. Artérias e PVAT não apresentam alterações morfológicas na AIA	64
Figura 12. Expressão genica de mediadores inflamatórios de M1 e M2 estão aumentados no PVAT na AIA e estão amplificados no grupo hRTN ^{+/-} AIA.	66
Figura 13. Mediadores inflamatórios e indicadores de M1 e M2 estão aumentados no PVAT na AIA e amplificados no grupo hRTN ^{+/-} AIA	68
Figura 14. Mediadores inflamatórios plasmáticos na AIA	70
Figura 15. Macrófagos M1 estão aumentados no PVAT dos grupos AIA, enquanto macrófagos M2 somente nos grupos WT AIA e hRTN ^{+/-} AIA, comparados ao controle	72
Figura 16. CAP1 está mais expresso em M1 e M2 do PVAT de animais hRTN ^{+/-} AIA	73
Figura 17. Esquema representativo da conclusão do estudo	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pares de <i>primers</i> utilizados para o ensaio de RT/PCR por SYBR™ Green	42
Tabela 2. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos WT, imunizados e AIA	49
Tabela 3. Valores de Emax e pEC50 para o relaxamento dependente de endotélio induzido por acetilcolina em aortas com PVAT e sem PVAT dos grupos WT, imunizados e AIA	49
Tabela 4. Valores de Emax e pEC50 para nitroprussiato de sódio em aortas com PVAT e sem PVAT dos grupos WT e AIA	49
Tabela 5. Valores de Emax e pEC50 para acetilcolina em aortas dos grupos WT fêmeas, AIA fêmeas e AIA machos	52
Tabela 6. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos WT fêmeas, AIA fêmeas e AIA machos	52
Tabela 7. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos WT e WT + Resistina	58
Tabela 8. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos TLR4 ^{-/-} e TLR4 ^{-/-} + Resistina	58
Tabela 9. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos hRTN ^{+/-} e hRTN ^{+/-} + Resistina	58
Tabela 10. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos RTN ^{+/-} e RTN ^{+/-} AIA	61
Tabela 11. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos hRTN ^{+/-} e hRTN ^{+/-} AIA	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. Artrite reumatoide e doenças cardiovasculares	23
1.2. O tecido adiposo perivascular na disfunção vascular na AR	24
1.3. (Dis)função do tecido adiposo perivascular e o perfil de macrófagos na artrite reumatoide	27
1.4. A adipocina pró-inflamatória resistina na artrite reumatoide	28
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	32
3. OBJETIVO GERAL	34
3.1. Objetivos Específicos	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Animais	37
4.2. Indução da AIA	37
4.3. Avaliação da AIA	39
4.4. Avaliação da função vascular	39
4.5. Análise da interação resistina/TLR4 via NF- κ B	40
4.6. Análise estrutural das aortas torácicas	40
4.7. RT-PCR para expressão gênica de resistina, CCL1 quimiocinas e citocinas	40
4.8. Dosagem das concentrações de citocinas e quimiocinas em animais com AIA	42
4.9. Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo	42
4.10. Análise estatística	43
5. RESULTADOS	44
5.1. Caracterização da artrite induzida por antígeno	45
5.2. Efeito da imunização na resposta vasoconstritora e vasodilatadora do PVAT	48
5.3. Efeito da AIA na resposta vasoconstritora e vasodilatadora do PVAT	48
5.4. Efeito da AIA no PVAT de camundongos fêmeas	51
5.5. Efeito da AIA nas concentrações de resistina murina no PVAT e plasma	54

5.6.	Efeito da resistina murina na função do PVAT e possível regulação via TLR4	56
5.7.	Efeito da resistina humana na função do PVAT e a participação do TLR4	57
5.8.	Efeito da resistina murina e humana na função do PVAT na AIA	60
5.9.	Efeito da resistina nas alterações morfológicas da aorta e PVAT AIA	63
5.10.	Efeito da resistina na expressão gênica de quimiocinas, citocinas e CAP1 no PVAT na AIA	65
5.11.	Efeito da resistina na concentração de quimiocinas, citocinas no PVAT na AIA	67
5.12.	Efeito da resistina na concentração de quimiocinas, citocinas no plasma	69
5.13.	Efeito da resistina na celularidade de leucócitos e macrófagos no PVAT	71
6.	DISCUSSÃO	74
7.	CONCLUSÃO	86
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
	ANEXO	97

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Artrite reumatóide e doenças cardiovasculares

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica nas articulações, de natureza autoimune com origem multifatorial, que resulta na destruição permanente das articulações, erosão óssea e complicações sistêmicas. O dano articular pode resultar em deformidades e incapacidade de realização de atividades diárias que afetam diretamente a qualidade de vida e promovem aumento na morbidade e mortalidade em comparação à população em geral. Fatores de risco genéticos e não-genéticos contribuem para o desenvolvimento da AR e são necessários antes que um limiar seja alcançado para desencadear a AR. Os fatores de susceptibilidade a AR incluem genes do antígeno de histocompatibilidade de classe II (HLA) de cadeia beta (DRB1HLA-DRB1), modificações epigenéticas, sexo feminino, cigarro, obesidade, exposição a sílica, agentes infecciosos, deficiência em vitamina D, mudanças na microbiota, entre outros (ALETAKHA & SMOLEN, 2018).

A progressão da AR envolve a ativação persistente e desregulada do sistema imunológico inato (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos) e adaptativo (células B e T) perda da imunotolerância com consequente produção exacerbada de auto-anticorpos, quimiocinas e citocinas. Adicionalmente, modificações proteicas como o aumento de citrulinização, carbamilação e acetilação com produção de neo-epítopos são reconhecidos pelo sistema imune adaptativo. As alterações imunológicas e proteicas podem ocorrer anos antes do início da inflamação sinovial e dos sinais e sintomas clínicos (CALABRESI *et al.*, 2018).

As células apresentadoras de antígenos reconhecem esses peptídeos alterados, ativam o sistema imune adaptativo nos linfonodos, geram auto-anticorpos, citocinas, quimiocinas, que perante estímulos (formação de imunocomplexos, ativação do sistema complemento) perpetuam e amplificam a ativação do sistema imune adaptativo. O aumento de citocinas, quimiocinas e rompimento da membrana vascular sinovial leva à amplificação e perpetuação do quadro crônico inflamatório da doença com destruição das cartilagens e ossos (TROUW *et al.*, 2017).

A prevalência da AR varia entre 0,3% a 1% na população mundial, com faixa etária entre 40 a 60 anos, e a incidência é três vezes maior em mulheres do que em homens (WHO, 2019). A AR representa um grave problema de saúde pública, no qual os danos progressivos, declínio funcional e o risco de comorbidades associam-se à redução da qualidade de vida, associado a um alto impacto econômico (MCINNES & SCHETT, 2011; FIRESTEIN *et al.*, 2003). No Brasil, a prevalência de AR foi estimada entre 0,2 e 1% (SENNA *et al.*, 2004).

O risco de mortalidade em pacientes com AR é 1,5 vezes maior que o da população geral. A maior taxa de mortalidade é atribuída a doenças cardiovasculares (DCV), que contabilizam 40% das mortes prematuras (DADOUN *et al.*, 2013; PROVAN *et al.*, 2020). Não obstante, a AR representa

um fator de risco independente para DCV e o risco de ter DCV como arteriosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, falência cardíaca e fibrilação atrial é duas vezes maior se comparado ao da população geral (ARGNANI *et al.*, 2021). Além disso, o risco de DCV na AR é comparado ao do diabetes mellitus, persistindo mesmo quando minimizados outros fatores de risco tradicionais (DEL RINCÓN *et al.*, 2001; VAN HALM *et al.*, 2009). Por exemplo, fatores de risco cardiovasculares tradicionais, tais como hipertensão, dislipidemia, sedentarismo, obesidade, tabagismo e inflamação crônica de baixo grau, apesar de contribuírem para a disfunção cardiovascular na AR, ainda são insuficientes para justificar a alta incidência de DCV nessa doença (VAN DEN HOEK *et al.*, 2017; ZEGKOS *et al.*, 2017).

1.2. O tecido adiposo perivascular na disfunção vascular na artrite reumatoide

A disfunção vascular precede e contribui para o desenvolvimento de DCV. A regulação da função vascular em resposta a mudanças fisiológicas é essencial para manter a homeostasia tecidual e função dos órgãos, evitando assim, lesão aos órgãos alvos e o desenvolvimento de DCV. O tecido adiposo perivascular (PVAT) desempenha papel importante na manutenção da função vascular e, conseqüentemente, a disfunção do PVAT contribui para a patogênese de DCV (GRIGORAS *et al.*, 2019).

A aorta torácica de roedores é circundada por tecido adiposo perivascular marrom (TAM) enquanto a aorta abdominal é circundada por uma mistura de tecido adiposo perivascular branco (TAB) e TAM, e as artérias mesentéricas são envoltas por TAB. O fenótipo do PVAT em camundongos e humanos depende da sua localização. Em humanos, o PVAT da artéria torácica e carótida tem características de TAM, enquanto artérias mesentéricas exibem PVAT do tipo TAB (BROWN *et al.*, 2014). O TAM é associado a termogênese devido à grande quantidade de mitocôndrias, ao passo que o TAB atua como um depósito lipídico com funções endócrinas, ambos sob controle do sistema nervoso simpático (HARMS *et al.*, 2013).

O PVAT contém adipócitos, pré-adipócitos, células-tronco mesenquimais, fibroblastos e células imunológicas (incluindo células dendríticas, monócitos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos), células endoteliais e nervos (MURPHY *et al.*, 2019). A funcionalidade do TAM contribui para menor acometimento da artrite induzida por colágeno (CIA), uma vez que o transplante deste tecido de um animal saudável para outro com artrite promove redução do escore da doença e de marcadores inflamatórios liberados pelo TAM (MOON *et al.*, 2021).

Os vasos sanguíneos são circundados por camada de gordura adventícia, o PVAT, inicialmente era considerado um depósito de gordura que promovia apoio mecânico vascular. Porém, nos últimos anos evidencia-se a contribuição do PVAT como um órgão endócrino, restringindo-se não somente a regulação do metabolismo energético e termorregulação, mas também para a regulação da função vascular em condições fisiológicas e patológicas. De suma importância,

o PVAT detecta sinais parácrinos vasculares e responde de maneira bidirecional pela liberação de fatores anti-contráteis, os fatores relaxantes derivados do PVAT (*PVAT-Derived Relaxing Factors* – PVRF) (HILDEBRAND *et al.*, 2018).

A descoberta da modulação do tono vascular, ou o efeito anti-contrátil, pelo PVAT ocorreu em 1991, por Soltis e Cassis, que demonstraram que a presença do PVAT em aortas diminuía a resposta contrátil à noradrenalina em comparação a artérias sem este tecido. Anos mais tarde, em 2002, Löhn *et al.* demonstraram com diferentes agentes vasocontráteis (angiotensina II, fenilefrina e serotonina) que o efeito anti-contrátil era transferível, i.e. ocorria por liberar PVRF, e não se limitava somente ao óxido nítrico (NO). Nos anos seguintes, diversos estudos foram conduzidos a fim de elucidar novos candidatos a PVRF e a função do PVAT na modulação da resposta vascular mediante alterações morfofuncionais em diversas patologias (GOLLASCH *et al.*, 2004; GÁLVEZ *et al.*, 2006; GAO *et al.*, 2006).

Os possíveis candidatos que promovem este efeito anti-contrátil do PVAT incluem adipocinas como adiponectina, omentina, visfatina, e outros fatores como NO, sulfeto de hidrogênio (H₂S), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), prostaciclina, angiotensina 1-7 e fator hiperpolarizante derivado de endotélio [que promove abertura de canais para potássio (K⁺)], além da produção de fatores anti-proliferativos, enzimas antioxidantes e citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 que auxilia na resposta imunológica mediada por macrófagos e linfócitos T (GUZIK *et al.*, 2006, MITIDIERI *et al.*, 2022).

Entretanto, em condições patológicas, o PVAT se torna disfuncional com alterações morfofuncionais, que podem levar à perda de seu efeito anti-contrátil e modulação da função vascular. A perda do efeito anti-contrátil compreende alterações na resposta máxima ou potência a um agente vasocontrátil comparado a resposta do PVAT de um animal saudável (LIAN *et al.*, 2016). Por exemplo, a disfunção do PVAT já foi evidenciada em uma série de patologias incluindo complicações cardiometabólicas, obesidade, diabetes tipo 2, hipertensão, aterosclerose, envelhecimento, injúria vascular e até mesmo em doenças reumáticas como, por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, vasculites, esclerose múltipla e AR (SHI *et al.*, 2022). Ademais, o TAM, TAB e PVAT da aorta torácica de animais com CIA apresentam alterações na composição do tecido, que se atribui em parte pela infiltração ou polarização de macrófagos nestes tecidos, além de comprometer a funcionalidade do PVAT frente a vasoconstrição promovida pela serotonina (WILLIAMS *et al.*, 2016; SIME *et al.*, 2017).

A disfunção do PVAT favorece infiltrado de células pró-inflamatórias e acúmulo de mediadores inflamatórios e pró-angiogênicos, estresse oxidativo, liberação de fatores pró-contráteis ou hipo-contráteis, que causam disfunção de células musculares lisas vasculares (CMLV) e endoteliais. A liberação de fatores vasoativos, pró-oxidantes, adipocinas, citocinas e quimocinas pró-inflamatórias está diretamente relacionada à modulação da função vascular promovida pelo

PVAT (BARP *et al.*, 2021). Os fatores que causam prejuízo ao efeito anti-contrátil incluem angiotensina II, endotelina-1, noradrenalina, prostanóides, espécies reativas de oxigênio, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina -1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interferon gama (IFN- γ), interleucina 17 (IL-17), fatores pró-angiogênicos como angiopoetina e fator de crescimento endotelial (VEGF), quemerina, leptina e resistina, entre outros. Portanto, esses fatores podem causar dano morfofuncional da vasculatura, e certamente desencadear a disfunção vascular associada a DCV (RAMIREZ *et al.*, 2017, COSTA *et al.*, 2018).

Em conjunto, a disfunção do PVAT afeta diretamente as CMLV e células endoteliais com diminuição de agentes vasoprotetores, aumento de agentes angiogênicos, estresse oxidativo e aumento do infiltrado celular. A relação entre a disfunção do PVAT e aumento da inflamação promovendo disfunção endotelial e das CMLV ocorre de maneira bidirecional. Por exemplo, a disfunção endotelial e das CMLV promove aumento de mediadores da migração, como a molécula de adesão intracelular (ICAM-1) e molécula de adesão vascular (VCAM-2), e recrutamento de monócitos via CCL2. Assim, a disfunção dos microvasos e vasa vasorum presentes no PVAT também gera aumento da infiltração celular e resposta inflamatória que, por fim, promove dano vascular, contribuindo para o desenvolvimento ou progressão de DCV (NOSALSKI & GUZIK *et al.*, 2017).

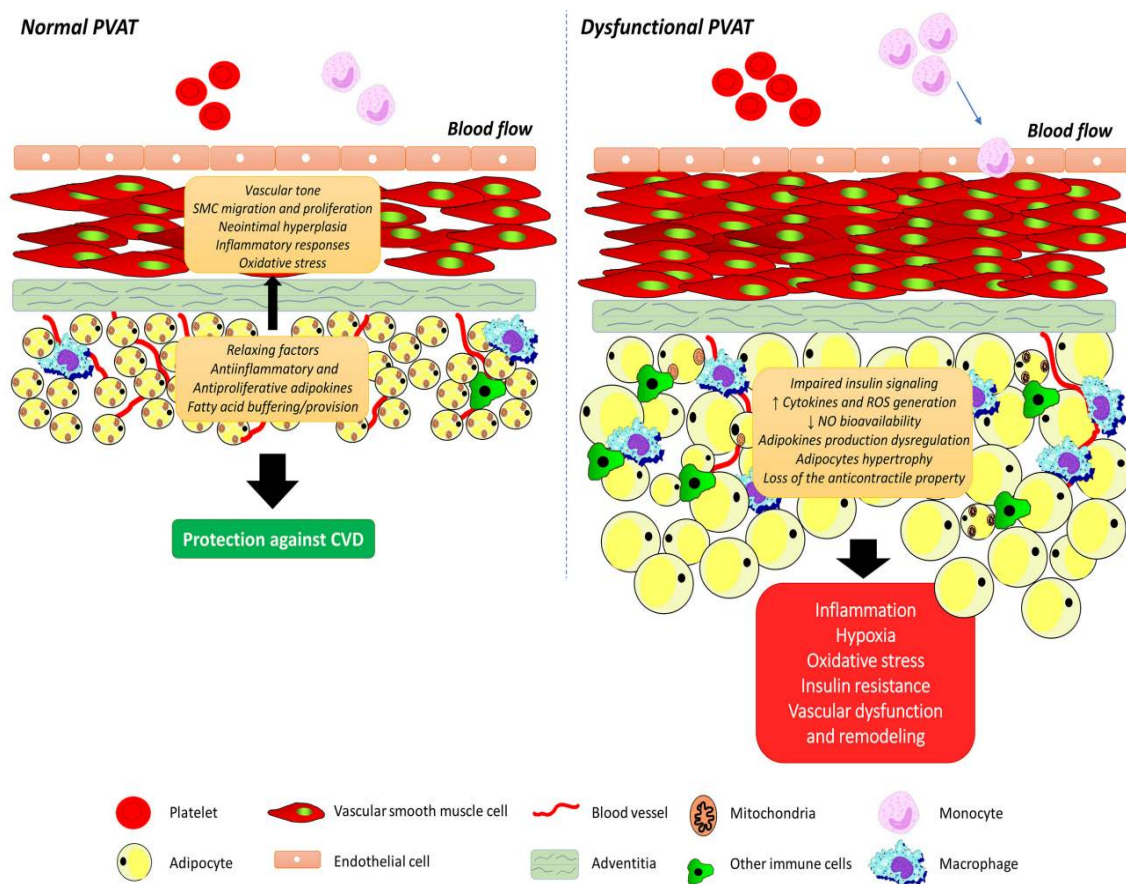


Figura 1. Possíveis mecanismos envolvidos na disfunção do PVAT promovendo DCV.
(Fonte: COSTA *et al.*, 2018).

1.3. (Dis)função do tecido adiposo perivascular e o perfil de macrófagos na AR

O aumento da resposta inflamatória mediada por macrófagos contribui para a disfunção do PVAT. Os macrófagos representam cerca de 10-15% da fração do estroma vascular e, frente a estímulos inflamatórios, como distúrbios metabólicos, o infiltrado de macrófagos pode triplicar. O infiltrado de células imunes pró-inflamatórias (monócitos, macrófagos) gera aumento da resposta inflamatória promovendo a disfunção do TAM e possivelmente do PVAT, que expressam este tipo celular (OMRAN & CHRISTIAN., 2020).

Os macrófagos quiescentes podem polarizar-se nos classicamente ativados do tipo 1 (M1) por estímulos como lipopolissacarídeo (LPS) via receptor do tipo Toll 4 (TLR4) ou citocinas provenientes de linfócitos T auxiliares (Th1), IFN- γ , TNF- α e fator estimulador de colônias 2 (CSF2). Os M1 contribuem para a resposta pró-inflamatória, apresentação de antígenos, inibição da proliferação celular e causa dano tecidual (JAYASINGAM *et al.*, 2020). Os macrófagos alternativamente ativados do tipo 2 (M2) promovem resposta anti-inflamatória e polarizam-se majoritariamente por citocinas derivadas de linfócitos auxiliares do tipo 2 (Th2) ou linfócitos T auxiliares (T reg), como interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13), IL-10 e fator de crescimento transformador do tipo beta (TGF- β). Os M2 contribuem para a resposta anti-inflamatória, vasculogênese remodelamento e reparo tecidual. De acordo com a proposta de investigação, vários marcadores de superfície celular ou intracelulares podem ser utilizados para distinguir o fenótipo de macrófagos (YANG *et al.*, 2020).

Os M1 e M2 são os tipos mais comuns de macrófagos e acumulam-se no PVAT e na camada adventícia dos vasos sanguíneos em processos patológicos. A extensão do fenótipo encontrado depende dos sinais inflamatórios presentes no microambiente do PVAT. Além disso, pode ocorrer o recrutamento e infiltração de monócitos circulantes que, posteriormente, se diferenciam em macrófagos (MURRAY & WYNN, 2011; WILLIAMS *et al.*, 2016). Ademais, nos últimos anos tem se evidenciado o aumento de marcadores de M1 e M2 no PVAT de animais submetidos a AR (SIME *et al.*, 2019).

Os macrófagos M1 produzem interleucinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), CCL2, IL-6, interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18) e interleucina-23 (IL-23), metaloproteinases de matriz e espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a resposta inflamatória na AR e disfunção do PVAT. A liberação destas quimiocinas (CCL2) contribui para o recrutamento de monócitos para o tecido e também estas citocinas auxiliam na apresentação de antígenos a células T e polarização para células auxiliares 17 e 1 [T helper 17 (Th17); T helper 1 (Th1)], levando à produção de IFN- γ , TNF- α e IL-17, ambas relacionadas com dano tecidual e patologia da AR (CUTOLO *et al.*, 2022). Os macrófagos M2 produzem TGF- β ,

antagonista do receptor da interleucina 1 (IL-1R1) e IL-10, que contribui para ativação de células T auxiliares do tipo 2 [T helper 2 (Th2)] e respostas angiogênicas que promovem reparo tecidual, além da supressão de respostas inflamatórias no PVAT e na AR (MURRAY & WYNN, 2011; NALBANT & BIRLIK, 2017).

O aumento do infiltrado de macrófagos contribui efetivamente para a disfunção do PVAT e as adipocinas podem modular estas ações seja pelo aumento de mediadores que causam recrutamento de macrófagos ou até mesmo sua polarização. As adipocinas são secretadas majoritariamente pelo TAB e TAM. Porém, em alguns casos, como o da adipocina pró-inflamatória resistina, a secreção ocorre por monócitos e macrófagos (STEPPAN *et al.*, 2001; PATEL *et al.* 2003; SILSWAL *et al.*, 2005). Neste contexto, evidências sugerem que a resistina humana está envolvida em processos que acarretam aumento da inflamação mediada por macrófagos no tecido adiposo, promoção da disfunção vascular em modelos de DCV e potencial contribuição para a patogênese da AR (FATEL *et al.*, 2018, QATANI *et al.*, 2009). Entretanto, investigações ainda são necessárias para elucidar os mecanismos que medeiam as ações da resistina no PVAT promovendo dano vascular na AR.

1.4. A adipocina pró inflamatória resistina na artrite reumatoide

A resistina, descoberta em 2001 e denominada (Retn/FIZZ3) ou também conhecida como ADSF (Fator secretado de adipócitos) em camundongos, é parte das moléculas do tipo resistina (*resistin-like molecules* - RELMs). A inferência ao nome deve-se à descoberta da resistina (Retn) como adipocina que resiste ou interfere nas ações mediadas pela insulina, observada na obesidade e diabetes (STEPPAN *et al.*, 2001).

Os camundongos e ratos possuem quatro genes das RELM que são expressos por diferentes tipos celulares e tecidos e que diferem em suas funções. Os quatro tipos de RELMs incluem Retn (Resistina), Retnla (Resistina do tipo alfa), Retnlb (Resistina do tipo beta) e Retnlg (Resistina do tipo gama) (GHOSH *et al.*, 2003). Porém, apenas a Retn e Retnlb pertencem a um grupo taxonômico diverso, incluindo seres humanos, compartilhando cerca de 60% de homologia. A Retnlb é expressa em células caliciformes intestinais em ambas espécies, enquanto a Retn expressão tecidual diferencial entre espécies (PINE *et al.*, 2018).

A adipocina resistina é um hormônio polipeptídico rico em cisteína secretado predominantemente por adipócitos em roedores, e por monócitos e macrófagos em humanos. A expressão de resistina humana no tecido adiposo deve-se a células inflamatórias não derivadas de adipócitos (HSIEH *et al.*, 2014). A resistina tem sido relacionada a diversos processos de inflamação, resistência à insulina, síndrome metabólica, obesidade, aterosclerose, hipertensão e doenças autoimunes (TARKOWSKI *et al.*, 2010; JAMALUDDIN *et al.*, 2012).

Inicialmente as ações da resistina murina foram demonstradas em diversos receptores em roedores, como receptores toll do tipo 4 (Toll-like receptor 4 - TLR4), presentes em diversos tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, CMLV e endoteliais, promovendo aumento da resposta inflamatória via ativação e translocação da proteína beta de ligação potencializada (EBP β) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B) para o núcleo (ZHAO *et al.*, 2019). Outros estudos demonstram ligação da resistina murina à decorina, à isoforma de decorina e ao receptor órfão tipo tirosina quinase 1 (ROR1), expressos em adipócitos (DAQUINAG *et al.*, 2011; SÁNCHEZ-SOLANA *et al.*, 2012). O TLR4 está entre os candidatos mais prováveis para a ação da resistina murina, uma vez que a ausência deste receptor diminui a resistência à insulina e aumento da pressão arterial promovidos por altas concentrações de resistina murina (BENOMAR *et al.*, 2013; JANG *et al.*, 2016). Por outro lado, os receptores de decorina e ROR1 são escassamente expressos em humanos e não medeiam as respostas inflamatórias induzidas pela resistina humana (AL HANNAN *et al.*, 2015).

