UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Contribuição da interleucina 33 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

RAFAEL MENEZES DA COSTA

RIBEIRÃO PRETO-SP

2018

RAFAEL MENEZES DA COSTA

Contribuição da interleucina 33 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica

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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

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

RIBEIRÃO PRETO-SP

2018

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.

Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP
Universidade de São Paulo
Ficha Catalográfica

Costa, Rafael Menezes da.

Contribuição da interleucina 33 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. Ribeirão Preto, 2018. 91 p., 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Tostes, Rita de Cássia

1. Função vascular.
2. Tecido adiposo perivascular.
3. Interleucina 33.
4. Células T reguladoras.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Rafael Menezes da Costa

Título: Contribuição da interleucina 33 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

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

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Examinador(a): Assinatura: _____
Nome: _____
Instituição: _____

Dedicatória

À Deus pelo dom da vida, saúde e pela concessão de sabedoria e
discernimento para as decisões tomadas até aqui!

À minha mãe Anete Menezes e ao meu irmão José Ricardo:

Os alicerces e exemplos para que eu conseguisse continuar
minha caminhada. Obrigado por tudo!

Agradecimentos

Acreditar não significa estar livre de momentos difíceis, mas ter a força para enfrentar sabendo que não estamos sozinhos!

À Deus acima de todas as coisas!

Sou imensamente grato à minha família, minha mãe Anete e meu irmão Ricardo, pelo amor, confiança, incentivo e compreensão que tiveram durante todos esses anos no qual estive fora de casa.

À todos os membros da família Menezes, família Costa. As orações, palavras de incentivo, afago e carinho me mantiveram firme nessa jornada.

À Prof^a. Dr^a. Rita Tostes pelo acolhimento em seu laboratório, pelo incentivo e orientação exemplar. Sem dúvidas você foi essencial para minha formação pessoal e acadêmica.

Ao Prof. Dr. José Carlos Filho e seu aluno Douglas do laboratório de Imunofarmacologia pelas sugestões e auxílio nos experimentos de imunologia celular.

À banca examinadora pelas críticas e sugestões que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Juliano, meu muito obrigado pela amizade e companheirismo. O doutorado e a vida não seriam completos sem os seus conselhos e também seu carinho. Obrigado por tudo!

Ao longo desses anos de aprendizado a presença de grandes amigos foi fundamental, mesmo distante fisicamente. Agradeço imensamente pelo amor incondicional, incentivo, conselhos, lágrimas e sorrisos que tive dos meus melhores Fabi, Iza, Kalil e Fred. Obrigado pelo companheirismo e pela amizade que me fizeram crescer e superar cada desafio.

Aos amigos Aline, Jéssica, Paulo e Jonathas pelo convívio e por tornarem Ribeirão Preto e o Ap. 21 mais divertidos.

Aos amigos de laboratório: Fernando, Vânia, Thiago Bruder, Fernanda, Josi, Emiliana, Diane, Sara, Karla Bianca, Rhéure, Camila Zanotto, Marcondes, Thiago Dias, Nathanne, Camila André, Rafael, Júlio, Pedro, Aline, Allan, Dobby, Ju, Carla Pavan e Fabíola, pela colaboração, pelos ensinamentos e pelo convívio agradável.

Aos funcionários do departamento de farmacologia da FMRP-USP, em especial à Soninha, Fátima Helena, Ramon, Gislaine, Eliana e Eleni pelo carinho e atenção.

Ao apoio financeiro da FAPESP (2016/14078-0), CNPq e CAPES.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho o meu muito obrigado!!