Os estudos com TLR4, decorina e ROR1 não forneceram subsídios para confirmar interação com a resistina humana, ou seja, a interação ligante-receptor e consequente resposta inflamatória (ZHAO *et al.*, 2019). A fim de sanar estes questionamentos, estudos em linhagem de células humanas de monócitos e macrófagos indicaram ligação específica da resistina ao receptor de proteína associada a adenilato cicase 1 (CAP1) presente nas frações de membrana e citosólica (LEE *et al.*, 2014). O receptor CAP1 é expresso na maioria dos tecidos, porém majoritariamente em PBMCs e células derivadas da medula óssea em humanos. Em camundongos, a expressão também é majoritariamente em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), praticamente escassas no tecido adiposo. Por exemplo, o silenciamento dos receptores de decorina, ROR1 e TLR4 em monócitos humanos não causou diminuição da resposta inflamatória pela migração de monócitos ou liberação de citocinas pró-inflamatórias após estímulo com resistina humana. Por outro lado, o silenciamento do receptor CAP1 aboliu a resposta inflamatória mediada pela resistina humana em monócitos e macrófagos. Em contrapartida, a hiperexpressão de CAP1 aumentou a atividade inflamatória da resistina. O aumento de IL-1 β , TNF- α e IL-6 foi mediado via adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e proteína quinase A (PKA), resultando na ativação e translocação da EBP β e NF- κ B para o núcleo (LEE *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2021).

Além destes achados, estudos sugerem que a resistina humana aumenta o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo em doenças metabólicas (QATANANI *et al.* 2009; LEE *et al.*, 2014). O transplante de monócitos em ausência de CAP1 diminui a expressão IL-1 β , IL-6 e TNF- α e o infiltrado celular de macrófagos no TAB de animais com dieta hiperlipídica (LEE *et al.*, 2014). Entretanto, as ações da resistina via CAP1 promovendo aumento da resposta inflamatória no PVAT e levando à disfunção vascular na AR ainda requerem investigações.

As ações da resistina também são observadas em condrócitos e fibroblastos e, em geral, os efeitos na AR ocorrem devido à indução da expressão de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias,

aumento na produção de enzimas de degradação de cartilagem, e diminuição na produção de proteínas de cartilagem hialina (LEE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010; SATO *et al.*, 2017).

No contexto da AR, a injeção intra-articular de resistina no joelho de camundongos machos e fêmeas foi capaz de induzir a doença, aumentar a migração de leucócitos e a expressão de IL-6 independentemente do sexo (BOKAREWA *et al.*, 2005). Dando suporte à sugestão de que a resistina pode desencadear e/ou contribuir para a AR, há aumento das concentrações de resistina no soro e no líquido sinovial de pacientes com aumento de infiltrado de células imunes nas articulações do joelho (SENOLT *et al.*, 2007). Em pacientes com AR com acometimento extremo das articulações ou em pacientes com fatores de risco clássicos para DCV, o aumento da concentração de resistina se correlaciona com o estado de ativação endotelial e inflamação sistêmica (DESSEIN *et al.*, 2013).

Em conjunto, é possível inferir que a disfunção vascular presente na AR contribui para o principal fator de mortalidade na AR, as DCV. Na AR, o PVAT apresenta alterações morfológicas com aumento da inflamação mediada por macrófagos e redução do efeito anti-contrátil, processos integrantes da disfunção vascular. A adipocina resistina representa um importante alvo nesses eventos, uma vez que suas concentrações circulantes e sinoviais estão aumentadas na AR. Ademais, a resistina via CAP1 em macrófagos e adipócitos promove liberação de citocinas e quimiocinas, eventos essenciais para o desenvolvimento e progressão da AR e também da disfunção vascular. Portanto, torna-se imprescindível à elucidação dos mecanismos pelos quais a resistina via CAP1 contribui para as alterações vasculares induzidas pela disfunção do PVAT na AR.

1. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Evidências recentes destacam que a resistina via CAP1 em monócitos/macrófagos é importante nas alterações morfofuncionais do tecido adiposo e, possivelmente, na regulação da população e atividade dessas células em outros tecidos, sendo responsável pelo aumento de mediadores inflamatórios envolvidos diretamente na fisiopatologia da AR. Neste contexto, a resistina e o receptor CAP1 tornam-se importantes alvos para investigação na disfunção do PVAT e concomitante disfunção vascular na AR. Sendo assim, este estudo possibilitará uma maior compreensão dos mecanismos celulares que medeiam as ações da resistina nas alterações do PVAT e da vasculatura. Há de se considerar que a disfunção do PVAT e consequente disfunção vascular são cruciais para o desenvolvimento de DCV, principais responsáveis pelo alto índice de mortalidade na AR.

Devido à relevância destes fatos, este estudo testará a hipótese que a resistina via CAP1 promove disfunção do PVAT, levando a aumento de mediadores inflamatórios e recrutamento de macrófagos na vasculatura em camundongos submetidos a AIA (Figura 2).

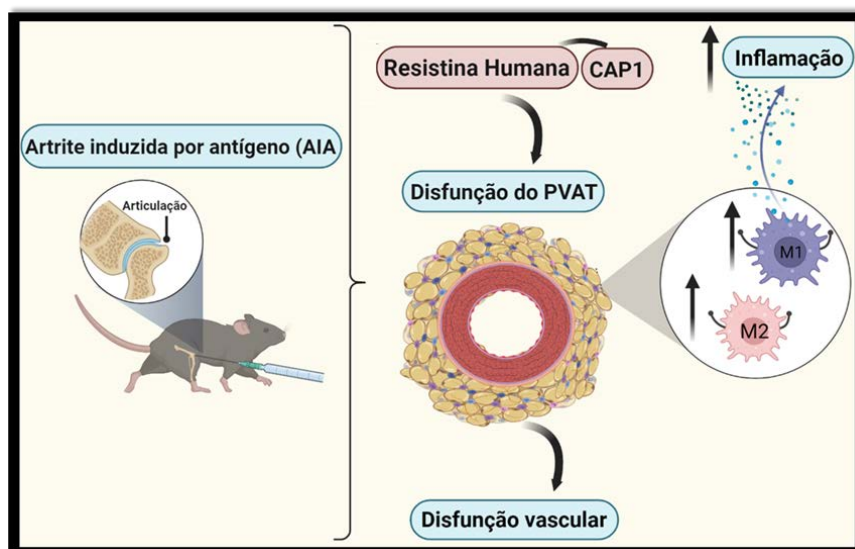


Figura 2. Esquema representativo da hipótese do estudo. Artrite induzida por antígeno (AIA), CAP1 (Proteína associada a adenilato ciclase 1), Tecido adiposo Perivascular (PVAT), M1 (macrófagos do tipo 1) e M2 (macrófagos do tipo 2).

2. OBJETIVO

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar o papel funcional da resistina via CAP1 e as possíveis alterações funcionais do PVAT e consequente inflamação e infiltrado de macrófagos, eventos envolvidos na disfunção vascular associada a AR.

3.1. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar se a resistina contribui para as lesões e infiltrado inflamatório na articulação fêmur-tibial na AIA em camundongos. A citometria dos linfonodos inguinais foi realizada em camundongos WT para células CD4⁺/IL-17, após a confirmação da resposta de imunização que foi seguida de 5 desafios intra-articulares. Avaliamos o diâmetro articular, a contagem de leucócitos do lavado sinovial, hipernocicepção a dor e realizamos análise histológica da articulação fêmur-tibial dos grupos WT, RTN^{-/-}, hRTN^{+/-} e respectivos controles, submetidos ou não a AIA.
 - 2) Determinar se camundongos imunizados e com AIA apresentam disfunção do PVAT. Para tal, aortas torácicas, com e sem PVAT (com e sem endotélio) de animais C57Bl/6 [(WT) *wild type-selvage*] controle, WT imunizados e WT AIA foram utilizadas. Curvas concentração-efeito para agentes vasoconstritor (FE) e vasorelaxantes (ACh e NPS) foram realizadas em miógrafo para registro de tensão isométrica. As respostas encontradas nos ensaios de reatividade vascular auxiliaram na escolha do modelo animal, apenas imunização (fase inicial da doença) ou imunização seguida de 5 desafios intra-articulares (estabelecimento da artrite), para os estudos subsequentes.
 - 3) Investigar se a disfunção do PVAT ocorre de maneira similar na AIA em camundongos C57Bl/6 [WT (*wild type-selvagem*)] machos e fêmeas. Curvas concentração-efeito para agentes vasoconstritor (FE) e vasorelaxantes (ACh e NPS) foram realizadas em miógrafo para registro de tensão isométrica em artérias com e sem PVAT de animais controle e AIA.
 - 4) Avaliar se a AIA em camundongos aumenta a expressão gênica e concentrações de resistina no PVAT e plasma, por ensaios por PCR em tempo real e imunoenzimático.
 - 5) Averiguar se a resistina murina causa disfunção do PVAT via TLR4. Para tal, artérias com e sem PVAT de animais nocautes para TLR4 foram incubadas com resistina murina e curvas concentração-efeito para FE foram realizadas em miógrafo de tensão isométrica.
 - 6) Investigar se a resistina humana atua via TLR4/NF-κB. Para tal, utilizamos concentrações crescentes de resistina humana em células HEK293 que expressam o gene repórter humano
-

TLR4/NF- κ B/SEAP, o que permitiu monitorar a ativação de NF- κ B pela produção da enzima SEAP, utilizando LPS como controle positivo.

- 7) Determinar se a resistina murina e resistina humana modulam as alterações funcionais do PVAT em camundongos com AIA. Para isto, incubamos aortas com e sem PVAT com resistina murina ou resistina humana e realizamos curvas concentração-efeito para FE em miógrafo para registro de tensão isométrica. Para incubação com resistina murina utilizamos camundongos WT e para resistina humana utilizamos camundongos nocautes para resistina murina, mas que expressam resistina humana em monócitos/macrófagos, camundongos hRTN (+/+). Paralelamente, a função do PVAT foi avaliada em camundongos nocaute para resistina (RTN^{-/-}), camundongos humanizados hRTN (+/+) e respectivos controles, submetidos ou não a AIA.
 - 8) Analisar se a resistina contribui para alterações estruturais nos adipócitos e aortas torácicas de camundongos submetidos a AIA. Para tanto, realizamos análise histológica da porção torácica das aortas com PVAT dos grupos WT, RTN^{-/-}, hRTN^{+/+} com AIA e respectivos controles para obtenção de parâmetros indicativos de remodelamento vascular.
 - 9) Averiguar os possíveis mecanismos pelos quais a resistina via CAP1 promove disfunção do PVAT; por exemplo, pelo aumento do infiltrado de macrófagos M1 e M2, citocinas e quimiocinas no PVAT em camundongos submetidos a AIA. Para tal, os PVATs das artérias aortas torácicas dos grupos WT, RTN^{-/-}, hRTN^{+/+} com AIA e controle WT foram utilizados em ensaios de expressão gênica, Multiplex Luminex e citometria de fluxo.
-

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, selvagens [*Wild type* (WT)], camundongos nocautes para resistina (RTN^{-/-}), e camundongos que não expressam resistina murina, mas expressam resistina humana em monócitos e macrófagos a partir do gene promotor CD68 (hRTN^{+/-}). Os camundongos nocautes foram gerados e gentilmente cedidos pelo Prof.Dr. Mitchell A. Lazar, previamente descritos na literatura (QATANANI *et al.*, 2009). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, #15/2020. Os camundongos, com idade de 10-12 semanas, pesando em torno de 20 a 25 gramas foram divididos em 4 grupos experimentais:

1. WT controle macho, WT imunizado macho e WT + AIA macho
2. WT controle fêmea e WT + AIA fêmea
3. RTN^{-/-} controle e RTN^{-/-} AIA
4. hRTN^{+/-} controle e hRTN^{+/-} AIA

4.2. Indução da AIA

Animais da linhagem C57BL/6, RTN^{-/-} e hRTN^{+/-} foram imunizados com o antígeno proteico (albumina sérica bovina metilada – mBSA, Sigma). A imunização consiste na injeção subcutânea de uma emulsão com 100 µL de volumes iguais de salina tampão-fosfato (PBS, Sigma) e adjuvante completo de Freund [(CFA) 1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, Sigma] com 500 µg de mBSA dissolvido na emulsão. Foi administrada uma “dose de reforço” 7 dias após a primeira imunização, com a mesma dose de mBSA. Os animais controles receberam emulsão, porém sem mBSA para não ocorrer a sensibilização ao antígeno, via subcutânea e sob anestesia com isoflurano 2%. Após 24 horas (h) da última imunização, estes animais foram eutanasiados e as amostras, coletadas para os experimentos.

Os próximos grupos de animais para AIA, das linhagens C57BL/6, RTN^{-/-} e hRTN^{+/-}, foram imunizados como descritos anteriormente e, 7 dias após a segunda imunização, receberam desafio com mBSA (10 µg/cavidade) por injeção intra-articular na articulação fêmur-tibial, seguido de mais quatro desafios semanais, sob anestesia com isoflurano 2%. O grupo controle WT recebeu PBS (10 µl/cavidade) intra-articular, sob anestesia com isoflurano 2%. Os animais foram eutanasiados 24 h após o último desafio e as amostras foram coletadas para os experimentos (Figura 3).

O modelo de AIA é dependente da resposta do sistema imune adaptativo, uma vez que células apresentadoras de antígeno (APCs) são capazes de reconhecer o mBSA como um antígeno. As APCs ativam células T CD4+ autorreativas apresentando antígenos pelo complexo principal de

histocompatibilidade de classe II (MHC II), resultando na co-estimulação destas células e respostas pró-inflamatórias, i.e (Th1 produzindo IFN- γ , TNF- α e Th17 produzindo IL-17, IL-21). A hiperativação do sistema imunológico adaptativo resulta no acúmulo de células e mediadores inflamatórios, causando sinovite, dano articular e ósseo (SCHINNERLING *et al.*, 2019).

A cronicidade do modelo de AIA pode ser atingida ao repetir os desafios intra-articulares, o que permite maior retenção do antígeno intra-articular e consequente sinovite, uma vez que a inflamação gerada é auto resolutiva. Esta abordagem de múltiplos desafios permite investigar surtos decorrentes da doença e também as recaídas observadas na prática clínica na AR. As características da AR na AIA incluem sinovite, dano na cartilagem, podendo resultar em dano ósseo. O modelo de AIA não resulta em perda da autolerância imune que gera a artrite poli articular sistêmica, observado na clínica na AR. Embora produza menor degradação da cartilagem, comparativamente a outros modelos, e não produza fator reumatoide, ainda assim, é possível observar dano articular com sinovite e produção de anticorpos. Além do mais, ao utilizar camundongos com background C57BL/6 é possível utilizar animais geneticamente modificados para investigar diferentes vias fisiopatológicas envolvidas na AR (JONES *et al.*, 2018; YE *et al.*, 2021).

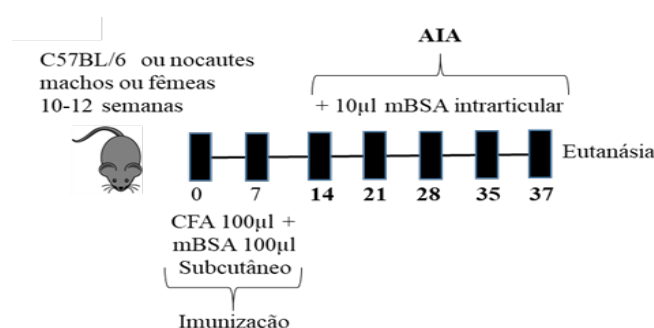


Figura 3. Esquema representativo de indução da AIA. AIA (artrite induzida por antígeno), mBSA (albumina bovina sérica metilada), CFA (adjuvante completo de Freund).

4.3. Avaliação da AIA

A articulação fêmur-tibial foi retirada e os tecidos foram descalcificados em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (10%) e foram incluídos em blocos de parafina. A análise do infiltrado inflamatório total foi realizada utilizando a coloração de hematoxilina-eosina. Os cortes foram quantificados de acordo com escore histopatológico para a extensão da sinovite, incluindo os parâmetros de hiperplasia da sinóvia, infiltrado celular e perda óssea, sendo pontuados como (0) ausente, 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (grave).

A avaliação do edema fêmur-tibial foi realizada com o auxílio de um paquímetro analógico (precisão de 0,05 mm) pelo registro da variação do diâmetro articular (DA) em milímetros.

A hipernocicepção, que indica a redução do limiar nociceptivo, foi realizada pelo método de von Frey eletrônico com aplicação na região medial da pata posterior direita, como descrito

anteriormente (SCHNEIDER *et al.*, 2021). A resposta nociceptiva gera uma flexão seguida de imediata retirada da pata. A hipernocicepção foi indicada como limiar mecânico em (g).

4.4. Avaliação da função vascular

A fim de avaliar a função vascular em aortas torácicas, o método descrito por Mulvany e Halpern (1977) foi utilizado. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano 3% por via inalatória, a cavidade peritoneal foi exposta e a eutanásia ocorreu por excesso de anestésicos. Após verificar a ausência de sinais vitais, as aortas torácicas foram removidas e inseridas em uma placa de Petri com solução Krebs-Henseleit (SKH) [(em mM): NaCl 130; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,9; Glicose 5,5; EDTA 0,03; CaCl₂ 1,6] a 4°C.

A aorta torácica foi dividida em 2 segmentos de 2,0 mm, o PVAT foi mantido em um segmento e em outro o PVAT foi removido, as artérias foram montadas no miógrafo para grandes vasos. O endotélio foi removido mecanicamente das aortas com PVAT. A partir do sistema para aquisição de dados (PowerLab/8SP, ADInstruments) adquirimos os dados. Em seguida, as aortas torácicas foram estimuladas com solução de Krebs com cloreto de potássio (KCl, 120 mM) para avaliar a viabilidade do vaso. As aortas consideradas com endotélio foram as que apresentaram relaxamento maior que 80% em resposta a 10⁻⁴ M de acetilcolina (ACh).

A incubação de artérias aortas, com e sem PVAT, com resistina murina ou humana (R&D systems) (40 ng/ml por 4 h a 37° C) visou mimetizar as concentrações fisiológicas e manter a viabilidade da artéria pelo tempo estimado (SMALL *et al.*, 2019). Após o período de incubação, foram realizadas curvas concentração-efeito para FE nos anéis com e sem PVAT de animais WT, TLR4^{-/-} ou hRTN^{+/-}.

A resposta vasoconstritora foi avaliada utilizando-se curvas cumulativas concentração-efeito para FE, (10⁻¹⁰ a 3x10⁻⁴ M) e os resultados foram expressos em mN, descontando o valor da tensão basal. As curvas cumulativas concentração-efeito para avaliar a resposta vasodilatadora endotélio dependente foram realizadas utilizando a ACh e a independente de endotélio com nitroprussiato de sódio (NPS) (10⁻¹⁰ a 3x10⁻⁴ M), ambas após a pré-contracção com FE (10⁻⁶ M).

Para a remoção do endotélio foi utilizado um alfinete e realizada fricção mecânica na parede endotelial. Consideramos os segmentos com endotélio funcional com relaxamento maior que 80% em resposta a 10⁻⁵ M de ACh. Os segmentos sem endotélio e com PVAT foram utilizados para as curvas cumulativas concentração-efeito para FE, (10⁻¹⁰ a 3x10⁻⁴ M).

Os resultados foram expressos em relação à porcentagem da pré-contracção a FE. A análise das curvas sigmoidais, pela análise de regressão linear da concentração-efeito para FE, ACh e NPS, considerou o efeito máximo produzido pelo agonista (E_{max}) e a potência, expressa pelo logaritmo negativo da -EC₅₀ (concentração que induz 50% do efeito máximo), (pEC₅₀).

4.5. Avaliação da interação resistina/TLR4 via NF- κ B

A ação da resistina humana via TLR4 é descrita na literatura, entretanto após a descoberta do receptor CAP1 esta teoria tornou-se divergente (TARKOWSKI *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2014). Com o intuito de investigar o papel do reconhecimento da resistina humana via TLR4, usamos o sistema de células repórteres com TLR4 projetado (Human Embryonic Kidney 293; InvivoGen; HEK-Blue™). Células HEK293 que expressam o repórter humano TLR4/NF- κ B/SEAP (fosfatase alcalina secretada) foram sedimentadas em placas e meio de cultura e a detecção de azul HEK foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes (InvivoGen). Este sistema permite o estudo da compatibilidade receptor/ligante e ativação de NF- κ B. Ligantes de TLR4 ativam NF- κ B e induzem a produção de SEAP com transcrição de citocinas. A atividade de SEAP foi detectada por alterações de coloração de roxo para azul na presença da secreção de SEAP no meio celular, leitura em densidade óptica a 655 nm. O PBS estéril foi utilizado como controle, LPS (2 μ g/ml) (InvivoGen) como controle positivo, anticorpo anti-hTLR4 (1: 1000) (Abcam) como controle negativo e uma curva de diluição em série de resistina humana (R&D systems) (12,5-800 ng/ml) foi realizada para avaliar a compatibilidade de ligação de resistina a TLR4 e ativação de NF- κ B.

4.6. Análise estrutural das aortas torácicas

As aortas torácicas foram obtidas como descrito no item 4.3 e foram inseridas no composto de temperatura de corte ideal (OCT). Os cortes de 4 μ m de espessura foram dispostos em lâmina para microscopia. As lâminas foram coradas de acordo com a técnica de coloração com hematoxilina e eosina (HE) para exame microscópico. A análise da imagem foi realizada pelo software Image J, e os parâmetros diâmetro e espessura arterial e diâmetro dos adipócitos foram analisados.

4.7 RT-PCR para expressão gênica de resistina, CAP1, quimiocinas e citocinas

A expressão gênica (RNA_m) foi determinada por reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, *reverse transcription- Polymerase chain reaction*) no PVAT das artérias torácicas dos grupos do estudo.

Os PVATs dos animais dos grupos do estudo foram isolados das artérias torácicas e congelados em nitrogênio líquido e inseridos em 1 ml de TRIZOL (tiocianato de guanidina e fenol). O protocolo de extração foi realizado de acordo com as informações do fabricante TRIZOL® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific®).

A quantificação foi realizada por espectrofotometria (260 nm) em aparelho Epoch™ Microplate (BioTek Instruments®). O critério de pureza utilizado foi a razão dos comprimentos de onda de 260/280 nm (ácido nucléico/proteína) que atingissem aproximadamente $\geq 1,8$. A síntese do cDNA foi realizada utilizando de 2000 ng do RNA extraído utilizando o kit High

Capacity cDNA Reverse Transcription (Life Technologies®) de acordo com as informações do fabricante. O cDNA foi utilizado para a quantificação da expressão gênica de genes de interesse no PVAT da aorta torácica dos animais WT, WT AIA, hRTN^{+/-} AIA e RTN^{-/-} AIA utilizando os sistemas repórteres de amplificação do sistema TaqMan™ (Life Technologies®) ou SYBR™ Green Select PCR (Applied Biosystems®).

A reação RT-PCR foi realizada em um volume final de 20 µl com 50 ng de cDNA contendo oligonucleotídeos específicos que foram construídos a partir de informações retiradas do GENE BANK e adquiridas na Invitrogen, Thermo Fisher Scientific®. A reação quantitativa RT-PCR foi realizada no aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems®).

As expressões dos genes de interesse incluíram a resistina e CAP1 (Tabela 1), além dos indicadores de infiltrado de monócitos CCL2 [CCL2 (Mm00441242_m1)], molécula de adesão ICAM [ICAMI (Mm00516023_m1)], marcadores de M1: IL-1β [IL-1β (Mm00434228_m1)], iNOS (Tabela 1), TNF-α [TNF (Tabela 1)] e marcadores de M2: receptor de manose de macrófago CD206 [CD206 (Mm00485148_m1)], Resistina do tipo alfa [Retnl (Mm00445109_m1)] e Glicerol-3-fosfato desidrogenase [GAPDH (Mm99999915_g1) e (Tabela 1)] para controle interno.

O valor de limiar (*threshold*) para cada gene foi estabelecido, sendo um nível de sinal do corante sinalizador normalizado utilizado para determinação do Ct (ciclo *threshold*) em ensaios de tempo real. Denomina-se o nível arbitrário de fluorescência estabelecido acima da linha basal e dentro da região de crescimento exponencial. O Ct designa a quantidade de ciclos que cada amostra precisa para cruzar a linha *threshold*. Os resultados foram quantificados utilizando o método ^{-2ΔΔ}Ct com GAPDH de cada sistema repórter como gene de referência.

Gene	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
<i>Retnl</i>	AAGAACCTTTCATTTCCCTCCT	GTCCAGCAATTTAAGCCAATGTT
<i>CAP1</i>	ATGGCTGACATGCAAAATCTTGT	TGGCAAGCAGCGAGTCAAAT
<i>NOS2</i>	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC
<i>TNF</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>GAPDH</i>	CATCTTCTGTGCAGTGCCA	CGGCCAAATCCGTTAC

Tabela 1- Pares de *primers* utilizados para o ensaio de RT/PCR por SYBR™ Green.

4.8 Dosagem das concentrações de citocinas e quimiocinas em animais com AIA

O PVAT e plasma de animais WT e WT AIA foram coletados para quantificar as concentrações de resistina murina pelo kit *Quantikine* ELISA (R&D systems) de acordo com as informações do fabricante. As amostras de PVAT dos grupos WT, WT AIA, hRTN^{+/-} AIA e RTN^{-/-} AIA foram coletadas para ensaio de Plataforma de multiplexação Luminex, ensaio multiplex baseado em grânulos previamente homogeneizados usando a tecnologia Luminex® xMAP® (R&D systems), de acordo com informações do fabricante. O valor obtido em pg/ml das amostras de PVAT na leitura do ensaio multiplex foram divididos pelo valor da concentração de proteína do tecido pelo método de Bradford, expressos por (pg/ml/μg de proteína) previamente diluídas em 80 ul de PBS a 4°C. Os analitos detectados foram ICAM, CCL2, TNF-α, IL-1β, IL-17, IL-6, interleucina 33 (IL-33), IL-10, osteopontina, receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGRF2) e angiopoentina. Para as amostras de plasma detectamos ICAM, CCL2, TNF-α, IL-1β, IL-17, IL-6, IL-10, osteopontina e angiopoentina utilizando Luminex® xMAP® (R&D systems), de acordo com informações do fabricante.

Amostras de PVAT de animais WT e WT AIA também foram coletadas para quantificar a expressão proteica do perfil de adipocinas, citocinas e quimiocinas utilizando o kit *Proteome Profiler Mouse Adipokine Array Kit* (R&D systems), de acordo com informações do fabricante. Os resultados foram expressos como densidade do pixel/valor de referência do ponto.

4.9 Análise da expressão de marcadores celulares por citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada no intuito de caracterizar fenotipicamente os macrófagos M1, M2 e CAP1 por marcadores específicos em células do PVAT dos grupos WT, WT AIA, hRTN^{+/-} AIA e RTN^{-/-} AIA. A análise da frequência celular com marcação para CD4⁺ e IL-17 foi realizada nos linfonodos inguinais dos camundongos WT e WT AIA de acordo com protocolos prévios (PRADO *et al.*, 2020). Os PVATs de animais WT AIA, hRTN^{+/-} AIA e RTN^{-/-} AIA foram isolados, utilizando protocolo descrito previamente seguido de marcação para anticorpos específicos de leucócitos e macrófagos (SHAMSI & TSENG, 2020).

A expressão de marcadores específicos para linfócitos T nos linfonodos inguinais incluiu: viabilidade celular (ViaDye, *Fixable Viability Dye*), CD45, CD4⁺ e IL-17 ambos da (BioLegend). Para marcadores de macrófagos utilizamos os marcadores CD45, F4/80 (macrófagos) integrina alfa x (CD11c) (M1), CD206 (M2) e CAP1. Os anticorpos para leucócitos e macrófagos foram provenientes da BioLegend e CAP1 (Abcam). O total de células obtidas foram ressuspensas em 280 μL de PBS com albumina bovina sérica (BSA) a 1% com posterior incubação com Fc block (BioRad) por 30 minutos (min) a 4°C. Os anticorpos monoclonais específicos com marcadores

conjugados com diferentes fluorocromos foram utilizados na proporção de (1:200) seguindo protocolos estabelecidos anteriormente (SHABAI *et al.*, 2020).

As quantificações das células foram realizadas através do equipamento FACSVerse FACSsort™ (BD Immunocytometry System, Franklin Lakes, NJ), utilizando os canais de fluorescência. As análises foram realizadas pelo programa FCS Express V3 (DE NOVO SOFTWARE) em todas as células adquiridas (eventos/amostra), individualizadas por janelas (Gates) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) ou fluorescência (FL). Os resultados foram expressos por frequência nos linfonodos. O resultado do PVAT foi expresso por frequência e número absoluto, obtido pelo cálculo de correção das células positivas provenientes dos marcadores analisados com o número total de células do PVAT do pool de animais.

4.10 Análise estatística

Os resultados provenientes das análises estatísticas foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) obtidos pelo programa GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software®).

Análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância de uma via (ANOVA- *ONE WAY*) ou (*TWO-WAY*) de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Bonferroni ou de Holm-Sidak para comparar mais de duas médias. O teste “t” de *Student* foi utilizado para comparar duas médias. O nível de significância mínima considerado aceitável foi de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da artrite induzida por antígeno

O modelo animal utilizado AIA foi estabelecido em duas fases, a imunização (fase de injeção subcutânea com emulsão CFA + mBSA) e estabelecimento da AIA (injeções intra-articulares com mBSA) (Figura 4-A). Na fase de imunização, coletamos os linfonodos inguinais para avaliar se de fato a aplicação subcutânea da emulsão causaria resposta imunológica adaptativa específica ao mBSA que é mediada por linfócitos T (Th17) e produção de IL-17. Houve aumento na frequência celular CD4+ e IL-17 nos linfonodos inguinais dos animais WT AIA machos em comparação aos controles, como indicado pela citometria de fluxo (Figuras 4-C, 4-D).

Houve aumento do DA dos animais WT AIA machos e fêmeas em comparação aos seus respectivos controles (Figura 4-B).

Os animais WT, RTN^{-/-} e hRTN^{+/-} com AIA apresentaram queda no limiar mecânico (Figura 4-E) e aumento do DA (Figura 4-F) comparativamente aos controles.

As imagens de histologia confirmaram a sinovite intensa com infiltrado celular mononuclear, comprometimento sinovial com hiperplasia da sinóvia e perda óssea nas articulações dos animais WT AIA machos e fêmeas, em comparação aos controles (Figuras 5-A, 5-B). Além disso, os animais RTN^{-/-} AIA e hRTN^{+/-} AIA não apresentaram diferença no escore histopatológico (Figuras 5-C, 5-D), comparado aos animais WT AIA. Estes parâmetros indicaram o estabelecimento do modelo crônico de AIA de 5 desafios intra-articulares. Ademais, indicaram que a resistina não influencia na severidade da AIA, considerando o estado crônico do modelo em questão.

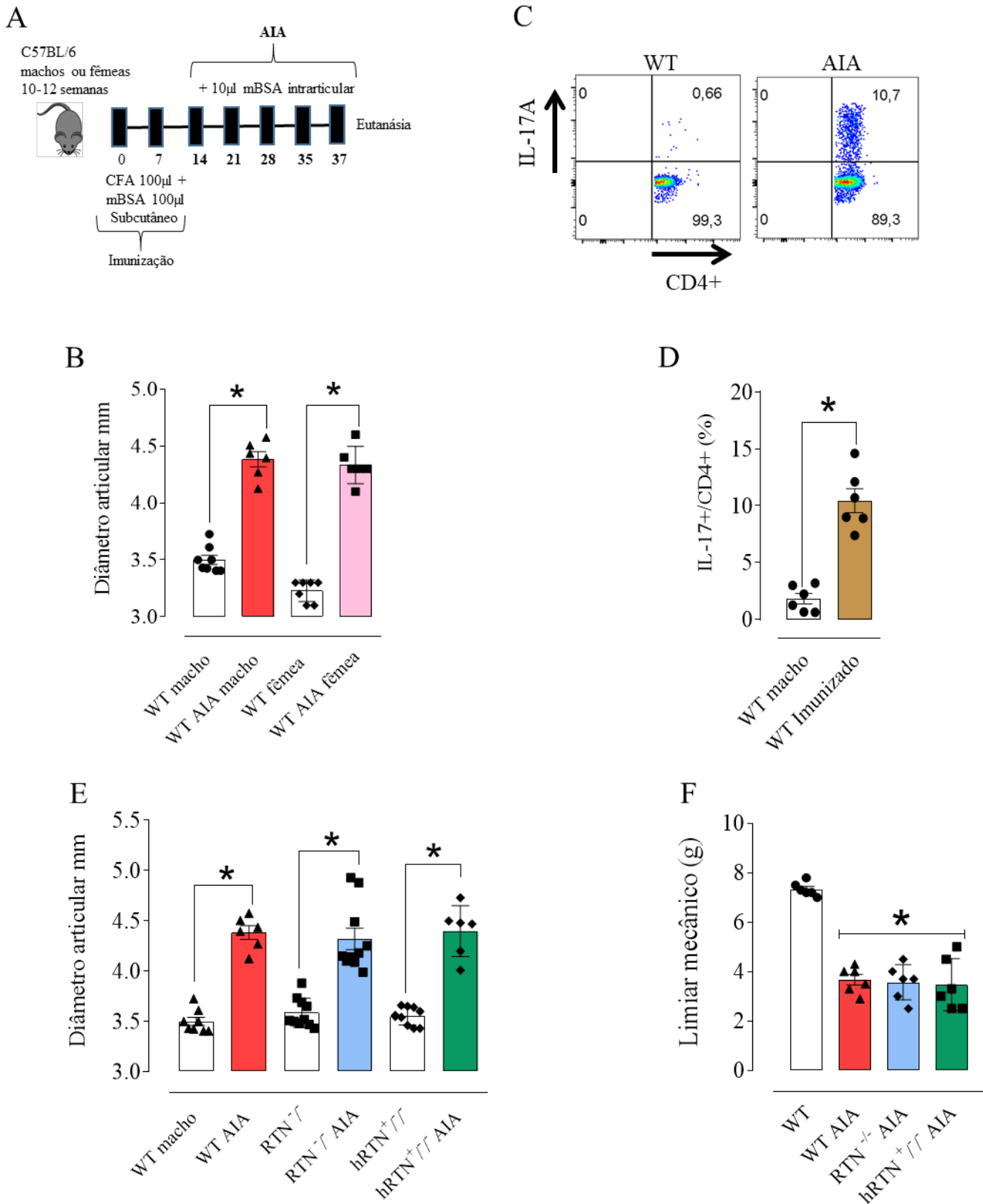


Figura 4. Caracterização do modelo experimental de AIA. O gráfico (A) representa a esquematização do modelo experimental de AIA. As figuras (C, D) representam a frequência de linfócitos T CD4⁺ IL-17 nos linfonodos inguinais de animais WT Imunizados vs. WT. As figuras (B, E) indicam o DA e a figura (F), o limiar mecânico dos animais WT AIA machos e fêmeas, RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/+} AIA e seus respectivos controles. A Dados expressos em média ± E.P.M., p<0,05 (*) indica diferença significativa vs. WT, Teste T de Student ou One-Way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, n=5-10.

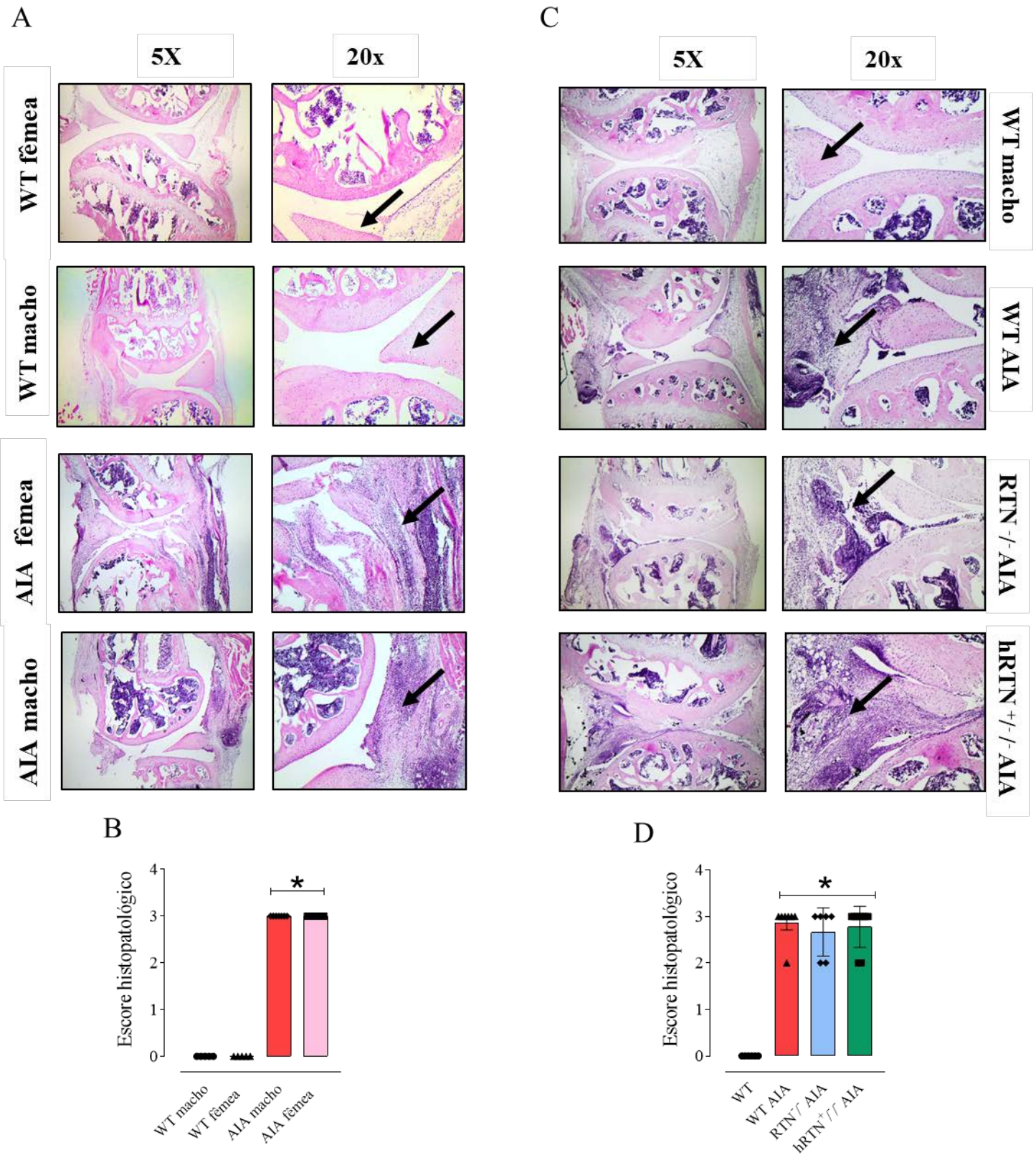


Figura 5. A AIA não difere entre camundongos WT machos e fêmeas, RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/-} AIA. Os gráficos (A, C) representam as imagens representativas dos escores histopatológicos da extensão da sinovite dos animais WT AIA machos e fêmeas (B), WT AIA, RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/-} AIA (D) e seus respectivos controles. As setas indicam sinovite com hiperplasia sinovial e exsudato celular inflamatório intenso no espaço articular. Dados expressos em média ± E.P.M, $p < 0,05$ (*) indica diferença significativa vs. WT, One-Way ANOVA seguido de teste de Holm-Sidak, $n = 5-10$.

5.2. Efeito da imunização nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora e função do PVAT

Uma vez caracterizado e estabelecido o modelo animal, buscamos avaliar a função vascular dos animais no estágio inicial da doença (imunização) e após estabelecimento da AIA.

As artérias sem PVAT dos animais WT controle apresentaram resposta a FE potencializada, comparadas a artérias com PVAT, indicando a presença do efeito-anti contrátil na presença do PVAT. Entretanto, animais WT imunizados apresentaram redução da resposta máxima a FE, mas mantimento da redução da potência a FE nas artérias com e sem PVAT (Figura 6-B).

As artérias de animais WT imunizados sem PVAT apresentaram diminuição da resposta máxima de relaxamento dependente de endotélio a ACh, comparadas a aortas com PVAT. A presença do PVAT nas artérias dos animais imunizados preveniu a disfunção endotelial (Figura 6-C).

Desta forma, o PVAT no estágio inicial da doença contribui para manter a vasodilatação a ACh em animais imunizados. O efeito anti-contrátil ainda permanece funcional nos animais imunizados comparados ao controle WT, indicados na área sob a curva (AUC) (Figura 6-G). Porém com redução na resposta máxima a FE, mas mantendo a menor potência a este agente vasoconstritor.

5.3. Efeito da AIA nas respostas vasoconstritora e vasodilatadora e função do PVAT

Animais com AIA apresentaram perda total do efeito anti-contrátil, com prejuízo no efeito máximo e potência da FE (Figura 6-E). Observamos que a perda do efeito anti-contrátil do PVAT ainda é funcional nos animais imunizados, enquanto nos animais AIA a função anti-contrátil é completamente perdida (Figura 6-F). A diferença da AUC das curvas-contração efeito para FE das artérias com e sem PVAT comparando os grupos WT, WT imunizados e WT AIA indica a perda total do efeito anti-contrátil do PVAT do grupo WT AIA (Figuras 6-G).

A retirada do endotélio das aortas com PVAT dos animais WT AIA não alterou a resposta contrátil reduzida do PVAT, indicando que a perda do efeito anti-contrátil ocorre independentemente do endotélio (Figura 6-H).

Por outro lado, artérias com e sem PVAT dos animais WT AIA apresentaram diminuição da resposta de vasorelaxamento a ACh (Figura 6-I). Diferentemente do que ocorria no estágio inicial da doença, o PVAT na AIA (caracterizado pelo comprometimento intra-articular) já não contribuiu para manter a função endotelial nos animais, mas para agravar a disfunção endotelial. Portanto, optamos por utilizar o modelo de AIA para as próximas investigações do estudo, com foco na resposta anti-contrátil do PVAT na vasoconstrição a FE.

Ademais, houve redução na potência do NPS, que induz resposta vasodilatadora independente de endotélio, mas dependente de músculo liso pela doação direta de NO, nos animais AIA com

PVAT comparados ao grupo controle (Figura 6-J). As tabelas a seguir apresentam os valores de Emax e pEC₅₀ para FE (Tabela 2), ACh (Tabela 3) dos grupos imunizados, AIA e WT e na (Tabela 4) do NPS para WT AIA e controle.

Tabela 2. Valores de Emax e pEC₅₀ para fenilefrina em aortas dos grupos WT, imunizados e AIA.

	WT		Imunizados		AIA	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT (-)	10,6 ± 0,3	7,3 ± 0,1	8,9 ± 0,3	7,2 ± 0,1	6,8 ± 0,3	6,3 ± 0,1
PVAT (+)	8,7 ± 0,0*	6,5 ± 0,0*	8,3 ± 0,0	6,3 ± 0,0**	7,0 ± 0,2	5,9 ± 0,0
	n= 8	n=8	n=7	n=7	n=8	n=8
PVAT (+) E(-)	10,1 ± 0,3 #	6,3 ± 0,0	-----	-----	6,0 ± 0,1	6,3 ± 0,1

Os dados representam a média ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, p<0,05. (*) PVAT (+) vs. PVAT (-) grupo WT, (**) PVAT (+) vs. PVAT (-) do grupo WT Imunizados, (#) PVAT (+) E(-) vs. PVAT (+) do grupo WT.

Tabela 3. Valores de Emax e pEC₅₀ para acetilcolina em aortas com PVAT e sem PVAT dos grupos WT, imunizados e AIA.

	WT		Imunizados		AIA	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT (-)	94,0 ± 3,1	7,7 ± 0,0	69,5 ± 2,8	6,9 ± 0,2	65,9 ± 3,1**	6,3 ± 0,0**
PVAT (+)	89,5 ± 2,2	7,2 ± 0,0	88,5 ± 2,4*	6,5 ± 0,0	73,2 ± 2,4**	6,1 ± 0,0**
	n=7	n=7	n=6	n=6	n=8	n=8

Os dados representam a média ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, p < 0,05. (*) diferença significativa PVAT (+) vs. PVAT (-) WT imunizado, PVAT (-). (**) vs. WT.

Tabela 4. Valores de Emax e pEC₅₀ para nitroprussiato de sódio em aortas com PVAT e sem PVAT dos grupos WT e AIA.

	WT		AIA	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT (-)	93,1 ± 2,5	7,8 ± 0,0	94,0 ± 8,6	7,7 ± 0,3
PVAT (+)	96,1 ± 1,8	7,6 ± 0,0	89,7 ± 2,1	7,0 ± 0,0*
	n=7	n=7	n=7	n=7

Os dados representam a média ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, p < 0,05. (*) diferença significativa PVAT (+) vs. PVAT (-) WT AIA.

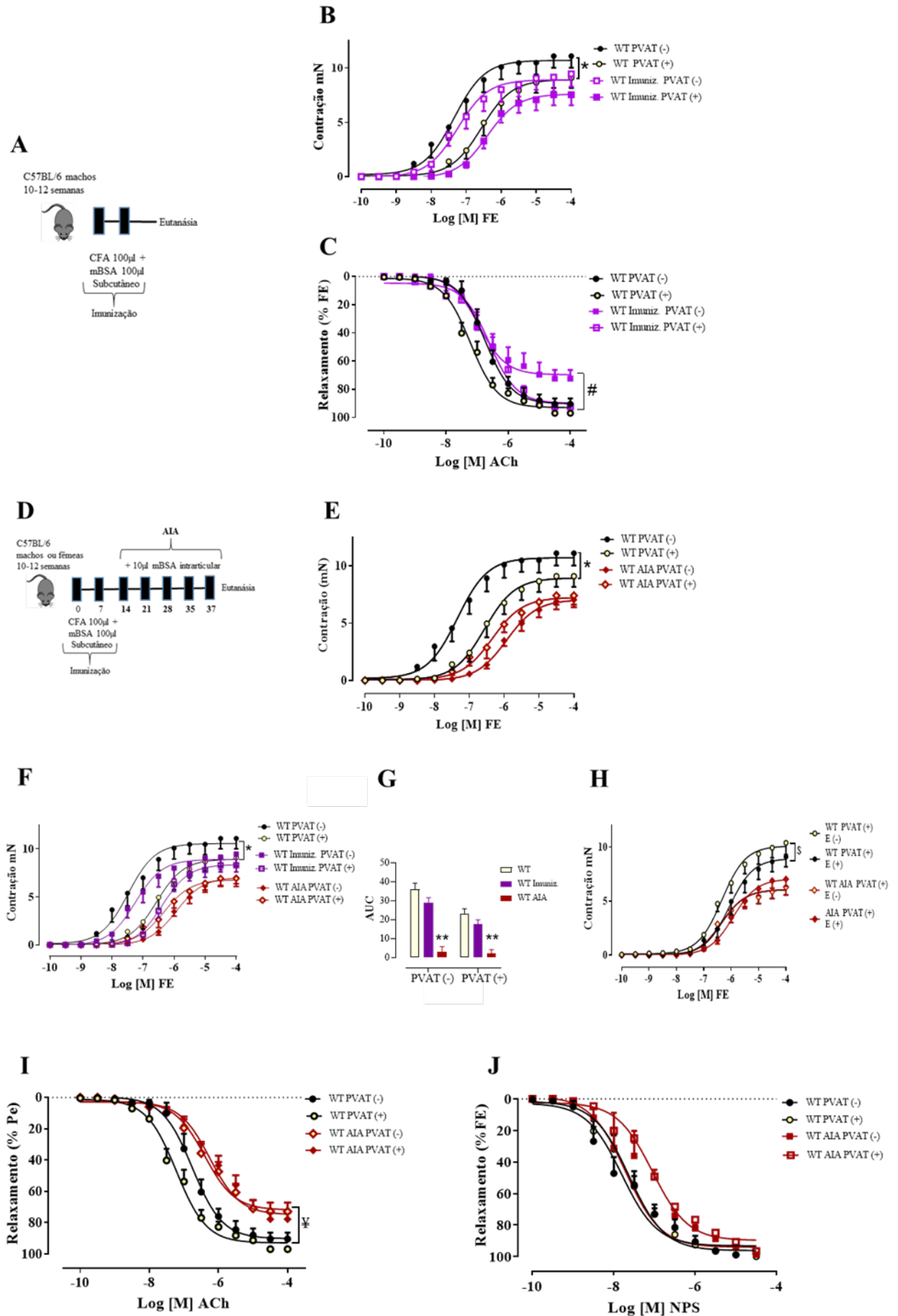


Figura 6. A AIA promove disfunção do PVAT. Delineamento experimental demonstrando a fase da doença para os experimentos de reatividade vascular (A, D). Os gráficos representam curvas concentração-efeito para fenilefrina (FE) (B, E, F), em animais machos WT imunizados, AIA e controle. (G) indica a área sob a curva da curva concentração-

Figura 6 (continuação) efeito para FE dos grupos do estudo. (J) curvas concentração-efeito para nitroprussiato de sódio NPS nos grupos WT AIA e controle. Experimentos realizados em artérias torácicas com e sem PVAT. (H) O gráfico representa curvas concentração-efeito para FE em artérias com PVAT com e sem endotélio em animais WT AIA e controle. (J). Dados expressos em média \pm E.P.M., (n=6-8). *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) WT PVAT (+) vs. WT PVAT (-); (#) WT imunizado PVAT (+) vs. WT imunizado PVAT (-); (**) WT AIA vs. WT imunizados e WT; (\$) WT PVAT (+) E (-) vs. WT PVAT (+) E (+); (¥) WT AIA vs. WT.