*“Às vezes ouço passar o vento; e só de ouvir o vento passar,
vale a pena ter nascido.”*

Fernando Pessoa

*“Até onde posso vou deixando o melhor de mim... Se alguém
não viu, foi porque não me sentiu com o coração.”*

Clarice Lispector

Resumo

COSTA, RM. Contribuição da interleucina 33 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica. 2018. 91 p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A obesidade desencadeia mudanças funcionais no tecido adiposo perivascular (PVAT), favorecendo a liberação de fatores vasoconstritores e consequente ativação de mecanismos contráteis em células vasculares. A sinalização da interleucina 33 (IL-33) via receptor ST2 é essencial para o desenvolvimento e manutenção de células T reguladoras (Tregs) no tecido adiposo visceral. Na obesidade a função das Tregs é comprometida, resultando em estresse oxidativo e inflamação do tecido adiposo. No presente estudo testamos a hipótese que dieta rica em gordura diminui os níveis e a função da IL-33 no PVAT, levando à diminuição do número e função de Tregs, estresse oxidativo e inflamação neste tecido. Camundongos deficientes para o receptor ST2 (ST2 KO) e seus respectivos controles (Balb/C) receberam dieta controle ou hiperlipídica (HFD, *high fat diet*) durante 18 semanas. A função vascular foi avaliada em anéis de artérias mesentéricas, em presença ou ausência de PVAT, realizando-se curvas concentração-efeito para fenilefrina. Os seguintes grupos experimentais foram analisados: Controle PVAT (-), Controle PVAT (+), HFD PVAT (-) e HFD PVAT (+). Em artérias de camundongos Balb/C que receberam dieta controle, o PVAT diminuiu a resposta contrátil a fenilefrina. No entanto, HFD promoveu perda parcial do efeito anticontrátil promovido por este tecido. Em camundongos ST2 KO que receberam dieta controle, o PVAT diminuiu a resposta contrátil a fenilefrina. No entanto, a ausência de receptores ST2 em camundongos que receberam HFD levou à perda completa do efeito anticontrátil do PVAT. Houve diminuição do número de Tregs e aumento do número de neutrófilos no PVAT de camundongos alimentados com HFD. A incubação com IL-33 recombinante não reverteu a perda do efeito anticontrátil do PVAT promovido pela HFD. Aumento nos níveis séricos e teciduais de IL-6, bem como redução nos níveis de IL-10, foram observados em animais ST2 KO. Houve aumento nos níveis de ânion superóxido no PVAT de camundongos Balb/C alimentados com HFD e a ausência do receptor ST2 potencializou este efeito. Estes dados, analisados em conjunto, indicam que HFD compromete o papel modulador do PVAT e que IL-33 via receptor ST2 tem fundamental importância para a função do PVAT nesta condição experimental.

Palavras-chave: Tecido adiposo perivascular, dieta hiperlipídica, interleucina 33, células T reguladoras, função vascular.

Abstract

COSTA, RM. Interleukin 33 contributes to vascular functional changes mediated by the perivascular adipose tissue in mice submitted to high-fat diet. 2018. 91 p. Thesis (Doctor in Pharmacology) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2018.

Obesity triggers functional changes in the perivascular adipose tissue (PVAT), favoring the release of vasoconstrictor factors. Interleukin-33 (IL-33) signaling, via ST2 receptor, is essential for the development and maintenance of regulatory T cells (Tregs) in the visceral adipose tissue. In obesity, Tregs function is compromised, resulting in adipose tissue inflammation. We hypothesized that high fat diet (HFD) decreases the number and function of Tregs and increases inflammation in the PVAT. Mice deficient for the ST2 receptor (ST2 KO) and their respective controls (Balb/C mice) were fed a control diet or a HFD for 18 weeks. Vascular function was evaluated in mesenteric resistance arteries, by performing concentration-effect curves to phenylephrine (PE). In Balb/C mice fed the control diet, PVAT decreased vascular PE contractions. However, a partial loss of PVAT anticontractile effect occurred in arteries from HFD-fed Balb/C mice. In arteries from ST2 KO mice fed the control diet, PVAT decreased PE contractions. However, a complete loss of PVAT anticontractile effects was observed in HFD-fed ST2 KO mice. There was a decrease in the number of Tregs and an increase in the number of neutrophils in the PVAT of mice fed the HFD. The absence of the IL-33 receptor increased IL-6 and reduced IL-10 in HFD-fed mice. There was an increase in superoxide anion levels in the PVAT of Balb/C mice fed HFD and the absence of the ST2 receptor potentiated this effect. These data show that HFD promotes PVAT dysfunction and IL-33 is fundamental to counteract HFD-induced PVAT dysfunction.