5.4. Efeito da AIA no PVAT de camundongos fêmeas

De acordo com os resultados encontrados, camundongos machos com AIA apresentaram disfunção da resposta vascular e do PVAT. Entretanto, a função vascular em fêmeas submetidas a AIA ainda carecia de elucidações.

Ao analisar a função vascular das artérias de camundongos fêmeas submetidas a AIA, observamos comprometimento da resposta vasodilatadora dependente de endotélio e do efeito anti-contrátil do PVAT.

Em concordância com o observado em machos, houve redução do efeito máximo e potência da FE nas artérias com e sem PVAT de camundongos AIA fêmeas, levando à perda do efeito anti-contrátil do PVAT (Figura 7-A). A AUC das curvas- contração efeito para FE em aortas com e sem PVAT de animais machos e fêmeas submetidos a AIA indica perda do efeito contrátil em ambos grupos (Figura 7-B, C). Assim, ao analisar a função vascular de machos e fêmeas submetidos a AIA, os grupos apresentaram comprometimento semelhante da função do PVAT.

Além disso, em camundongos fêmeas submetidos a AIA, tanto artérias com ou sem PVAT apresentaram diminuição do efeito máximo do relaxamento dependente do endotélio (curvas concentração efeito para ACh) em comparação ao grupo controle (Figura 7-D). Não obstante, a função endotelial tanto em animais fêmeas quanto em machos foi comprometida na AIA (Figura 7-E). Os valores de E_{max} e pEC_{50} para FE e ACh estão demonstrados nas tabelas abaixo (Tabela-5 para ACh e Tabela 6 para FE, respectivamente).

Desta forma, tanto animais machos quanto animais fêmeas apresentaram disfunção do PVAT. Devido a condição da doença causar disfunção vascular em ambos os sexos, os próximos experimentos foram conduzidos somente em animais machos.

Tabela 5. Valores de Emax e pEC₅₀ para acetilcolina em aortas dos grupos WT fêmeas, AIA fêmeas e AIA machos.

	WT Fêmeas		AIA Fêmeas		AIA machos	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT (-)	86,8 ± 1,9	6,8 ± 0,1	72,4 ± 1,9*	6,8 ± 0,0	65,9 ± 3,1	6,3 ± 0,0
PVAT (+)	89,9 ± 1,6	7,0 ± 0,0	75,0 ± 1,8*	7,8 ± 0,0	73,2 ± 2,4	6,1 ± 0,0
	n=7	n=7	n=7	n=7	n=8	n=8

Os dados representam a média ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, p<0,05. (*) PVAT (+) vs. PVAT (-) do grupo WT.

Tabela 6. Valores de Emax e pEC₅₀ para fenilefrina em aortas dos grupos WT fêmeas, AIA fêmeas e AIA machos.

	WT Fêmeas		AIA Fêmeas		AIA machos	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT (-)	9,5 ± 0,4	7,2 ± 0,1	7,8 ± 0,2	7,2 ± 0,1	6,8 ± 0,3	6,3 ± 0,1
PVAT (+)	7,8 ± 0,2*	6,1 ± 0,1	7,3 ± 0,1	6,7 ± 0,0	7,0 ± 0,2	5,9 ± 0,0
	n=7	n=7	n=7	n=7	n=8	N=8

Os dados representam a média ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, p<0,05. (*) diferença significativa do PVAT (+) vs. PVAT (-) do grupo WT.

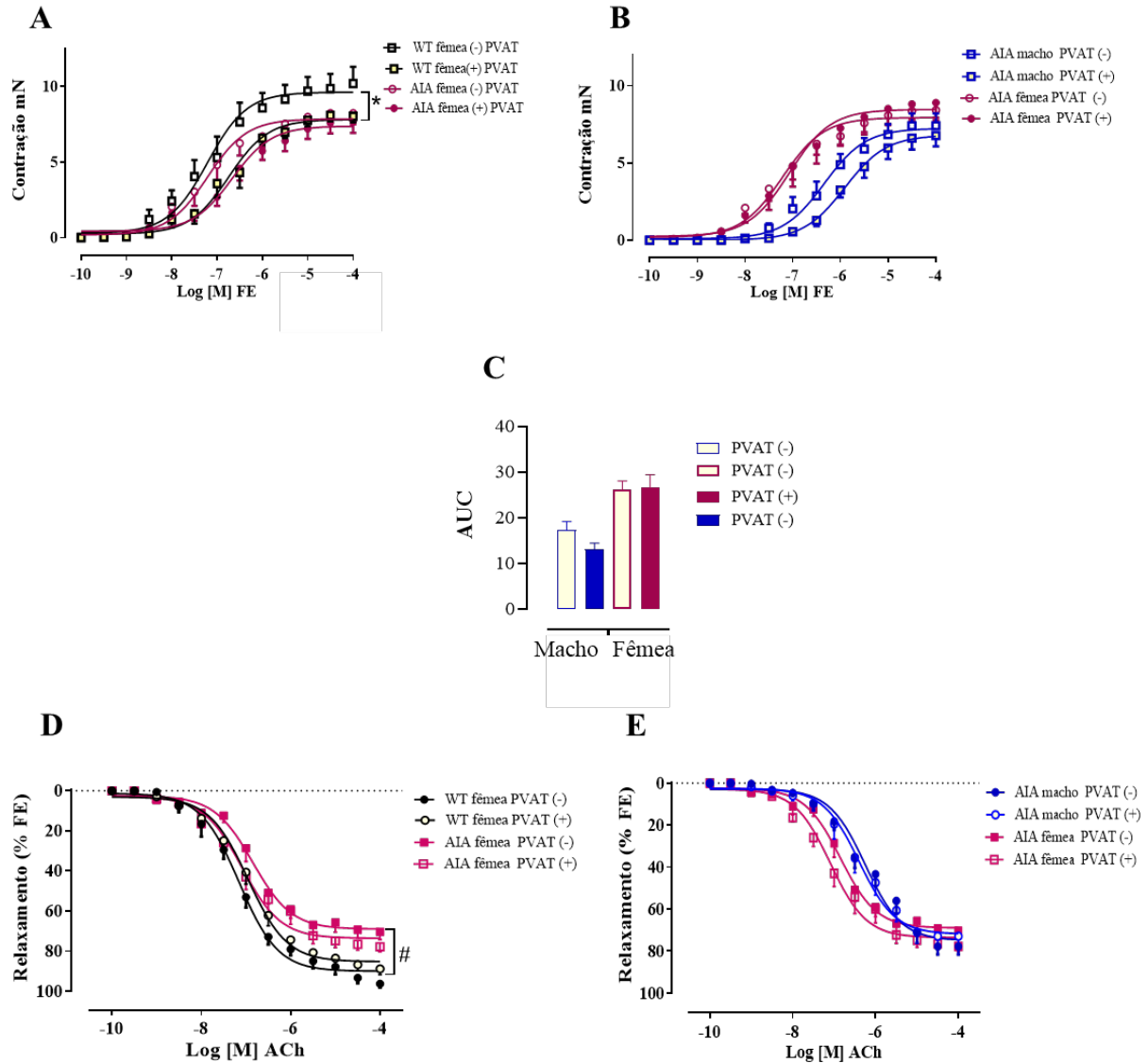


Figura 7- O PVAT de artérias de animais machos e fêmeas está disfuncional na AIA. Os gráficos representam curvas concentração-efeito para fenilefrina (FE) (A, B) e (C) área sob a curva (AUC) de animais fêmeas, machos e fêmeas (B, C) com AIA e respectivos controles. (D, E) curvas concentração-efeito para acetilcolina (ACh) em animais fêmeas (D), machos e fêmeas (E) com AIA e respectivos controles. Dados expressos em média \pm E.P.M., (n=7-8). *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) WT PVAT (+) vs. WT PVAT (-); $p < 0,05$. (#) WT fêmea vs. AIA.

5.5. Efeito da AIA nas concentrações de resistina murina no PVAT e plasma

Uma vez observada disfunção do PVAT na AIA, buscamos investigar se a resistina poderia mediar este evento. A análise do *Proteome Profiler Mouse Adipokine Array Kit* foi realizada com o intuito de elucidar as possíveis adipocinas relacionadas à disfunção do PVAT. Assim, mesmo não obtendo diferença significativa, observamos um padrão mais expressivo da adipocina alvo, a resistina (Figuras 8-A, B). Porém, ao validar as referências de dados obtidos na análise de proteoma de membrana, houve aumento da resistina murina tanto na análise de expressão gênica por PCR em tempo real (Figura 8-C), quanto na concentração proteica por ELISA do PVAT de animais com AIA (Figura 8-D), em comparação ao controle. Ademais, as concentrações de resistina estavam aumentadas no plasma de animais com AIA (Figuras 8-E).

De forma similar, as concentrações de resistina também foram maiores no PVAT dos animais AIA fêmeas (Figura 8-F), porém não encontramos diferença estatística significativa no plasma (Figuras 8-G).

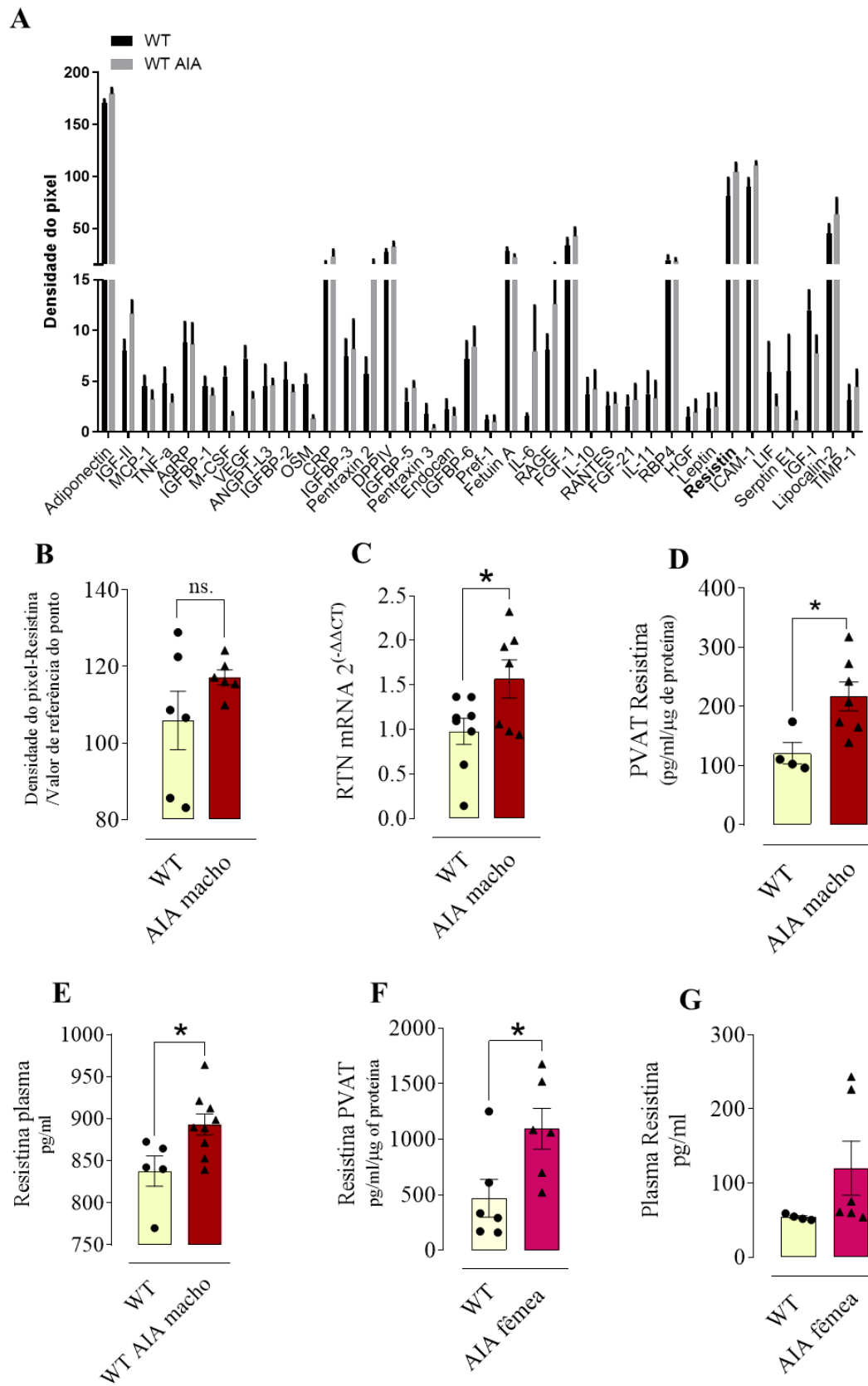


Figura 8. A resistina está aumentada em PVAT e plasma de animais AIA machos. Os gráficos representam (A, B) densidade de pixels em duplicata de resistina, (C) da expressão gênica, concentração no PVAT (D, F), (E, G) concentração plasmática de resistina, em animais machos ou fêmeas WT AIA e controles. Dados expressos em média \pm E.P.M. Teste T, $p < 0,05$. (*) indica uma diferença significativa vs. WT, $n=4-9$.

5.6. Efeito da resistina murina na função do PVAT e possível regulação via TLR4

Para avaliar o efeito da resistina na função vascular do PVAT, utilizamos a resistina murina recombinante 40 ng/ml por 4 h (SMALL *et al.*, 2019). A incubação com resistina promoveu a perda do efeito anti-contrátil do PVAT, com redução no efeito máximo e potência a FE em aortas com e sem PVAT de animais WT (Figura 9-A). Similarmente, os animais com AIA também apresentaram redução do efeito anti-contrátil do PVAT.

A fim de elucidar o possível receptor para as ações da resistina murina, utilizamos artérias de camundongos nocautes para TLR4^{-/-} incubados com resistina murina. Ao incubar as artérias com resistina murina, os animais nocautes para TLR4 não apresentaram perda do efeito anti-contrátil do PVAT.

Demonstramos que o PVAT está disfuncional na AIA e que a resistina é capaz de reduzir o efeito anti-contrátil do PVAT de forma similar ao encontrado neste modelo animal. As ações da resistina murina podem ser em parte mediadas por TLR4, uma vez que a ausência deste receptor na presença da resistina murina não afetou a resposta anti-contrátil do PVAT.

Observamos anteriormente aumento na expressão de resistina murina no PVAT dos animais com AIA. Então, para avaliar o efeito da resistina na função vascular do PVAT, incubamos a resistina murina recombinante 40ng/ml por 4h em artérias com e sem PVAT (SMALL *et al.*, 2019). A incubação com resistina promoveu a perda do efeito anti-contrátil do PVAT, com redução no efeito máximo e potência a FE em aortas com e sem PVAT de animais WT (Figura 9-B). Similarmente, os animais com AIA também apresentaram redução do efeito anti-contrátil do PVAT. Valores de Emax e pEC₅₀ para FE descritos na Tabela 7.

A fim de elucidar o possível receptor para as ações da resistina murina, utilizamos artérias de camundongos nocautes para TLR4^{-/-} incubados com resistina murina. Ao incubar as artérias com resistina murina, os animais nocautes pra TLR4 não apresentaram perda do efeito anti-contrátil do PVAT. Valores de Emax e pEC₅₀ para FE descritos na Tabela 8.

Este grupo de experimentos de avaliação da função vascular demonstra que o PVAT está disfuncional na AIA e que a resistina é capaz de reduzir o efeito anti-contrátil do PVAT de forma similar ao encontrado neste modelo animal. As ações da resistina murina podem ser em parte mediadas por TLR4, uma vez que a ausência deste receptor na presença da resistina murina não afetou a resposta anti-contrátil do PVAT.

5.7. Efeito da resistina humana na função do PVAT e a participação do TLR4

A incubação com resistina humana (40 ng/ml por 4 h) de artérias com e sem PVAT de camundongos nocautes para a resistina murina, mas que expressam resistina humana em monócitos e macrófagos (hRTN^{+/-}) também provocou a perda do efeito anti-contrátil do PVAT, com redução na resposta máxima a FE em aortas com e sem PVAT em comparação ao grupo controle hRTN^{+/-} (Figura 9-C). Valores de Emax e pEC₅₀ para FE descritos na Tabela 9.

Com isso, observamos que tanto a resistina murina quanto a resistina humana podem mediar a disfunção do PVAT na AIA. Uma vez que a redução do efeito anti-contrátil do PVAT observada nos animais com AIA é similar à encontrada ao incubar estas artérias com resistina murina ou humana. Paralelamente, o nosso próximo conjunto de dados avaliou se a expressão gênica e as concentrações de resistina estariam aumentadas no PVAT e plasma de camundongos com AIA.

Anteriormente, o efeito anti-contrátil do PVAT foi preservado ao incubar artérias de animais TLR4^{-/-} com resistina murina. Estes dados indicaram que parte das ações da resistina murina via TLR4 podem mediar a disfunção do PVAT. Entretanto, as ações da resistina humana via TLR4^{-/-} ainda necessitavam elucidarções. Para tal, avaliamos a atividade da SEAP em células HEK293 que expressam o repórter humano TLR4/NF-κB/SEAP, o que permite monitorar a ativação de NF-κB pela produção da enzima SEAP. As concentrações crescentes de resistina não aumentaram a atividade da SEAP, e não houve diferença em relação ao controle positivo LPS (Atividade da SEAP: LPS 0,79 ± 0,0 vs. Controle 0,35 ± 0,0; nm, n=6) (Figura 9-D).

Estes dados indicam que a resistina humana não exerce seus efeitos via TLR4/NF-κB. Sendo assim, nos próximos experimentos investigamos se a resistina e CAP1 estariam expressos no PVAT e, posteriormente, a expressão específica de CAP1 em macrófagos do PVAT de animais WT e WT AIA e nocautes.

Tabela 7. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos WT e WT + Resistina.

	WT		WT + Resistina	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT (-)	10,6 ± 0,3	7,3 ± 0,1	5,8 ± 0,1	5,4 ± 0,1
PVAT (+)	8,7 ± 0,0*	6,5 ± 0,0*	6,0 ± 0,1	5,5 ± 0,2
	n=8	n=8	n=7	n=7

Os dados representam a média e ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) diferença significativa PVAT (+) vs. PVAT (-) do grupo WT.

Tabela 8. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos TLR4^{-/-} e TLR4^{-/-} + Resistina.

	TLR4 ^{-/-}		TLR4 ^{-/-} + Resistina	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT (-)	6,9 ± 0,2	5,7 ± 0,2	6,7 ± 0,1	5,4 ± 0,0
PVAT (+)	5,7 ± 0,1*	5,8 ± 0,0	5,4 ± 0,0*	5,9 ± 0,1
	n=5	n=5	n=5	n=5

Os dados representam a média e ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) diferença significativa PVAT (+) vs. PVAT (-) do grupo TLR4^{-/-}.

Tabela 9. Valores de Emax e pEC50 para fenilefrina em aortas dos grupos hRTN^{+/-} e hRTN^{+/-} + Resistina.

	hRTN ^{+/-}		hRTN ^{+/-} + Resistina	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT -	9,3 ± 0,1	6,4 ± 0,0	6,9 ± 0,1	6,4 ± 0,0
PVAT +	7,8 ± 0,3*	6,6 ± 0,1	7,4 ± 0,1	5,9 ± 0,0
	n=5	n=5	n=5	n=5

Os dados representam a média e ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, $p < 0,05$. (*) diferença significativa PVAT (+) vs. PVAT (-) do grupo hRTN^{+/-}.

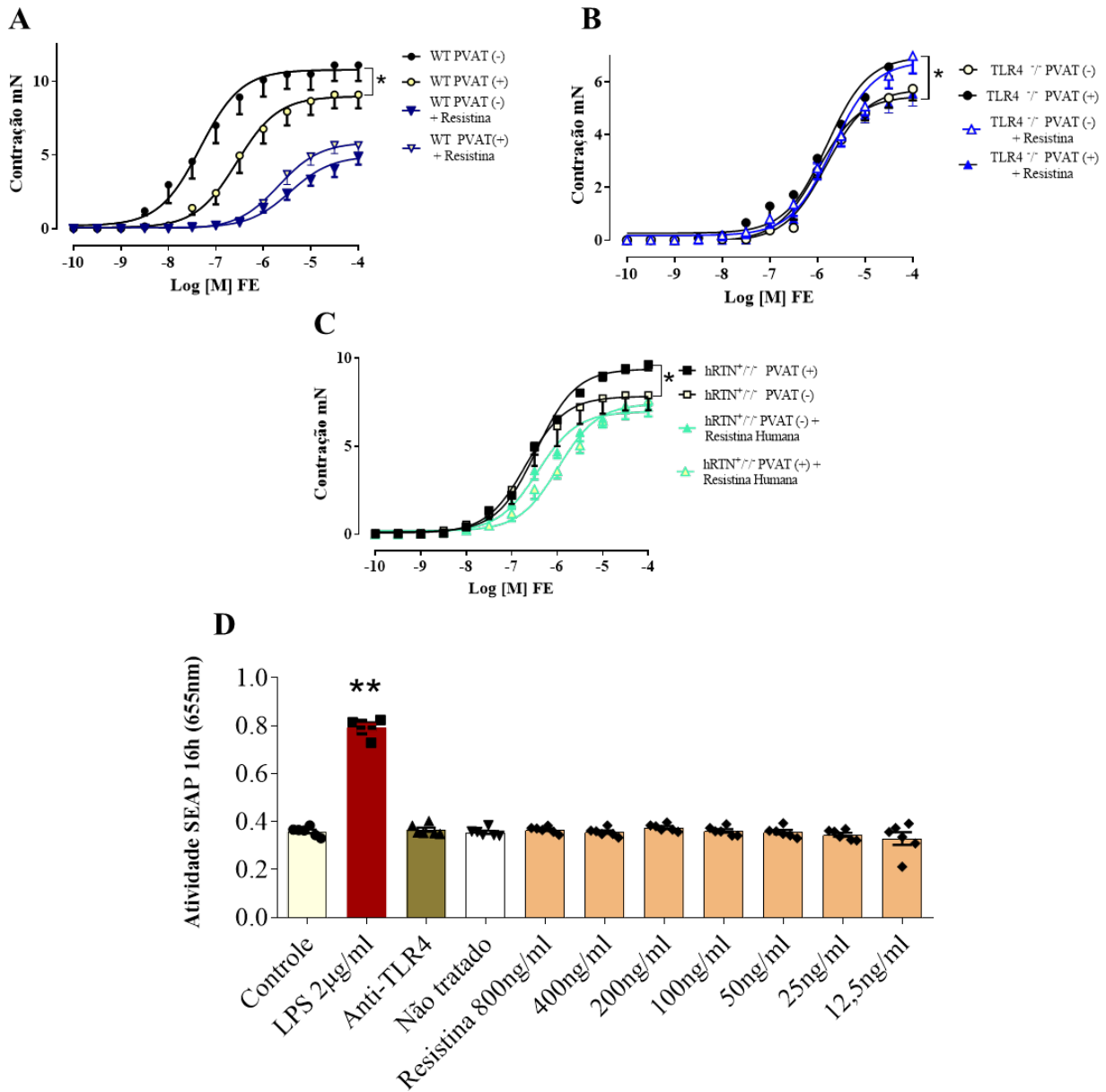


Figura 9. A resiquin *in vitro* promove disfunção do PVAT similar a AIA. A resiquin murina promove suas ações via TLR4, enquanto a resiquin humana não apresenta este efeito. Os gráficos representam curvas concentração-efeito para FE nas aortas com e sem PVAT de animais (A) WT, (B) TLR4^{-/-} incubados com resiquin murina e (C) hRTN^{+/+} incubados com resiquin humana. Os gráficos representam a (D) atividade da SEAP utilizando controle com PBS estéril, controle positivo com LPS (2 µg/ml), controle negativo com anti-hTLR4, não tratados e resiquin humana com concentrações de 12,5-800 ng/ml. Teste T ou *One-way* ANOVA seguido de teste Holm-Sidak, $p < 0,05$. (*) indica diferença significativa PVAT (+) vs. PVAT (-) dos respectivos grupos controle; $p < 0,05$.

5.8. Efeito da resistina murina e humana na função do PVAT na AIA

Os dados anteriores demonstraram que animais WT AIA apresentaram perda do efeito, efeito anti-contrátil e a incubação de aortas com resistina murina ou humana produz efeito similar. Não obstante, camundongos nocautes para resistina ($RTN^{-/-}$) AIA mantiveram o efeito anti-contrátil do PVAT, considerando efeito máximo e potência nas curvas concentração-efeito para FE em comparação ao grupo $RTN^{-/-}$ controle (Figura 10-A, Tabela 10).

Entretanto, ao utilizar camundongos que não expressam a resistina murina derivada de adipócitos, mas produzem a resistina humana em padrão semelhante ao encontrado em humanos, ou seja, em monócitos e macrófagos [Resistina humanizados ($hRTN^{+/+}$)], a disfunção do PVAT permaneceu nestes animais (Figura 10-B, Tabela 11). As curvas concentração-efeito para FE em aortas com e sem PVAT e AUC demonstraram a prevenção da perda do efeito anti-contrátil do PVAT nos animais $RTN^{-/-}$ AIA vs. WT AIA e $hRTN^{+/+}$ (Figuras-10-C, 10-D, 10-E). Valores de E_{max} e pEC_{50} para FE descritos na Tabela 12.

Portanto, a resistina humana derivada de monócitos-macrófagos promove disfunção do PVAT e a ausência da adipocina murina previne estes efeitos. Nos próximos experimentos buscamos entender se mediadores inflamatórios e a infiltração de macrófagos no PVAT poderiam mediar estes efeitos.

Tabela 10. Valores de Emax e pEC₅₀ para fenilefrina em aortas dos grupos RTN^{-/-} e RTN^{-/-}AIA

	RTN ^{-/-}		RTN ^{-/-} AIA	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT (-)	7,1 ± 0,1	6,0 ± 0,1	7,4 ± 0,2	6,1 ± 0,2
PVAT (+)	6,1 ± 0,0*	5,7 ± 0,0	6,5 ± 0,1**	5,6 ± 0,1**
	n=4	n=4	n=6	n=6

Os dados representam a média ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, p<0,05. (*) diferença significativa vs. PVAT (-) e PVAT (+) do grupo controle; p<0,05. (**) diferença significativa vs. PVAT (-) e PVAT (+) do grupo AIA.

Tabela 11. Valores de Emax e pEC₅₀ para fenilefrina em aortas dos grupos hRTN^{+/-} e hRTN^{+/-}AIA.

	hRTN ^{+/-}		hRTN ^{+/-} AIA	
	Emax	pEC ₅₀	Emax	pEC ₅₀
PVAT (-)	9,4 ± 0,1	6,4 ± 0,2	6,4 ± 0,1	6,3 ± 0,1
PVAT (+)	7,7 ± 0,3 *	6,7 ± 0,1	7,1 ± 0,3	6,0 ± 0,0
	n=5	n=5	n=6	n=6

Os dados representam a média ± E.P.M. *Two-way* ANOVA com pós-teste Bonferroni, p<0,05. (*) diferença significativa vs. PVAT (-) e PVAT (+) do grupo controle.

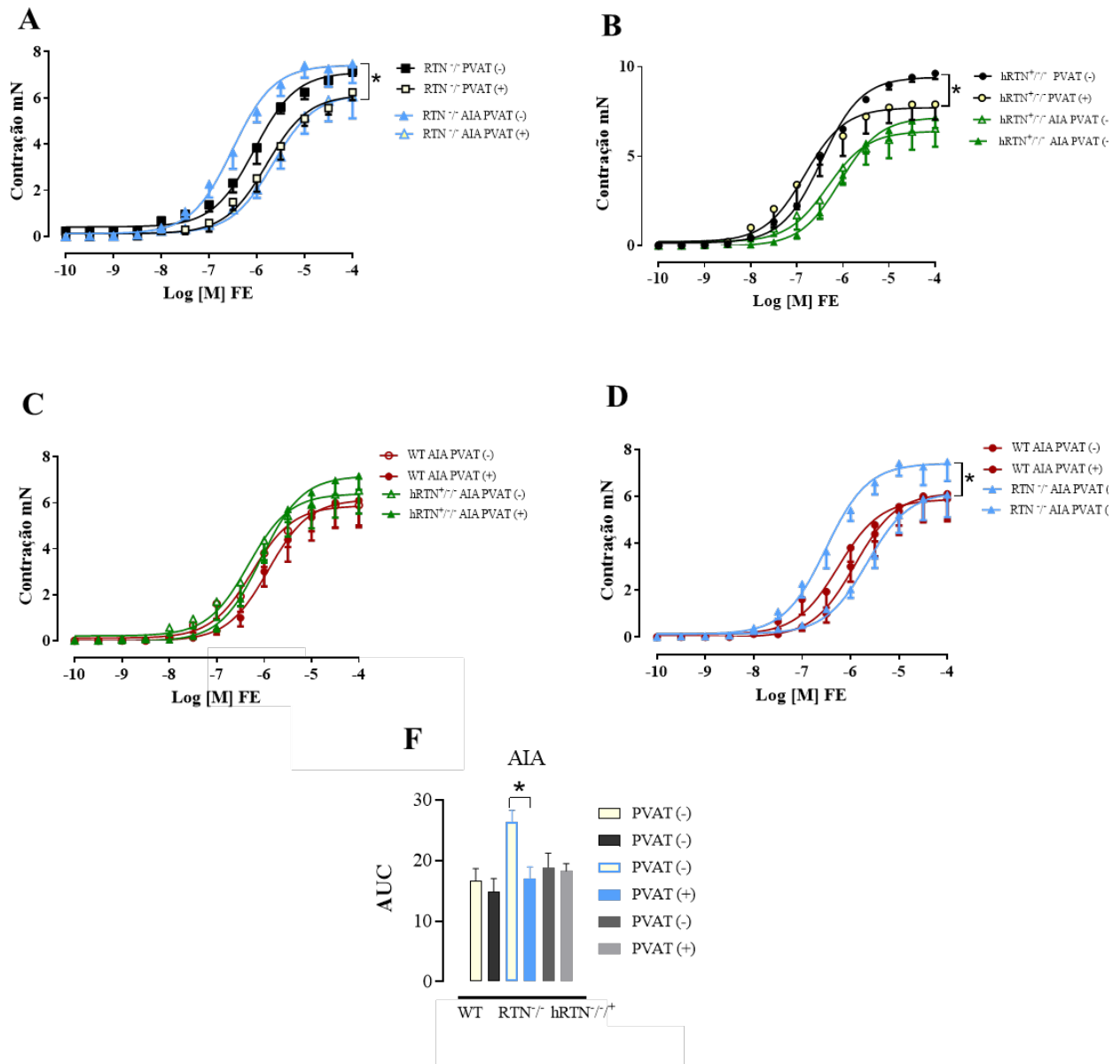


Figura 10. A resistina humana derivada de monócitos-macrófagos promove perda do efeito anti-contrátil do PVAT na AIA, enquanto a ausência da resistina murina reduz esses efeitos. Os gráficos representam curvas concentração-efeito para fenilefrina (PE) (A, B, C, D) em aortas torácicas com e sem PVAT de animais RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/+} AIA, respectivos controles e WT AIA. (F) representa a área sob a curva dos respectivos grupos. Os resultados são apresentados como média ± E.P.M., (n=7). *Two-Way* anova seguido de teste de Bonferroni, p<0,05. (*) indica diferença significativa PVAT (+) vs. PVAT (-) do respectivo grupo.

5.9. Efeito da resistina nas alterações morfológicas da aorta e PVAT AIA

O conjunto de dados anteriores demonstra que a resistina contribui para a disfunção do PVAT na AIA. Assim, avaliamos se as alterações morfológicas também seriam afetadas.

A análise do diâmetro arterial não indicou diferença estatística significativa entre os grupos do estudo (Figura 11-A).

Não houve diferença na espessura arterial entre os grupos do estudo (Figura 11-B).

O diâmetro dos adipócitos também não apresentou alterações nos grupos experimentais (Figura 11-C).

Desta forma, a AIA não promove alterações morfológicas no PVAT, evidente nas imagens representativas (Figura 11-D). Porém, a AIA resulta na disfunção do PVAT, e a resistina contribuiu para este evento.

Questionamos, então, os possíveis mecanismos pelos quais a resistina poderia promover a disfunção do PVAT. Nosso próximo passo foi investigar a influência da resistina na modulação de mediadores inflamatórios e o aumento misto de macrófagos no PVAT na AIA.

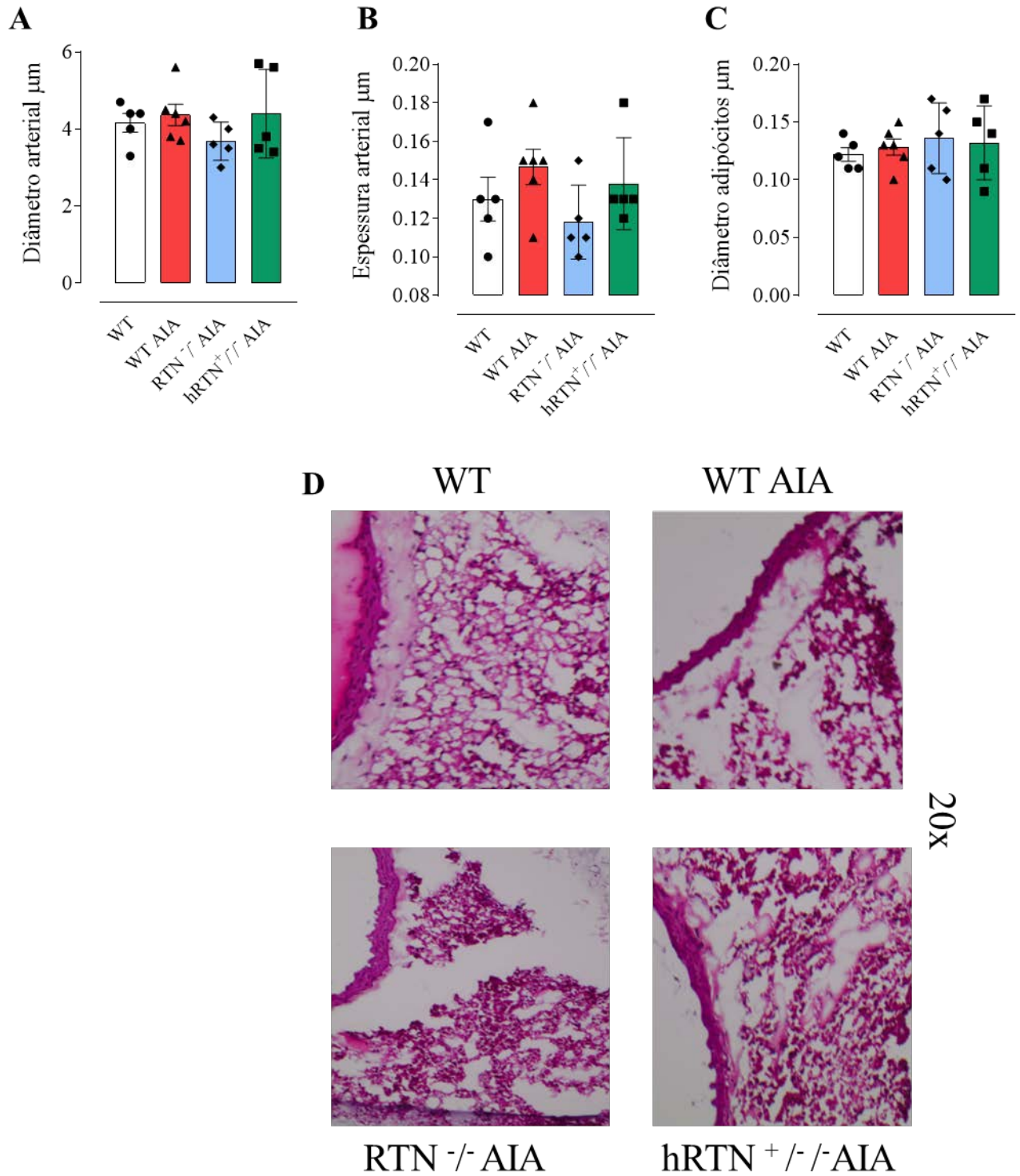


Figura 11. Artéria e PVAT não apresentam alterações morfológicas na AIA. Os gráficos representam o diâmetro arterial (A), espessura arterial (B), diâmetro dos adipócitos (C) em aortas torácicas com PVAT de animais RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/-} AIA, WT AIA e controle. (D) imagem representativa das aortas com PVAT dos grupos do estudo. Dados expressos em média \pm E.P.M., (n=3-6). *One-Way* anova seguido de teste Holm-Sidak.

5.10. Efeito da resistina expressão gênica de quimiocinas, citocinas e CAP1 no PVAT na AIA

O conjunto de dados anteriores demonstrou que a resistina contribui para a disfunção do PVAT na AIA. Investigamos se a liberação de mediadores inflamatórios e a resposta imunológica celular mediada por macrófagos contribui para a disfunção do PVAT. Desta forma, avaliamos a participação da resistina possivelmente via CAP1 na modulação dos mediadores inflamatórios de M1 e M2 no prejuízo da função do PVAT na AIA.

A resistina murina (*Retnl*) aumentou significativamente no grupo AIA comparado ao controle WT (Figura 12-A). A expressão de CAP1 foi igual no PVAT dos grupos do estudo (Figura 12-B).

A expressão dos genes indicadores de adesão leucocitária ICAM1 aumentou nos grupos WT AIA, *RTN^{-/-}* AIA, *hRTN^{+/-}* AIA comparados ao controle (Figura 12-C).

A expressão gênica de CCL2 aumentou no grupo *hRTN^{+/-}* AIA em comparação ao grupo WT AIA, *RTN^{-/-}* AIA e controle (Figura 12-D).

A expressão dos genes indicadores de macrófagos M1, IL-1 β e TNF- α , aumentou em animais *hRTN^{+/-}* AIA, comparada àquela do grupo WT AIA e *RTN^{-/-}* AIA e controle, enquanto a expressão destes marcadores em *RTN^{-/-}* AIA aumentou somente em relação ao grupo controle (Figuras 12- E, 12-F). A expressão do gene M1: iNOS (iNOS) aumentou em todos os grupos AIA em relação ao grupo controle (Figura 12-G). Em animais *hRTN^{+/-}* AIA houve aumento dos marcadores de macrófagos M2, CD206 e *Retnl*, em relação ao grupo WT AIA, *RTN^{-/-}* AIA e controle. Porém, não houve diferença na expressão gênica de CD206 e *Retnl* entre animais *RTN^{-/-}* AIA, WT AIA e controle (Figuras-12-H, 12-I).

Em conjunto, estes dados nos permitem sugerir que na AIA ocorre aumento dos mediadores inflamatórios da resposta imunológica celular mediada por macrófagos M1 e M2, e que a presença da resistina humana exacerba alguns destes mediadores em comparação aos grupos WT AIA, *RTN^{-/-}* AIA e controle. Animais que não expressam resistina não apresentam diferença estatística significativa destes mediadores inflamatórios comparado ao grupo WT AIA. A fim de verificar os dados de expressão gênica, realizamos análise da expressão proteica por ensaio Multiplex Luminex no PVAT dos grupos com artrite e controle.

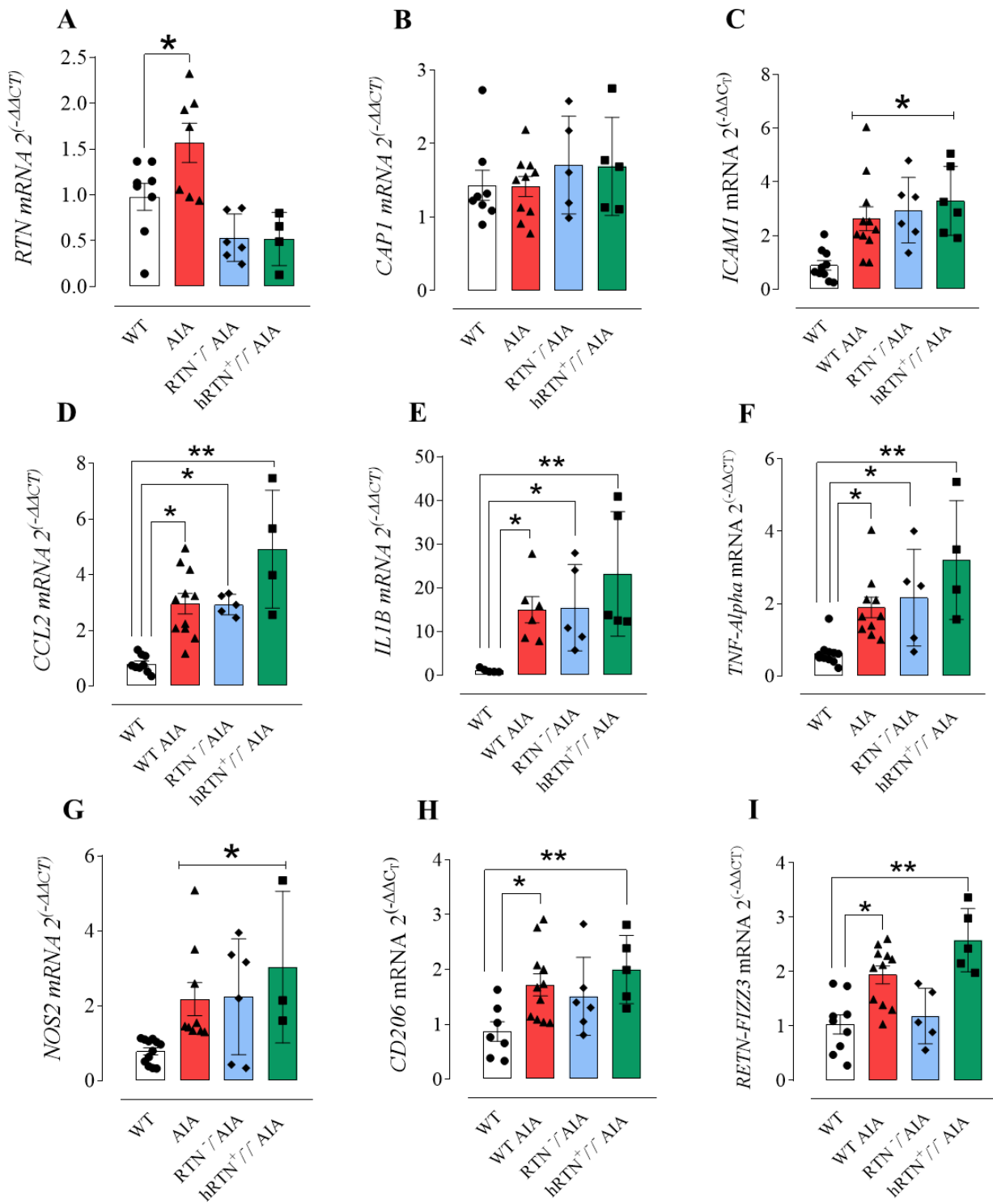


Figura 12. Expressão genica de mediadores inflamatórios de M1 e M2 estão aumentados no PVAT na AIA e estão amplificados no grupo $hRTN^{+/-}$ AIA. Os gráficos representam $2^{-\Delta\Delta Ct}$ do PVAT de animais WT AIA, $RTN^{-/-}$ AIA, $hRTN^{+/-}$ AIA, e WT controle. (A) *RTN*, (B) *CAP1*, (C) *ICAM1*, (D) *CCL2*, (E) *IL1B*, (F) *TNF-alpha*, (G) *NOS2*, (H) *CD206*, (I) *RETN-FIZZ3*. Dados expressos em média \pm E.P.M. One-Way anova seguido de teste Holm-Sidak. (n=5-11). (*) $P < 0,05$ vs. WT; (**) $P < 0,05$ vs. WT, WT AIA e $RTN^{-/-}$ AIA.

5.11. Efeito da resistina na concentração de quimiocinas e citocinas no PVAT na AIA

Em camundongos nocautes para resistina murina, mas que expressam resistina humana especificamente em monócitos e macrófagos, houve aumento da expressão de mediadores da resposta imune inflamatória mediada por macrófagos no PVAT do grupo com AIA.

Na AIA em animais WT houve aumento de quimiocinas CCL5, CCL2 e citocinas IL-1 β , IL-17, IL-6 e IL-10 e da adipocina adiponectina em comparação ao grupo controle WT (Figura 13-C, 13-E; 13-F, 13-G, 13-H, 13-I, 13-K, 13-L), enquanto ICAM, CCL3, TNF- α , IL-33, osteopontina, para VEGRF2 e angiopoetina não apresentaram aumento de expressão no PVAT de animais WT AIA, em comparação ao grupo controle (Figuras 13-B, 13-D, 13-J, 13-M, 13-N, 13-O).

As citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-6 e IL-10 estavam aumentadas no PVAT dos animais hRTN^{+/+} AIA, comparativamente ao grupo WT AIA e controle WT (Figuras 13- E, 13-G, 13-H, 13-I, 13-K, 13-L). A expressão de CCL2 e angiopoetina aumentou no PVAT de animais hRTN^{+/+} AIA em comparação ao grupo controle WT (Figuras 13- E, 12-L).

Os animais RTN^{-/-} não apresentaram aumento na expressão das quimiocinas, citocinas ou adipocinas analisadas em comparação aos grupos WT AIA, hRTN^{+/+} AIA e controle WT.

O aumento desses mediadores inflamatórios foi amplificado em animais que expressam resistina humana, enquanto animais que não expressam resistina apresentaram diminuição de quimiocinas, citocinas e adipocina no PVAT na AIA.

Diante dos dados obtidos, sugere-se que a AIA aumenta a expressão gênica e concentração proteica de marcadores inflamatórios, mais especificamente de quimiocinas e citocinas relacionados ao recrutamento e ativação de monócitos/macrófagos e de macrófagos M1 e M2. Estes mediadores inflamatórios apresentaram aumento pronunciado no grupo hRTN^{+/+} AIA, enquanto animais que não expressam resistina apresentaram diminuição destes marcadores. Portanto, nosso próximo passo foi analisar a concentração de marcadores inflamatórios no plasma e, posteriormente, avaliar se de fato os macrófagos do tipo M1 e M2 estariam aumentados no PVAT na AIA.

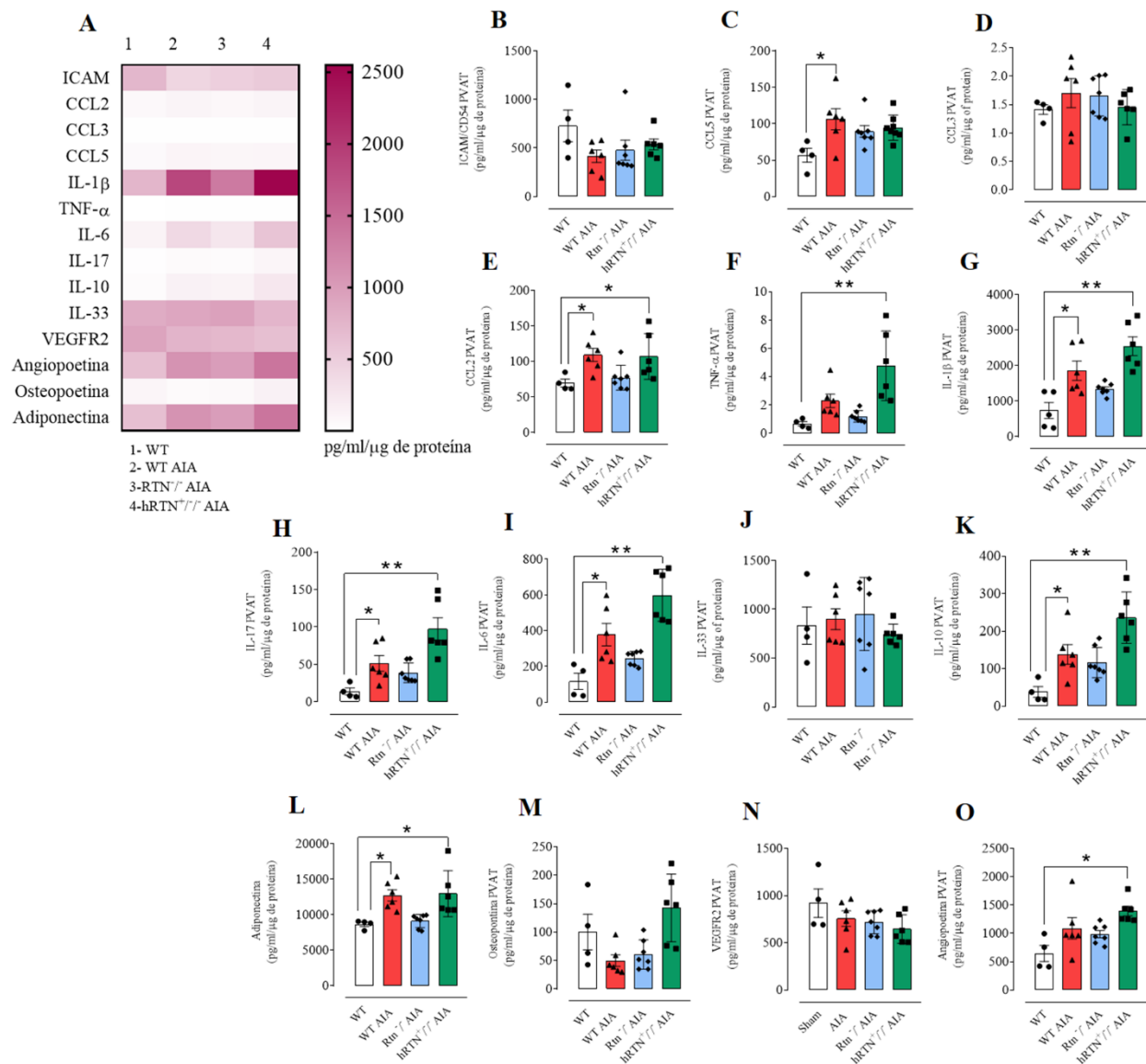


Figura 13. Mediadores inflamatórios e indicadores de M1 e M2 estão aumentados no PVAT na AIA e amplificados no grupo hRTN^{+/-} AIA. Os gráficos representam a concentração dos mediadores inflamatórios indicados no PVAT de animais WT AIA, RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/-} AIA, e WT controle. (A) *Heat-map* representativo da expressão dos analitos. (B) ICAM, (C) CCL5, (D) CCL3, (E) CCL2, (F) TNF- α , (G) IL-1 β , (H) IL-17, (I) IL-6, (J) IL-33, (K) IL-10, (L) adiponectina, (M) osteopontina, (N) VEGFR2 e (O) angiopoetina. Dados expressos em média \pm E.P.M. One-Way anova seguido de teste Holm-Sidak. (n=4-7). (*) P<0,05 vs. WT; (**) P<0,05 vs. WT, WT AIA e RTN^{-/-} AIA.

5.12. Efeito da resistina na concentração de quimiocinas e citocinas no plasma na AIA

As concentrações plasmáticas de ICAM, IL-6, IL-17, IL-10, angiopoetina e osteopontina aumentaram no plasma de animais WT AIA em comparação ao grupo controle WT (Figuras 14-A, 14-D, 14-E, 14-G).

Houve aumento das concentrações plasmáticas de ICAM, IL-17 e angiopoetina no plasma dos animais hRTN^{+/-} AIA em comparação ao grupo controle WT (Figuras 14-A, 14-E, 14-H).

Os animais RTN^{-/-} apresentaram aumento de angiopoetina em comparação ao grupo controle WT. Estes conjunto de resultados nos indica que a ausência da resistina também é capaz de modular negativamente citocinas pró-inflamatórias circulantes na AIA.

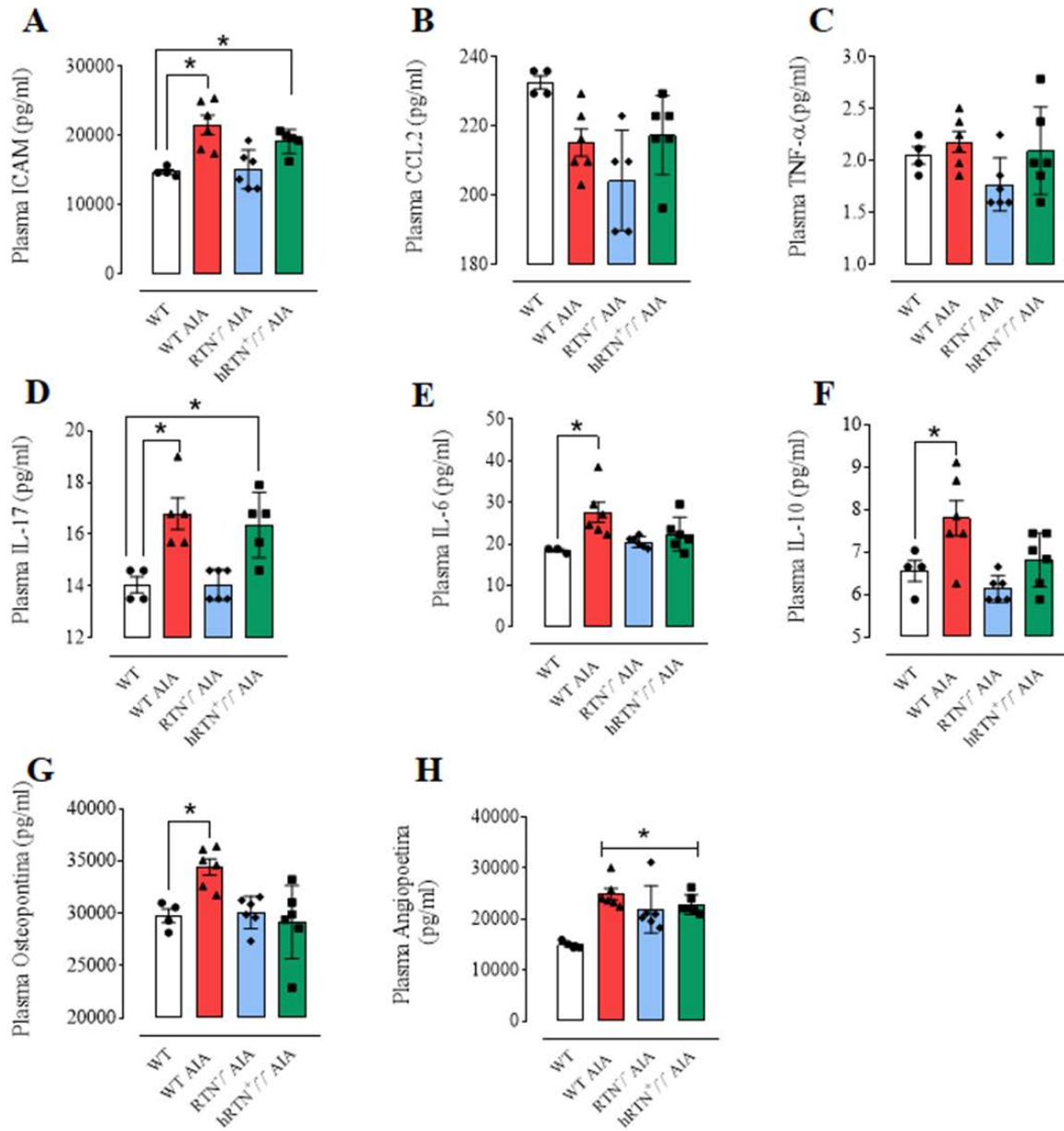


Figura 14. Mediadores inflamatórios plasmáticos na AIA. Os gráficos representam a concentração dos mediadores inflamatórios indicados no plasma de animais WT AIA, RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/+} AIA, e WT controle. (A) ICAM, (B) CCL2, (C) TNF-, (D) IL-17, (E) IL-6, (F) IL-10, (G) Osteopontina, (H) Angiopoeitina. Dados expressos em média \pm E.P.M. One-Way anova seguido de teste Holm-Sidak. (n=4-7). (*) P<0,05 vs. WT, n=4-6.

5.13. Efeito da resistina na celularidade de leucócitos e macrófagos no PVAT

A fim de confirmar os dados de expressão gênica e proteica, utilizamos citometria de fluxo para avaliar número absoluto de macrófagos no PVAT dos animais WT AIA, RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/-} AIA em comparação ao grupo controle WT.

Houve aumento no número absoluto de macrófagos M1 (F4/80⁺ CD11c⁺) nos grupos WT AIA, RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/-} AIA em comparação ao controle WT (Figuras 15-A, 14-B). Na população total de macrófagos, o número absoluto de M2 (F4/80⁺ CD206⁺) aumentou somente nos grupos RTN^{-/-} AIA, hRTN^{+/-} AIA comparados ao controle WT (Figuras 15-A, 14-C). O grupo RTN AIA não apresentou aumento de M2 comparado aos grupos do estudo (Figura- 15-A, 15-C).

Com o intuito de analisar se o receptor murino de CAP1 apresenta homologia com o humano e reatividade com o mesmo anti-corpo marcador, investigamos a frequência de CAP1 F4/80⁺, CAP1⁺ CD11c⁺ e CAP1⁺ CD206⁺(Figuras 16-A, 16-B, 15-C, 16-D).

Os animais hRTN^{+/-} AIA exibiram aumento da expressão de CAP1 em M1 e M2 comparados aos demais grupos do estudo. Este conjunto de resultados nos permite inferir que, além dos mediadores inflamatórios, também ocorre aumento na população total de macrófagos infiltrados no PVAT, e que a expressão do receptor CAP1, aumentada em M1 e M2, pode justificar o aumento dos mediadores inflamatórios observados anteriormente.

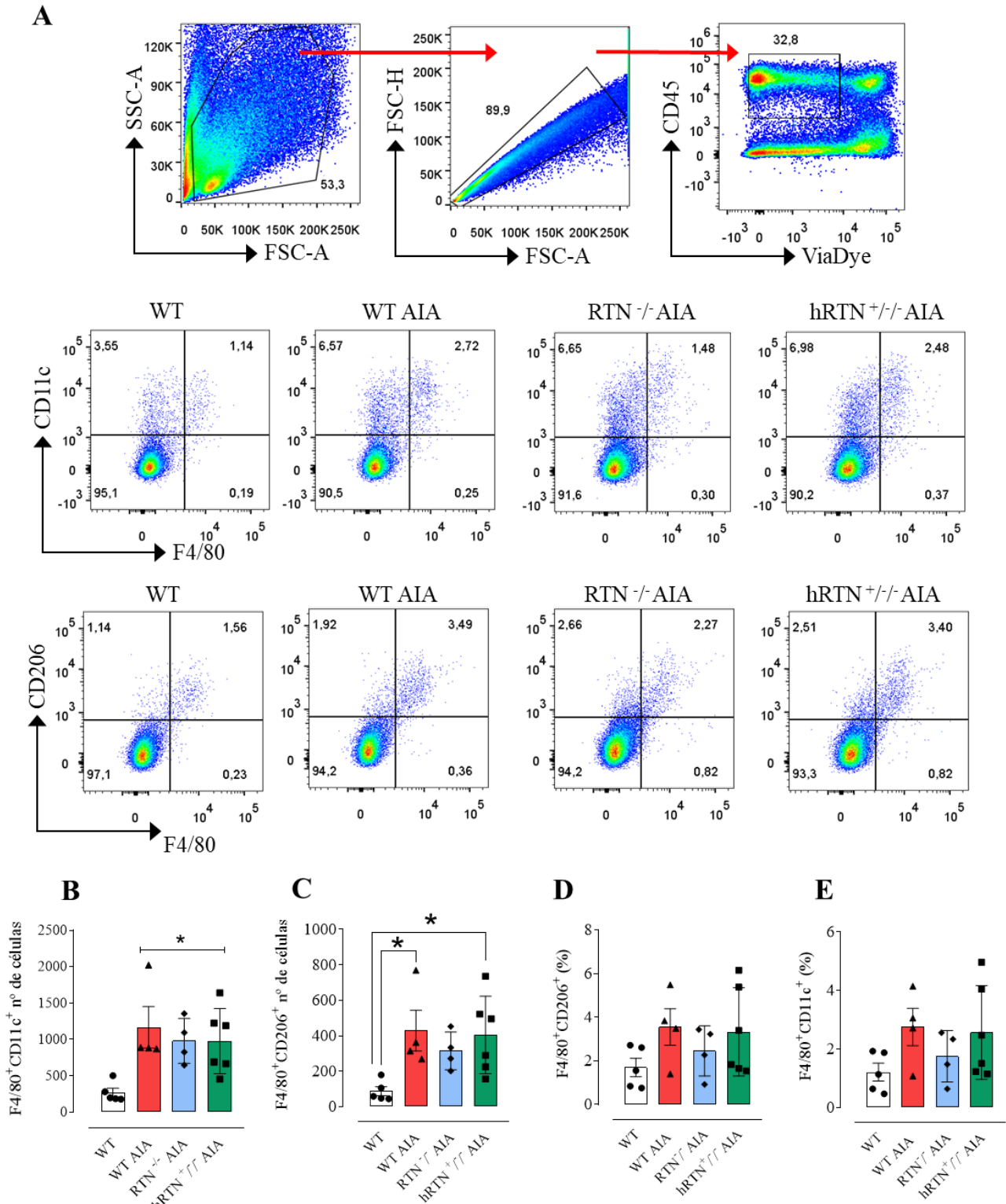


Figura 15. Macrófagos M1 estão aumentados no PVAT dos grupos AIA, enquanto macrófagos M2 estão aumentados somente nos grupos WT AIA e hRTN^{+/-} AIA comparados ao controle. Imagem representativa das estratégias de *gating* para analisar infiltrado de macrófagos no PVAT a partir de CD45⁺ e F4/80⁺ distinguindo entre M1 e M2. Os gráficos representam o número absoluto (B, C) e a frequência de células (D, E) para os marcadores de M1 (F4/80⁺ CD11c⁺) e de M2 (F4/80⁺ CD206⁺). Dados expressos em média ± E.P.M. One-Way anova seguido de teste Holm-Sidak, (n=4-6, pool de 2 animais por n). (*) P<0,05 vs. WT.

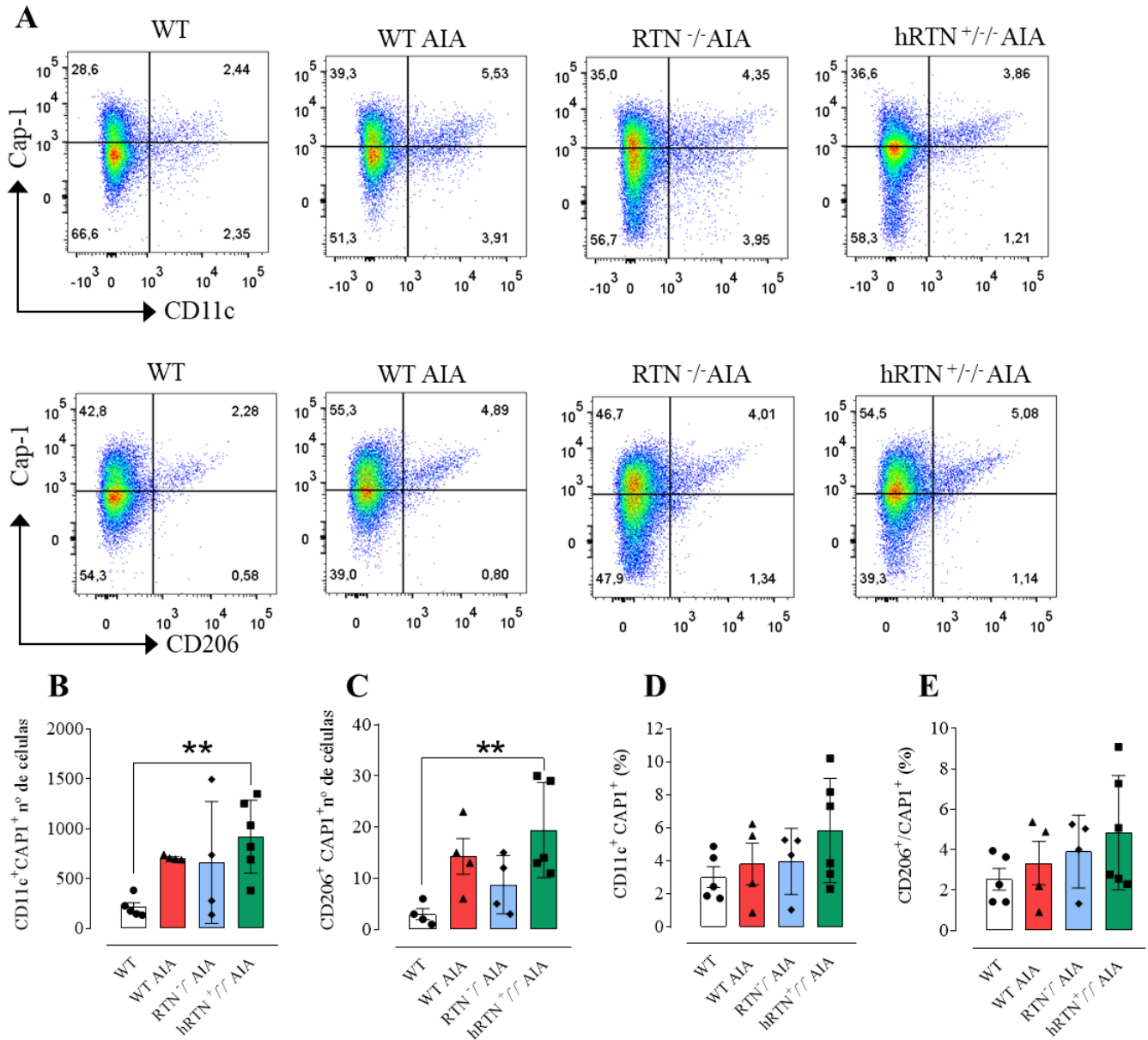


Figura 16. CAP1 está mais expresso em M1 e M2 do PVAT de animais hRTN^{+/-} AIA comparados ao controle. Imagem representativa das estratégias de gating para analisar infiltrado de macrófagos no PVAT a partir de CD45⁺ e F4/80⁺ distinguindo entre M1 e M2 e incluindo CAP1 (A). Os gráficos representam o número absoluto (B, C) e a frequência de células (D, E) para os marcadores de M1 (CD11c⁺ CAP1⁺) e de M2 (CD206⁺ CAP1⁺). Dados expressos em média ± E.P.M. *One-Way* anova seguido de teste Holm-Sidak. (n=4-6, pool de 2 animais por n). (*) P<0,05 vs. WT, (n=4-5, pool de 2 animais por n).

6.DISSCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou investigar se a resistina possivelmente via CAPI contribui para a disfunção do PVAT, pelo aumento de mediadores inflamatórios e recrutamento de macrófagos na vasculatura, em modelo experimental de AIA.

Primeiramente, buscamos validar o modelo experimental de AR em camundongos machos e fêmeas. Além de investigar a participação da resistina na AR experimental. A abordagem de utilização de um modelo de AIA recapitula a sinovite observada na AR com hiperplasia da sinóvia, infiltrado celular e perda óssea. O modelo mais crônico de AR experimental com múltiplas injeções intra-articulares permite investigar surtos decorrentes da doença e as recaídas observadas na prática clínica (JONES *et al.*, 2018).

Além disso, optar por um modelo crônico coincide com a prática clínica, pois pacientes com AR severa e não responsivos à primeira linha de tratamento apresentam maior DE e risco de DCV, associando este evento a inflamação local e sistêmica permanente (GALARRAGA *et al.*, 2010; OGDIE *et al.*, 2015). A DE também é maior em animais com severidade da AR experimental comparado a escores de AR leve ou moderada (TOTOSON *et al.*, 2016). A ativação persistente do sistema imunológico na AR leva a produção de auto-anticorpos, quimiocinas, citocinas, adipocinas e imuno-complexos que se originam de órgãos linfoides como linfonodos e baço, e também no tecido adiposo, que conseqüentemente acarretam inflamação da sinóvia, dano articular e ósseo. Estes mediadores inflamatórios não se limitam localmente na AR, atingem a circulação e passam a atuar em diversos órgãos e tecidos incluindo alterações na composição e função tecido adiposo e também disfunção da macro e micro-vasculatura (FERGUSON *et al.*, 2019).

O modelo experimental de AIA é dependente de do sistema imune adaptativo, mediada pela ativação de células T CD4+ e produção de IL-17, uma vez que a neutralização da citocina promove atenuação da doença (IRMLER *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2010). Demonstramos que a expressão de células CD4+ e IL-17 foi maior nos linfonodos inguinais de camundongos machos durante a imunização. Desta forma, a imunização funcionou nos animais gerando aumento da resposta inflamatória mediada por CD4+/IL17. O diâmetro articular, limiar nociceptivo a dor e escore da AR experimental não diferiram entre animais WT machos e fêmeas. Ademais, animais nocautes para resistina e resistina humanizados não reduziram os parâmetros de avaliação da AR experimental. Demonstramos assim, que a resistina murina ou humana não influencia no modelo de AIA crônico.

No contexto da AR, as adipocinas que contribuem para a regulação de vários processos metabólicos e também da resposta inflamatória local e sistêmica. As ações pró-inflamatórias da adipocina resistina são evidenciadas na AR. A injeção intra-articular de resistina no joelho de

camundongos machos e fêmeas induz artrite experimental, aumenta a migração de leucócitos e a expressão de IL-6 independentemente do sexo (BOKAREWA M., *et al.*, 2005). Em pacientes com AR concentrações plasmáticas e sinoviais de resistina correlacionam-se positivamente com o aumento de proteína C reativa (PCR) e com a atividade da doença (SENOLT *et al.*, 2007; FADDA *et al.*, 2013). Ademais, a expressão de CAP1 está aumentada nos macrófagos, fibroblastos e células endoteliais do tecido sinovial de pacientes com AR. No qual, o estímulo com resistina humana em fibroblastos do tipo sinoviócitos ou em condrócitos provenientes de pacientes com AR aumentou TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CCL2 (LEE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2010; SATO *et al.*, 2017). Em nosso estudo, as concentrações de resistina murina estavam aumentadas no plasma e PVAT de animais com AIA. Investigações futuras indicaram se a resistina humana também apresenta aumento da concentração em animais hRTN^{+/-} com AIA. Apesar dos estudos mencionados demonstrarem que a resistina humana contribui para a patogênese da AR, a ausência de resistina ou expressão de resistina humana não afetou AIA em um estado crônico.

A incidência de AR é maior em mulheres que em homens, e os hormônios sexuais, incluindo estrógeno e testosterona, têm funções imunomoduladoras que podem influenciar a maior incidência de AR em mulheres e/ou modificar a patogênese e a progressão da doença. Os hormônios sexuais também têm papel importante na regulação da resistina. Enquanto o estrógeno diminui a expressão de resistina *in vitro* e *in vivo*, ratas ovariectomizadas apresentaram aumento nas concentrações de resistina no tecido adiposo e soro (HUANG *et al.*, 2005; IWASA *et al.*, 2015). Por outro lado, a reposição com testosterona em homens com diabetes tipo II não altera as concentrações de resistina (KAPOOR *et al.*, 2007).

Embora a prevalência de DCV seja maior em homens, estudos relatam que mulheres com AR apresentam maior inflamação e distúrbios metabólicos, em comparação aos homens, predispondo ao maior risco de DCV (HU *et al.*, 2001; ARTS *et al.*, 2012). Neste contexto, estudos demonstram que mulheres apresentam maior severidade da doença, especialmente as que estão na menopausa ou atingem menopausa precoce devido ao aumento da inflamação, o que, por sua vez, predispõe ao maior risco de DCV (CHAE *et al.*, 2011; PFEIFER *et al.*, 2014). Entretanto, em estudo de meta-análise é demonstrado que o risco relativo de DCV é semelhante em mulheres e homens com AR (FRANSEN *et al.*, 2016). Desta forma, torna-se necessário investigar a relação entre DCV na AR abordando ambos os sexos, considerando as alterações fisiológicas do envelhecimento (FAVALLI *et al.*, 2019).

Nosso estudo demonstrou que a AIA em camundongos machos e fêmeas não diferem na severidade da doença e na disfunção vascular associada ao PVAT. Devido ao modelo escolhido ser de fase crônica, o acometimento da doença é igualável em ambos os sexos possivelmente pela duração

e intensidade do acometimento articular. Enquanto, em outros modelos de AR experimental como a CIA, a susceptibilidade e desenvolvimento da doença é maior em camundongos jovens machos comparados a fêmeas (MARINOV *et al.*, 2021). Por outro lado, a severidade da doença é igual em machos e fêmeas jovens com AIA, porém ao utilizar camundongos mais velhos (18 semanas), a severidade da AIA é maior em camundongos fêmeas (VAN BEUNINGEN *et al.*, 1989). Estes estudos indicam que diferenças hormonais e mudanças nas concentrações de hormônios decorrentes do envelhecimento podem influenciar diretamente no desenvolvimento e progressão da AR experimental e possivelmente nas alterações vasculares associadas à doença.

Demonstramos que no estágio de imunização, o PVAT ainda mantém o efeito anti-contrátil, ao passo que nos animais com acometimento articular severo, o efeito anti-contrátil do PVAT é completamente perdido. Ademais, o relaxamento dependente de endotélio é mantido funcional somente nas artérias com PVAT de animais imunizados, já nas artérias de animais com AIA a disfunção endotelial é presente na presença e ausência do PVAT. Porém, ao realizar curvas concentração-efeito para FE em artérias com PVAT e sem endotélio, a perda do efeito anti-contrátil persistiu nos animais com AIA, indicando que a hiporreatividade mediada pelo PVAT é independente do endotélio. Além disso, ao realizar curva concentração-efeito para o doador direto de NO, o NPS, a potência foi reduzida nas artérias com PVAT, demonstrando que existe um comprometimento na funcionalidade das CMLV mediado pelo NO.

O PVAT em condições fisiológicas tem seus efeitos anti-contráteis somados aos fatores relaxantes derivados de endotélio. Entretanto, em condições patológicas, o PVAT pode influenciar na função endotelial com prejuízo na resposta vasodilatadora. A transferência dos fatores relaxantes ou contráteis derivados do PVAT, liberação de citocinas, adipocinas e estresse oxidativo podem promover contração das CMLV e interferir no relaxamento vascular mediado pelo endotélio (MAN *et al.*, 2020). Por exemplo, a resistina reduz o relaxamento mediado por canais para potássio e para insulina em artérias mesentéricas (GENTILE *et al.*, 2018; SMALL *et al.*, 2019). Os fatores que contribuem para a disfunção endotelial mediada pelo PVAT em diferentes patologias também incluem o estresse oxidativo (KETONEN *et al.*, 2010), diminuição na biodisponibilidade de NO e desacoplamento da enzima conversora de óxido nítrico (eNOS) (NAKLADAL *et al.*, 2022), desbalanço na produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α (HORIMATSU *et al.*, 2018), leptina, adiponectina, omentina (FËSUS *et al.*, 2007; HOU *et al.*, 2017; LEANDRO *et al.*, 2021), sulfeto de hidrogênio (CACANYIOVA *et al.*, 2021), peróxido de hidrogênio (GAO *et al.*, 2005), angiotensina 1-7 (LEE *et al.*, 2009), angiotensina-2 (KAGOTA *et al.*, 2019), entre outros (AVASTHI *et al.*, 2017).

A disfunção endotelial (DE) compreende alterações no endotélio que promovem redução da

resposta vasodilatadora dependente de endotélio, alteração no estado redox, aumento do estado pró inflamatório, proliferativo e trombótico. Assim, a DE contribui ativamente para o desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares (DCV) (CASTRO-FERREIRA *et al.*, 2018).

Desde 1991, o comprometimento da função endotelial na AIA foi evidenciado com diminuição da resposta vasodilatadora à acetilcolina (FANG *et al.*, 1991). Desde então, uma série de estudos demonstram que ocorre DE na AIA em estágios iniciais ou crônicos. Por exemplo, o maior comprometimento da função endotelial reflete a gravidade ou maior cronicidade de indução da artrite experimental (PRATI *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2013). Na AIA em estágio crônico de 90 dias, a DE só foi observada em ratos com uma maior produção de mediadores inflamatórios como IL-1 β , TNF e redução da eNOS. O escore patológico de AR não diferiu entre animais com e sem DE, indicando que as citocinas pró-inflamatórias podem ser mais preditivas da DE que da severidade da doença. Os níveis sistêmicos e teciduais de citocinas pró-inflamatórias relacionam-se mais com a DE que a severidade da doença (TOTOSON *et al.*, 2016). A diminuição da atividade da doença não se correlaciona com a função endotelial em pacientes com AR, uma vez que pacientes em estado de remissão ainda apresentam DE (STOLINA *et al.*, 2009). Por outro lado, o tratamento com etanercept (anticorpo anti-TNF alfa), diclofenaco ou prednisolona possibilita melhora da atividade da doença, conseqüentemente proporcionam a diminuição do estresse oxidativo e redução de mediadores pró-inflamatórios, possibilitando a melhora da função endotelial na AIA (TOTOSON *et al.*, 2016, VERHOEVEN *et al.*, 2017; VERHOEVEN *et al.*, 2017).

Em uma revisão sistemática na literatura, os mecanismos comumente associados a DE na AR experimental incluem aumento da arginase, diminuição da L-arginina e tetraidrobiopterina (BH₄), desacoplamento da eNOS, estresse oxidativo e diminuição de enzimas antioxidantes, tromboxano e prostaciclina, além do aumento de receptores de angiotensina II e produtos da via da cicloxigenases mediante a estímulo hipertensivo por ANG-II (TOTOSON *et al.*, 2014). Demonstramos pela primeira vez que o PVAT promove resposta compensatória DE presente na fase inicial de imunização de aortas sem PVAT. No qual, nossos resultados demonstram que a fase de imunização é caracterizado por ativação imunológica dos linfonodos com aumento de CD4⁺ e IL-17. Entretanto, ainda é necessário investigar se ocorre aumento da resistina, de mediadores inflamatórios, citocinas, quimiocinas e até mesmo perfil celular no PVAT destes animais. Além de investigar quais seriam os possíveis fatores relaxantes derivados do PVAT nesta fase da doença. Porém, com a sinovite estabelecida na AIA essa a funcionalidade vascular é perdida. Além disso, a disfunção do PVAT e AIA independe do sexo. Assim, nos próximos experimentos de função vascular focamos na modulação do efeito anti-contrátil do PVAT em resposta ao agente vasoconstritor na AIA em camundongos machos.

As alterações na composição celular e molecular frente a patologias vasculares promovem desbalanço entre fatores pró e anti-contrátil, aumento de mediadores pró-inflamatórios e infiltrado de células imunes, com aumento na população de macrófagos e células T. Nossa hipótese era de que a resistina humana via CAP1 promoveria a disfunção do PVAT pelo aumento de macrófagos e dos seus mediadores inflamatórios na AIA. Observamos que as concentrações de resistina murina estavam aumentadas no PVAT e plasma de animais com AIA. A incubação de resistina murina em artérias com e sem PVAT resultou na perda do efeito anti-contrátil, similar ao observado em camundongos com AIA. Não obstante, a incubação com resistina humana em camundongos que não expressam resistina murina, mas que expressam resistina humana em monócitos/macrófagos também promoveu perda do efeito anti-contrátil, eventos similares observados em camundongos WT com AIA. Desta forma, observamos que tanto a resistina murina quanto a resistina humana poderiam contribuir para a disfunção do PVAT na AR.

A incubação de resistina murina em artérias com e sem PVAT de animais nocautes para TLR4 não afetou o efeito anti-contrátil. Este dado nos indica que as ações vasculares da resistina murina podem ser em parte mediadas pelo receptor TLR4. Uma vez que estudos anteriores indicavam a ação de altas doses de resistina promovem aumento da pressão arterial e resistência à insulina pelo aumento da expressão de angiotensinogênio via TLR4/p65. O tratamento com inibidor da enzima conversora de angiotensina reduziu a pressão arterial em animais infundidos com resistina (JIANG *et al.*, 2016). Além disso, em outro estudo a incubação com resistina murina em artérias mesentéricas por 30 min não afetou a resposta vasoconstritora à fenilefrina, mas afetou a resposta vasodilatadora dependente de endotélio. Diferente do estudo anterior, a infusão crônica de resistina em camundongos não causou aumento da pressão arterial ou batimentos cardíacos, porém alterou a sinalização substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) fosforilando Akt/eNOS e, conseqüentemente, diminuindo o vasorelaxamento dependente de NO (GENTILE *et al.*, 2008). Ademais, a incubação por 4 h com resistina murina causou prejuízo no relaxamento endotelial mediado pela ativação de canais para potássio. Estes eventos demonstraram-se importantes em artérias mesentéricas de ratas fêmeas que apresentaram menor vasorelaxamento mediado por canais para potássio de adenosina trifosfato (SMALL *et al.*, 2019).

Os fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio como peróxido de hidrogênio e abertura de canais para potássio predominam nas respostas de vasodilatação dependente de endotélio em artérias de pequeno calibre, ao passo que em artérias de grande calibre artérias de pequeno calibre é dependente da via do NO (SHIMOKAWA & GODO., 2019). Estudos demonstram que além de prejudicar fatores hiperpolarizantes derivados de endotélio, a resistina afeta a vasodilatação por aumentar produção de ânion superóxido, diminuir a expressão de catalase e superóxido dismutase,

reduzindo eNOS e produção de NO, além de reduzir prostaciclina (DICK *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2010). Os mecanismos associados a disfunção da eNOS incluem o estresse oxidativo e ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (p38) e c-Jun NH₂-terminal, quinase (JNK), além da ativação destas vias também estarem relacionadas a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (KOUGIAS *et al.*, 2005). Assim, a resistina promove estresse oxidativo e desregulação de fatores vasorelaxantes e vasoconstritores que contribuem para a disfunção do tono vascular em artérias de resistência e condutância.

Diferente da resistina murina, observamos que as ações da resistina humana não foram mediadas via TLR4. Pois, o estímulo de diferentes concentrações de resistina humana em células que permitem monitorar a ativação dos receptores TLR4/Nf- κ B pela produção da enzima SEAP não foi alterada comparada ao controle positivo com LPS. De acordo, ao silenciar receptores de TLR4 em monócitos e macrófagos, o estímulo com resistina humana ainda causou a liberação de citocinas pró-inflamatórias e migração celular. Porém, ao silenciar o receptor CAP1 nestas células, o aumento na produção de citocinas e migração celular foi abolido (LEE *et al.*, 2014). A inovação do nosso estudo foi em demonstrar que, as concentrações de resistina estavam aumentadas no PVAT e plasma de animais com AIA, e que em aortas torácicas a incubação com resistina murina ou humana reduziu a resposta vasoconstritora a FE com perda do efeito anti-contrátil do PVAT similar ao observado na AIA. Porém, ao utilizar camundongos RTN^{-/-} AIA a perda do efeito anti-contrátil do PVAT foi prevenida comparada aos animais hRTN^{+/-} AIA e WT AIA, independente da severidade da doença. Estes dados evidenciam o caráter translacional do nosso estudo, considerando que pacientes com acometimento extremo das articulações na AR ou com fatores de risco clássicos para DCV apresentam aumento das concentrações de resistina, correlacionando-se com o estado de ativação endotelial e inflamação sistêmica (DESSEIN *et al.*, 2013).

A resposta vasocontrátil está reduzida em artérias sem PVAT na CIA, em modelo crônico de artrite experimental induzida por pristano (AIP) e na AIA, porém não avaliaram a influencia da resistina nestes eventos (ÜLKER *et al.*, 2000; REYNOLDS *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2016; CHOUK *et al.*, 2019). Na CIA, a potência na resposta vasocontrátil a serotonina está reduzida, e a incubação com inibidor da iNOS, L-NAME ou inibidor da cicloxigenase (COX) não restaura a vasoconstrição em aortas sem PVAT. Estes dados, indicaram que outros fatores, por exemplo, aumento da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) podem mediar a disfunção contrátil observada (REYNOLDS *et al.*, 2012). Ao analisar a funcionalidade do PVAT na CIA é observado diminuição da potência de contração para serotonina com aumento de infiltrado celular de macrófagos (F4/80⁺) e neutrófilos (Ly6G⁺), mas não com o aumento de MMP-9 evidenciado no estudo anterior (WILLIAMS *et al.*, 2016). Na AIA a resposta vasocontrátil a FE em aortas sem PVAT também é

reduzida, porém no estágio mais avançado da doença. O tratamento nabumetona um inibidor da COX, com maior seletividade a COX2, restabelece a contração e diminui a atividade da doença (ÜLKER *et al.*, 2000). Entretanto, a resposta a outros agentes vasoconstritores como endotelina, norepinefrina e angiotensina-II não está alterada em aortas sem

PVAT de animais submetidos a AIA com estágio inicial da doença (PRATI *et al.*, 2012). Embora a AIA resulte em disfunção vascular, nenhum dos estudos realizados demonstrou aumento da pressão arterial em modelos experimentais de AR (KESSLER *et al.*, 2021). Porém, animais com AIA infundidos com ANG-II não apresentam piora na doença, mas apresentaram aumento da pressão arterial com desregulação do sistema renina-angiotensina, estresse oxidativo, disfunção endotelial, aumento na vasoconstrição e remodelamento vascular. O tratamento com losartan foi capaz de reduzir estes efeitos (SAKUTA *et al.*, 2010). Nossos dados corroboram com estudos anteriores que demonstraram diminuição do efeito anti-contrátil do PVAT. Porém buscamos entender se a resistina de fato, poderia mediar a disfunção do PVAT por influenciar em mediadores inflamatórios e perfil de macrófagos neste tecido na AIA.

A perda do efeito anti-contrátil do PVAT promove disfunção das CMLV e células endoteliais com conseqüente disfunção vascular. O prejuízo funcional do PVAT é mediado pela infiltração de células imunes, que podem se comunicar com adipócitos e células vasculares através da liberação de quimiocinas pró-inflamatórias comprometendo a resposta vascular funcional (BARP *et al.*, 2021). Além disso, frente a estímulos pró-inflamatórios, os macrófagos são ativados e produzem citocinas e quimiocinas que resultam na perda do efeito anti-contrátil do PVAT saudável (SHI *et al.*, 2021). Embora em condições inflamatórias os macrófagos tendam mais a polarizar para um fenótipo M1 pró-inflamatório com liberação de IL-1 β , TNF- α , CCL2 e iNOS, a população de M2 com fenótipo anti-inflamatório pode estar reduzida ou até mesmo sofrer mudanças fenotípicas do estado de polarização M2 para M1, alterando a plasticidade fenotípica entre inflamatória e estados não inflamatórios de acordo com a persistência dos estímulos presentes em cada patologia (CLÁRIA *et al.*, 2011). O desbalanço desses componentes, tanto imunológicos quanto dos próprios adipócitos, afeta células musculares lisas vasculares e células endoteliais e resulta na disfunção vascular (CHEN *et al.*, 2021).

Estudos recentes indicam que as alterações do PVAT na AR experimental não afetam o diâmetro arterial, porém aumentam a vacuolidade dos adipócitos e infiltrado de leucócitos, que se deve em parte pelo aumento da expressão gênica mista de macrófagos M1 e M2 e galectina-3 em modelo de CIA (WILLIAMS, J. *et al.*, 2016; SIME *et al.*, 2017). Em nosso estudo, não observamos alterações estruturais nas artérias e no diâmetro dos adipócitos do PVAT dos animais com AIA

comparado ao controle. Porém, ao avaliar marcadores de M1 e M2 observamos aumento misto destes marcadores no PVAT dos animais WT com AIA, no qual o aumento gênico destes mediadores foi ainda maior no grupo hRTN^{+/-} AIA incluindo CCL2, IL-1 β , TNF- α , CD206 e resistina do tipo alfa. Além da expressão gênica, a concentração de quimiocinas e citocinas estavam aumentadas no PVAT de animais hRTN^{+/-} AIA comparado ao WT AIA. Os marcadores inflamatórios incluíram TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6 e IL-17 e no grupo hRTN^{+/-} AIA comparado ao WT AIA. Além do aumento de CCL2, e angiopoetina no PVAT dos animais hRTN^{+/-} AIA comparado ao controle WT. As concentrações de adiponectina estavam aumentadas em ambos os grupos com AIA.

A quimiocina CCL2 promove aumento da infiltração de monócitos/macrófagos no tecido adiposo em condições inflamatórias e contribui para a disfunção do PVAT por a liberação de citocinas pró-inflamatórias no tecido (KANDA *et al.*, 2006). Possivelmente os animais hRTN^{+/-} AIA poderiam ter maior recrutamento de macrófagos comparado aos outros grupos do estudo, nos quais foram determinados nos experimentos posteriores. Além disso, animais resistina humanizados apresentaram aumento de angiopoetina, que induz inflamação do tecido adiposo por aumentar o contato das células endoteliais com monócitos aumentando a sinalização via integrina ou por sua liberação por macrófagos (TABATA *et al.*, 2009). Além disso, as concentrações de angiopoetina estão aumentadas em pacientes com AR com DCV (WESTRA *et al.*, 2011).

Nossos achados vão ao encontro aos elucidados na literatura, nos quais citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-6 provenientes do tecido adiposo ou majoritariamente de macrófagos M1 geram disfunção do tecido adiposo e possivelmente do PVAT, aumentando a inflamação vascular, em condições inflamatórias crônicas (CHEN *et al.*, 2021). Ademais, a resistina humana promove aumento da expressão de CCL2, IL-1 β , TNF- α e IL-6 em célula mononuclear do sangue periférico (PBMCs) (KASER *et al.*, 2003). Por exemplo, as concentrações plasmáticas de adiponectina estão reduzidas na fase aguda e aumentadas na fase crônica em modelo experimental de artrite induzida por pristano. Indicamos que o mesmo evento pode ocorrer a nível local do PVAT na AIA. Embora a IL-10 seja diretamente relacionada à resposta anti-inflamatória mediada por M2, não contribui para o efeito anti-contrátil do PVAT, mas atua na tentativa de reduzir a inflamação local e possivelmente o dano ao PVAT em condições inflamatórias (KUMAR *et al.*, 2021). Ademais, a produção de IL-17 pelos linfócitos T CD4⁺ no PVAT também está associada à disfunção do PVAT em doenças como a hipertensão arterial (BROERE *et al.*, 2011).

Desta forma, os macrófagos contribuem para liberação de quimiocinas e citocinas que aumentam a resposta inflamatória, aumentam a ativação de células T, e a interação destas respostas pode regular reciprocamente a infiltração de macrófagos PVAT e continuar a promover a disfunção

deste tecido (NOSALSKI & GUZIK *et al.*, 2017). A nível circulante, encontramos que ICAM1 importante para o recrutamento de leucócitos a sítios de inflamação estava aumentado juntamente IL-17 no plasma de animais hRTN^{+/+} AIA e WT AIA. Observamos que a nível sistêmico, IL-6, IL-10, osteopontina e angiopoetina estavam aumentados nos animais WT AIA comparado aos outros grupos do estudo. Estes marcadores inflamatórios são amplamente conhecidos por mediar a resposta imunológica na AR, especialmente em condições crônicas da doença. Estes dados indicam, que a inflamação do PVAT na AR foi maior a nível local que sistêmico nos animais hRTN^{+/+} AIA que comparado aos animais WT AIA e aos RTN^{-/-} AIA.

Demonstramos que estas quimiocinas e citocinas inflamatórias estão presentes em maior quantidade no PVAT de animais hRTN^{+/+} AIA comparados ao WT AIA. Ao passo que animais RTN^{-/-} AIA não apresentaram aumento nas concentrações de marcadores inflamatórios associados ao recrutamento de macrófagos, inflamação celular e angiogênese. Desta forma, elucidamos pela primeira vez que a proteção do efeito anti-contrátil do PVAT em animais RTN^{-/-} AIA comparado aos hRTN^{+/+} AIA e WT AIA se deve em parte pela menor produção de mediadores inflamatórios que contribuem para a disfunção do PVAT e conseqüente, disfunção vascular. Nosso próximo passo foi investigar se de fato a expressão celular de macrófagos no PVAT dos animais com AIA estariam aumentados em relação ao controle.

Não obstante, demonstramos que marcadores de M1 (F480⁺/CD11c⁺) estão aumentados nos animais WT AIA, RTN^{-/-} AIA e hRTN^{+/+} AIA. Enquanto marcadores de M2 (F480⁺/CD206⁺) estão aumentados somente nos grupos WT AIA e hRTN^{+/+} AIA. Porém, a expressão de CAP1 está aumentada somente em M1 e M2 do grupo hRTN^{+/+} AIA. Estes dados indicam que, embora a expressão de M1 esteja igual entre os grupos, o receptor CAP1 está mais expresso nas células M1 e M2 do grupo hRTN^{+/+} AIA, indicando que o aumento dos mediadores inflamatórios produzidos por estas células no PVAT pode ser mediado pelo aumento da interação da resistina humana com o receptor CAP1. Uma vez que apesar de animais RTN^{-/-} AIA apresentarem aumento de M1, os mediadores inflamatórios não estão com concentração exacerbada como identificado nos hRTN^{+/+} AIA, e também não apresentam aumento de CAP1 em macrófagos. Em animais WT AIA foi observado um aumento dos mediadores de M1 e M2 que condizem com os achados anteriores, reforçados pelos celulares da citometria de fluxo.

Estudos anteriores, demonstraram que a resistina humana gera inflamação do TAM por aumentar citocinas, quimiocinas relacionadas a macrófagos, IL-1 β , TNF- α , CCL2 e marcador celular CD86 em modelo experimental de obesidade (QATANI *et al.*, 2009). A ligação de resistina via CAP1 promove aumento cAMP que, por sua vez, ativa PKA e o NF- κ B com produção de citocinas pró-inflamatórias. Em camundongos transgênicos nocautes para resistina murina e que expressam resistina humana em monócitos (hRTN^{+/+}), a expressão reduzida de CAP1 nestas células levou à

redução da inflamação no tecido adiposo em animais obesos, ao passo que o aumento da expressão de CAP1 em monócitos resultou em maior inflamação do tecido adiposo (LEE, S. *et al.*, 2014). Este estudo indica que a interação resistina humana CAP1 é responsável pelo aumento da inflamação mediada por macrófagos no tecido adiposo na obesidade. Em outro estudo recente, ensaios de ligação receptor demonstraram que o celastrol inibe a interação resistina humana com CAP1 e, conseqüentemente, suprime a via de sinalização mediada por cAMP-PKA- NF- κ B reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos *in vitro* e *in vivo* (ZHU *et al.*, 2021). Entretanto, ao testarem esta abordagem *in vivo*, utilizaram animais que não expressam resistina humana, mas que expressam a resistina murina, tornado complexo elucidar se de fato o celastrol atua como antagonista do CAP1 e gera menor inflamação por reduzir a interação resistina humana-CAP1 ou se estes efeitos são decorrentes de outras vias atribuídas a droga. Ademais, o uso de celastrol é reportado em diversos estudos que incluem melhora da AR em humanos e em modelo experimental (TAO *et al.*, 2002; CASCÃO *et al.*, 2012). Porém, as ações anti-inflamatórias do celastrol são diversas e amplamente justificadas por atuar como antagonista do TLR4, interferindo na resposta imune inata e adaptativa, bem como em seus mediadores inflamatórios (CASCÃO *et al.*, 2017). Assim, estudos que envolvam a resistina humana investigando se o celastrol via CAP1 reduz a AR, bem como seus efeitos na vasculatura serviram para elucidar a possível ação terapêutica do celastrol nesta via em específico. Ademais, estudos recentes demonstram que pacientes com AR apresentam alteração na composição de gordura comparado a massa corporal, com aumento de macrófagos M1 com estrutura do tipo coroa e células B no tecido adiposo, maior sensibilidade a insulina, aumento de proteínas citrulinadas e auto-anticorpos, aumento de adipocinas como a resistina, leptina, visfatina e citocinas pró-inflamatórias, e conseqüente aumento da atividade da doença e DCV. Estes eventos resultam em diferenciação prejudicada dos adipócitos, com alteração no perfil celular e inflamatório, associados a resistência ao tratamento convencional, nos quais podem ser revertidos ao serem tratados com agentes biológicos (GILES *et al.*, 2018; ARIAS-DE LA ROSA *et al.*, 2022).

Nosso estudo foi o primeiro a demonstrar a importância do PVAT para manutenção da função vascular na imunização precedente a AIA, pois as artérias com PVAT ainda mantêm a vasodilatação neste estágio da doença, além de manter seu efeito anti-contrátil. Entretanto, ao ocorrer o acometimento articular na AIA, o PVAT torna-se completamente disfuncional com perda do efeito anti-contrátil. A disfunção do PVAT e severidade da AIA é mantida em camundongos machos e fêmeas. Além disso, dados inovadores do nosso estudo demonstraram que a resistina murina e resistina humana participam da disfunção do PVAT na AIA. Uma vez que ao utilizar animais que não expressam a resistina, a disfunção do PVAT e mediadores inflamatórios são atenuados na AIA. Enquanto, animais que expressam resistina humana em monócitos e macrófagos, o PVAT permanece disfuncional, com aumento de mediadores inflamatórios na AIA. Demonstramos também, que os

macrófagos M1 e M2 são possíveis mediadores da inflamação no PVAT na AIA. Em macrófagos M1 e M2 de animais resistina humanizados, a expressão de CAP1 é maior comparado aos demais grupos do estudo. Assim, abordagens terapêuticas que visem a neutralização da resistina humana ou do seu receptor CAP1 poderão contribuir para a melhora da função vascular na AR. A elucidação das vias diretamente envolvidas nas ações da resistina humana via CAP1 promovendo a disfunção do PVAT ainda são objetos de estudo futuros. Em conjunto, o estudo realizado servirá como fomento translacional para futuras investigações que busquem entender ou até mesmo para fornecer novos alvos terapêuticos, a exemplo a resistina, para a disfunção vascular na AR.

7.CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho possibilitam inferir que a resistina humana possivelmente via CAP1 promove a disfunção do PVAT pelo aumento misto de macrófagos M1 e M2 e de seus mediadores inflamatórios, contribuindo assim para a disfunção vascular na AIA.

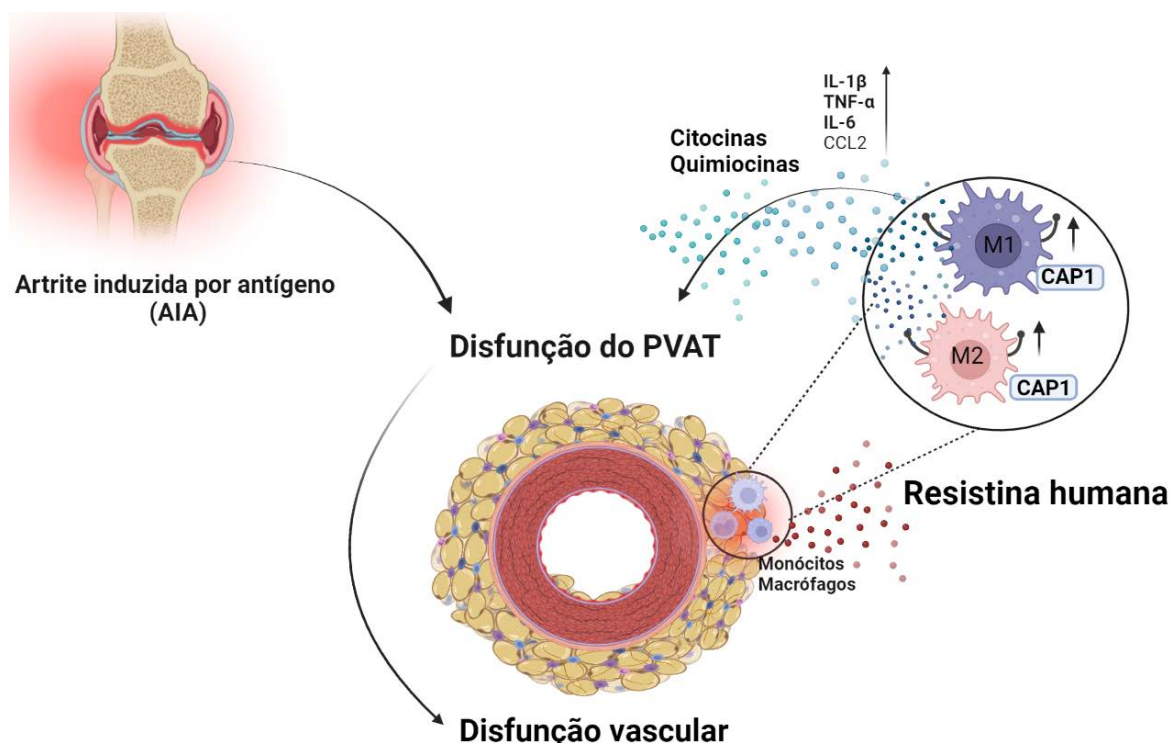


Figura 17. Esquema representativo da conclusão do estudo. Artrite induzida por antígeno (AIA), CAP1 (proteína associada a adenilato ciclase 1), M1 (macrófagos do tipo 1) e M2 (macrófagos do tipo 2), IL-1 β (interleucina 1 beta), IL-6 (interleucina 6), CCL2 (proteína quimioatraente de monócitos 1), PVAT (tecido adiposo perivascular), TNF- α (fator de necrose tumoral alfa).

7. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL HANNAN, F.; CULLIGAN, Kevin Gerard. Human resistin and the RELM of Inflammation in diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2015.
- ALETAHA, D.; SMOLEN, J. S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: a review. **Jama**, v. 320, n. 13, p. 1360-1372, 2018.
- ARGNANI, L. et al. Rheumatoid arthritis and cardiovascular risk: Retrospective matched-cohort analysis based on the RECORD study of the italian society for rheumatology. **Frontiers in medicine**, v. 8, 2021.
- ARIAS-DE LA ROSA, I., et al. "Pathogenic mechanisms involving the interplay between adipose tissue and auto-antibodies in rheumatoid arthritis." **Iscience** 25.9 (2022): 104893.
- ARTS, E. et al. High-density lipoprotein cholesterol subfractions HDL2 and HDL3 are reduced in women with rheumatoid arthritis and may augment the cardiovascular risk of women with RA: a cross-sectional study. **Arthritis research & therapy**, v. 14, n. 3, p. R116, 2012.
- AVASTHI, A. EDUCATIONAL QUALIFICATIONS. **Journal of Pharmacology**, v. 13, p. 552-562, 2017.
- BARP, C. G.; BONAVENTURA, D.; ASSREUY, J. NO, ROS, RAS, and PVAT: more than a soup of letters. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 108, 2021.
- BENOMAR, Y. et al. Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. **Diabetes**, v. 62, n. 1, p. 102-114, 2013.
- BOKAREWA, M. et al. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 9, p. 5789-5795, 2005.
- BROERE, F. et al. T cell subsets and T cell-mediated immunity: Principles of Immunopharmacology (Nijkamp, FP and Parnham, MJ Eds.). 2011.
- BROWN, N. K. et al. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 34, n. 8, p. 1621-1630, 2014.
- CACANYIOVA, S. et al. The vasoactive role of perivascular adipose tissue and the sulfide signaling pathway in a nonobese model of metabolic syndrome. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 108, 2021
- CALABRESI, E. et al. One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, v. 36, n. 2, p. 175-184, 2018.
- CASTRO-FERREIRA, R. et al. The role of endothelial dysfunction and inflammation in chronic venous disease. **Annals of vascular surgery**, v. 46, p. 380-393, 2018.
- CHAE, C. U.; DERBY, C. A. The menopausal transition and cardiovascular risk. **Obstetrics and Gynecology Clinics**, v. 38, n. 3, p. 477-488, 2011.
- CHANG, L et al. Perivascular adipose tissue regulates vascular function by targeting vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 40, n. 5, p. 1094-1109, 2020.
- CHEN, C. et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 299, n. 1, p. H193-H201, 2010.
- CHEN, Y. et al. Role of inflammation in vascular disease-related perivascular adipose tissue dysfunction. **Frontiers in Endocrinology**, p. 957, 2021.
- CHOUK, M. et al. Pristane-induced arthritis in dark Agouti rat is a relevant model for mimicking vascular dysfunction and lipid paradox in rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 86, n. 4, p. 483-490, 2019.
- CLÀRIA, J. et al. New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by

endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators. **Frontiers in immunology**, v. 2, p. 49, 2011.

COSTA, R. M. et al. Perivascular adipose tissue as a relevant fat depot for cardiovascular risk in obesity. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 253, 2018.

DADOUN, S. et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2013.

DAQUINAG, A. C. et al. An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. **Cell stem cell**, v. 9, n. 1, p. 74-86, 2011.

DEL RINCÓN, I. et al. High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 44, n. 12, p. 2737-2745, 2001.

DESSEIN, P. H. et al. Independent relationship between circulating resistin concentrations and endothelial activation in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 9, p. 1586-1588, 2013.

DICK, G. M. et al. Resistin impairs endothelium-dependent dilation to bradykinin, but not acetylcholine, in the coronary circulation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 6, p. H2997-H3002, 2006.

FADDA, S. M. H. et al. Resistin in inflammatory and degenerative rheumatologic diseases. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v. 72, n. 6, p. 594-600, 2013.

FANG, Z. Y. et al. Alterations of the endothelial function of isolated aortae in rats with adjuvant arthritis. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 311, p. 122-130, 1991.

FATEL, E. C. de S. et al. Adipokines in rheumatoid arthritis. **Advances in Rheumatology**, v. 58, 2019.

FAVALLI, E. G. et al. Sex and management of rheumatoid arthritis. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 56, n. 3, p. 333-345, 2019.

FERGUSON, L. D. et al. Cardiometabolic comorbidities in RA and PsA: lessons learned and future directions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 8, p. 461-474, 2019.

FÉSÜS, G. et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. **Cardiovascular research**, v. 75, n. 4, p. 719-727, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M.H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 50, n. 2, p. 216-229, Abril, 2006.

FRANSEN, J. et al. Rheumatoid arthritis disadvantages younger patients for cardiovascular diseases: a meta-analysis. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157360, 2016.

GALARRAGA, B. et al. Clinical improvement in rheumatoid arthritis is associated with healthier microvascular function in patients who respond to antirheumatic therapy. **The Journal of rheumatology**, v. 37, n. 3, p. 521-528, 2010.

GÁLVEZ, B. et al. Perivascular adipose tissue and mesenteric vascular function in spontaneously hypertensive rats. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 6, p. 1297-1302, 2006.

GAO, Y. et al. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. **Cardiovascular research**, v. 71, n. 2, p. 363-373, 2006.

GAO, Y. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-dependent contracting factor in rat renal artery. **British journal of pharmacology**, v. 146, n. 8, p. 1061-1068, 2005.

GENTILE, M. T. et al. Resistin impairs insulin-evoked vasodilation. **Diabetes**, v. 57, n. 3, p. 577-583, 2008.

GHOSH, S. et al. The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. **Gene**, v. 305, n. 1, p. 27-34, 2003.

GHOSH, S. et al. The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. **Gene**, v. 305, n. 1, p. 27-34, 2003.

- GILES, J. T., et al. "Adipose Tissue Macrophages in Rheumatoid Arthritis: Prevalence, Disease-Related Indicators, and Associations With Cardiometabolic Risk Factors." *Arthritis Care & Research* 70.2 (2018): 175-184.
- GOLLASCH, M.; DUBROVSKA, G.. Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone. **Trends in pharmacological sciences**, v. 25, n. 12, p. 647-653, 2004.
- GROSS, J. B. et al. Synovial fluid levels of adipokines in osteoarthritis: association with local factors of inflammation and cartilage maintenance. **Bio-medical materials and engineering**, v. 24, n. s1, p. 17-25, 2014.
- GRIGORAS, A. et al. Perivascular adipose tissue in cardiovascular diseases-an update. **Anatolian Journal of Cardiology**, v. 22, n. 5, p. 219, 2019.
- 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, 2007.
- GUZIK, T. J.; MANGALAT, D.; KORBUT, R. Adipocytokines novel link between inflammation. **J. Physiol. Pharmacol**, v. 4, p. 505-528, 2006.
- HARMS, M; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature medicine**, v. 19, n. 10, p. 1252, 2013.
- HE, M. et al. Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: The Role of Monocyte Chemotactic Protein-1–Induced Protein. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 33, n. 6, p. 1384-1391, 2013.
- HILDEBRAND, S.; STÜMER, J.; PFEIFER, A. PVAT and its relation to brown, beige, and white adipose tissue in development and function. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 70, 2018.
- HORIMATSU, T. et al. Remote effects of transplanted perivascular adipose tissue on endothelial function and atherosclerosis. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 32, n. 5, p. 503-510, 2018.
- HOU, N. et al. Irisin regulates heme oxygenase-1/adiponectin axis in perivascular adipose tissue and improves endothelial dysfunction in diet-induced obese mice. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 603-614, 2017.
- HSIEH, Y.Y. et al. Resistin-induced stromal cell-derived factor-1 expression through Toll-like receptor 4 and activation of p38 MAPK/NFκB signaling pathway in gastric cancer cells. **Journal of biomedical science**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2014.
- HU, F. B. et al. The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up. **Archives of internal medicine**, v. 161, n. 14, p. 1717-1723, 2001.
- HUANG, S. W. et al. Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. **FEBS letters**, v. 579, n. 2, p. 449-454, 2005.
- IGNACAK, A. et al. Prolactin—not only lactotrophin. A “new” view of the “old” hormone. **J Physiol Pharmacol**, v. 63, n. 5, p. 435-43, 2012.
- IRMLER, I. M.; GAJDA, M.; BRÄUER, R.. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-γ-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 6228-6236, 2007.
- IWASA, T. et al. The effects of ovariectomy and LPS-induced endotoxemia on resistin levels in female rats. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 558-560, 2015.
- JAMALUDDIN, M. S. et al. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 3, p. 622-632, 2012.
- JANG, J. C. et al. Human resistin protects against endotoxic shock by blocking LPS–TLR4 interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 48, p. E10399-E10408, 2017.
- JAYASINGAM, S. D. et al. Evaluating the polarization of tumor-associated macrophages into M1 and M2 phenotypes in human cancer tissue: technicalities and challenges in routine clinical practice. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1512, 2020.
- JIANG, Y. et al. Resistin induces hypertension and insulin resistance in mice via a TLR4-dependent pathway. **Scientific reports**, v. 6, p. 22193, 2016.
-

- JONES, G. W. et al. In vivo models for inflammatory arthritis. In: **Inflammation and Cancer**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 101-118.
- KAGOTA, S. et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist azilsartan restores vascular reactivity through a perivascular adipose tissue-independent mechanism in rats with metabolic syndrome. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 33, n. 5, p. 501-509, 2019.
- KANDA, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 6, p. 1494-1505, 2006.
- KAPOOR, D. et al. The effect of testosterone replacement therapy on adipocytokines and C-reactive protein in hypogonadal men with type 2 diabetes. **European Journal of Endocrinology**, v. 156, n. 5, p. 595-602, 2007.
- KASER, S. et al. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 309, n. 2, p. 286-290, 2003.
- KESSLER, J. et al. Animal models to study pathogenesis and treatments of cardiac disorders in rheumatoid arthritis: Advances and challenges for clinical translation. **Pharmacological Research**, v. 170, p. 105494, 2021.
- KETONEN, J. et al. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. **Circulation Journal**, v. 74, n. 7, p. 1479-1487, 2010.
- KOUGIAS, P. et al. Adipocyte-derived cytokine resistin causes endothelial dysfunction of porcine coronary arteries. **Journal of vascular surgery**, v. 41, n. 4, p. 691-698, 2005.
- KUMAR, R. K. et al. Interleukin-10 does not contribute to the anti-contractile nature of PVAT in health. **Vascular Pharmacology**, v. 138, p. 106838, 2021.
- LEANDRO, A. et al. Omentin: A novel therapeutic approach for the treatment of endothelial dysfunction in type 2 diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 162, p. 233-242, 2021.
- LEE, J. H. et al. Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 17, n. 5, p. 613-620, 2009.
- LEE, R. MKW et al. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. **Journal of hypertension**, v. 27, n. 4, p. 782-790, 2009.
- LEE, S. et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. **Cell metabolism**, v. 19, n. 3, p. 484-497, 2014.
- LIAN, X.; GOLLASCH, M.. A clinical perspective: contribution of dysfunctional perivascular adipose tissue (PVAT) to cardiovascular risk. **Current hypertension reports**, v. 18, n. 11, p. 1-9, 2016.
- LÖHN, M. et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 9, p. 1057-1063, 2002.
- MAN, A. WC et al. Perivascular adipose tissue as a target for antioxidant therapy for cardiovascular complications. **Antioxidants**, v. 9, n. 7, p. 574, 2020.
- MARINOV, L.; MANGAROV, I.; NIKOLOVA, I.. Gender differences in collagen-induced arthritis (CIA) in mice. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, n. 1, p. 1899-1905, 2021.
- MCINNES, B.; SCHETT, G.. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205-2219, 2011.
- MITIDIERI, E. et al. The Role of Perivascular Adipose Tissue-Derived Hydrogen Sulfide in the Control of Vascular Homeostasis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 37, n. 1-3, p. 84-97, 2022.
- MOON, J. et al. Brown adipose tissue ameliorates autoimmune arthritis via inhibition of Th17 cells. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.
- MURPHY, C. S.; LIAW, L.; REAGAN, Michaela R. In vitro tissue-engineered adipose constructs for modeling disease. **BMC biomedical engineering**, v. 1, n. 1, p. 1-19, 2019.
- MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, v. 11,

n. 11, p. 723, 2011.

NAKLADAL, D. et al. Perivascular adipose tissue-derived nitric oxide compensates endothelial dysfunction in aged pre-atherosclerotic apolipoprotein E-deficient rats. **Vascular pharmacology**, v. 142, p. 106945, 2022.

NALBANT, S.; BIRLIK, A. M.. Cytokines in rheumatoid arthritis (RA). Rijeka, Croatia: IntechOpen, 2017.

NOSALSKI, R.; GUZIK, T J. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 20, p. 3496-3513, 2017.

OGDIE, A. et al. Risk of major cardiovascular events in patients with psoriatic arthritis, psoriasis and rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 74, n. 2, p. 326-332, 2015.

OMRAN, F.; CHRISTIAN, M.. Inflammatory signaling and brown fat activity. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, p. 156, 2020.

PFEIFER, E. C. et al. The influence of early menopause on cardiovascular risk in women with rheumatoid arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 41, n. 7, p. 1270-1275, 2014.

PINTO, L. G. et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 247-256, 2010.

PINE, G. M.; BATUGEDARA, H. M.; NAIR, M. G. Here, there and everywhere: Resistin-like molecules in infection, inflammation, and metabolic disorders. **Cytokine**, v. 110, p. 442-451, 2018.

PRADO, D. S. et al. NLRP12 controls arthritis severity by acting as a checkpoint inhibitor of Th17 cell differentiation. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 8, p. 10907-10919, 2020.

PRATI, C. et al. Endothelial dysfunction in rat adjuvant-induced arthritis: Up-regulation of the vascular arginase pathway. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 8, p. 2309-2317, 2011.

PRATI, C. et al. Treatment with the arginase inhibitor N w-hydroxy-nor-L-arginine restores endothelial function in rat adjuvant-induced arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 14, n. 3, p. R130, 2012.

PROVAN, S. A. et al. Trends in all-cause and cardiovascular mortality in patients with incident rheumatoid arthritis: a 20-year follow-up matched case-cohort study. **Rheumatology**, v. 59, n. 3, p. 505-512, 2020.

QATANANI, M. et al. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 3, p. 531-539, 2009.

RAMIREZ, J. G.; O'MALLEY, E. J.; HO, W. S. V. Pro-contractile effects of perivascular fat in health and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 20, p. 3482-3495, 2017.

REYNOLDS, S. L. et al. Contractile, but not endothelial, dysfunction in early inflammatory arthritis: a possible role for matrix metalloproteinase-9. **British journal of pharmacology**, v. 167, n. 3, p. 505-514, 2012.

SÁNCHEZ-SOLANA, B. et al. Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. **Molecular endocrinology**, v. 26, n. 1, p. 110-127, 2012.

SATO, H. et al. Resistin upregulates chemokine production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 19, n. 1, p. 263, 2017.

SCHINNERLING, K. et al. Humanized mouse models of rheumatoid arthritis for studies on immunopathogenesis and preclinical testing of cell-based therapies. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 203, 2019.

SCHNEIDER, A. H. et al. Neutrophil extracellular traps mediate joint hyperalgesia induced by immune inflammation. **Rheumatology**, v. 60, n. 7, p. 3461-3473, 2021.

SENNA, E. R. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *The Journal of rheumatology*, v. 31, n. 3, p. 594-597, 2004. Peschken, C. A. & Esdaile, J. M. Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples. **Semin. Arthritis Rheum.** 28, 368–391 (1999).

ŠENOLT, L et al. Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66, n. 4, p. 458-463, 2007.

- SHABANI, M. et al. Resveratrol alleviates obesity-induced skeletal muscle inflammation via decreasing M1 macrophage polarization and increasing the regulatory T cell population. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- SHI, H. et al. Perivascular adipose tissue in autoimmune rheumatic diseases. **Pharmacological Research**, p. 106354, 2022.
- SHI, H.; KIM, H. W.; WEINTRAUB, N. L. Macrophage immunometabolism in perivascular adipose tissue. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 41, n. 2, p. 731-733, 2021.
- SHIMOKAWA, H.; GODO, S. Nitric oxide and endothelium-dependent hyperpolarization mediated by hydrogen peroxide in health and disease. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 127, n. 2, p. 92-101, 2020.
- SILSWAL, N. et al. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-12 in macrophages by NF- κ B-dependent pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 334, n. 4, p. 1092-1101, 2005.
- SIME, K.; CHOY, E.H.; WILLIAMS, A. S. Alterations to adipose tissue morphology during inflammatory arthritis is indicative of vasculopathology in DBA/1 mice. **Adipocyte**, v. 6, n. 2, p. 87-101, 2017.
- SMALL, H. Y. et al. Resistin Mediates Sex-Dependent Effects of Perivascular Adipose Tissue on Vascular Function in the Shrsp. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 6897, 2019.
- 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, 1991.
- STEPPAN, C. M. et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307, 2001.
- STOLINA, M. et al. The evolving systemic and local biomarker milieu at different stages of disease progression in rat adjuvant-induced arthritis. **Journal of clinical immunology**, v. 29, n. 2, p. 158, 2009.
- SUN, H. et al. Role of endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the link between inflammation and hydrogen sulfide. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 1568, 2020.
- TABATA, M. et al. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. **Cell metabolism**, v. 10, n. 3, p. 178-188, 2009.
- TARKOWSKI, A. et al. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 6b, p. 1419-1431, 2010.
- TOTOSON, P. et al. Endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: mechanistic insights and correlation with circulating markers of systemic inflammation. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146744, 2016.
- TOTOSON, P. et al. Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. **Arthritis research & therapy**, v. 16, n. 1, p. 202, 2014.
- TOTOSON, P- et al. Etanercept improves endothelial function via pleiotropic effects in rat adjuvant-induced arthritis. **Rheumatology**, v. 55, n. 7, p. 1308-1317, 2016.
- TROUW, L. A., et al. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 6, p. 331, 2017.
- ÜLKER, S. et al. Effect of nabumetone treatment on vascular responses of the thoracic aorta in rat experimental arthritis. **Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 136-142, 2000.
- VAN BEUNINGEN, H. M. et al. Age-and sex-related differences in antigen-induced arthritis in C57Bl/10 mice. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 32, n. 6, p. 789-794, 1989.
- VAN DEN HOEK, J. et al. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study. **Rheumatology international**, v. 37, n. 4, p. 487-493, 2017.
- VAN HALM, V. P. et al. Rheumatoid arthritis versus diabetes as a risk factor for cardiovascular disease: a cross-sectional study, the CARRE Investigation. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, n. 9, p. 1395-1400, 2009.
- VERHOEVEN, F. et al. Glucocorticoids improve endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in rats with adjuvant-induced arthritis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 188, n. 2, p. 208-218, 2017.
-

VERHOEVEN, F. et al. Diclofenac but not celecoxib improves endothelial function in rheumatoid arthritis: a study in adjuvant-induced arthritis. **Atherosclerosis**, v. 266, p. 136-144, 2017.

WESTRA, J. et al. Angiotensin-2 is highly correlated with inflammation and disease activity in recent-onset rheumatoid arthritis and could be predictive for cardiovascular disease. **Rheumatology**, v. 50, n. 4, p. 665-673, 2011.

WIDMER, R. J.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. **Global Cardiology Science and Practice**, v. 2014, n. 3, p. 43, 2014.

WILLIAMS, J. O. et al. Characterization of death receptor 3-dependent aortic changes during inflammatory arthritis. **Pharmacology research & perspectives**, v. 4, n. 4, p. e00240, 2016.

YANG, S. et al. Macrophage polarization in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 501, p. 142-146, 2020.

YE, L. et al. Systematic review of robust experimental models of rheumatoid arthritis for basic research. **Digital Chinese Medicine**, v. 4, n. 4, p. 262-272, 2021.

ZEGKOS, T.; KITAS, G.; DIMITROULAS, T.. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: assessment, management and next steps. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 8, n. 3, p. 86-101, 2016.

ZHANG, Z. et al. Resistin induces expression of proinflammatory cytokines and chemokines in human articular chondrocytes via transcription and messenger RNA stabilization. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 7, p. 1993-2003, 2010.

ZHAO, C. et al. An Update on the Emerging Role of Resistin on the Pathogenesis of Osteoarthritis. **Mediators of inflammation**, v. 2019, 2019.

ZHU, Y. et al. Celastrol targets adenylyl cyclase-associated protein 1 to reduce macrophages-mediated inflammation and ameliorates high fat diet-induced metabolic syndrome in mice. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 5, p. 1200-1212, 2021.

ANEXO



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



A U T O R I Z A Ç Ã O


A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“Papel da resistina via cap1 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em modelo experimental de artrite reumatoide”*, registrado com o número do protocolo **015/2020**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), 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). O Protocolo foi **APROVADO ad referendum** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em 14 de outubro de 2022.

Colaboradores: Aline Garcia Fedoce
Flávio Protásio Veras

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			14/10/2022 a 23/03/2023	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / C57Bl 6	88	25g / 42 dias	Macho	Serviço de Biotério
Camundongo / Retn -/-	88	25g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de RBI e Biocel
Camundongo / hRTN+/-/-	88	25g / 42 dias	Macho	Biotério do Departamento de RBI e Biocel

Ribeirão Preto, 14 de outubro de 2022


Prof. Dr. Luiz Carlos C. Navegantes
Coordenador da CEUA/FMRP-USP