Key words: Perivascular adipose tissue, high fat diet, interleukin 33, regulatory T cells, vascular reactivity.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ACh	acetilcolina
ADRFs	fator relaxante derivado da adventícia (<i>adventitium-derived relaxing factor</i>)
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina trifosfato
Ca²⁺	cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMLV	células de músculo liso vascular
DCV	doença cardiovascular
DMSO	dimetilsulfóxido
E.P.M.	erro padrão da média
EC₅₀	concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo
Emáx	resposta máxima
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
EROs	espécies reativas de oxigênio
FE	fenilefrina
Foxp3	fator de transcrição <i>forkhead box protein P3</i>
GCs	guanilato ciclase solúvel
GMPc	monofosfato cíclico de guanosina
HFD	dieta hiperlipídica (<i>high fat diet</i>)
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
IL-1β	interleucina 1β
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-33	interleucina 33
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
K⁺	potássio
KCl	cloreto de potássio
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos
mN	miliNewton
NZO	camundongos obesos Neozelandeses (<i>New Zealand Obese mice</i>)
O₂	oxigênio
O₂⁻	ânion superóxido
pD₂	logaritmo negativo da concentração efetiva do agonista que produz 50% do efeito máximo

PAI-1	inibidor do ativador de plasminogênio 1
PVAT	tecido adiposo perivascular (<i>perivascular adipose tissue</i>)
PVRFs	fator relaxante derivado do PVAT (<i>PVAT-Derived Relaxing Factor</i>)
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
TAV	tecido adiposo visceral
Tiron	4,5-dihidroxi- ácido 1,3-benzenodisulfônico dissódico monohidratado
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TOTG	teste oral de tolerância à glicose
Tregs	células T reguladoras

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismos pelos quais a disfunção sistêmica do tecido adiposo perivascular poderia levar ao desenvolvimento de disfunção vascular na obesidade	26
Figura 2. Esquema representativo da hipótese deste estudo	37
Figura 3. A dieta hiperlipídica compromete parâmetros bioquímicos em camundongos Balb/C e <i>knockouts</i> para o receptor ST2	50
Figura 4. Dieta hiperlipídica promove disfunção do tecido adiposo perivascular e compromete a modulação da função contrátil	52
Figura 5. Valores de Emáx para contração induzida por fenilefrina	53
Figura 6. Dieta hiperlipídica promove disfunção do tecido adiposo perivascular e compromete o relaxamento vascular	55
Figura 7. Valores de Emáx para relaxamento induzido por acetilcolina	56
Figura 8. A dieta hiperlipídica aumenta os níveis de IL-33 no plasma e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C	57
Figura 9. A dieta hiperlipídica aumenta os níveis de ST2 solúvel no plasma e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C	59
Figura 10. IL-33 <i>in vitro</i> não restaura o efeito anticontrátil do PVAT em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica	61
Figura 11. Valores de Emáx para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina	62
Figura 12. Dieta hiperlipídica promove diminuição de Tregs no PVAT	63
Figura 13. Dieta hiperlipídica promove aumento de neutrófilos no PVAT	64
Figura 14. A ausência do receptor para IL-33 exacerba o aumento de IL-6 e redução de IL-10 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica	65
Figura 15. A ausência do receptor para IL-33 exacerba o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio no PVAT de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica	67

Figura 16. Tiron *in vitro* restaura o efeito anticontrátil do PVAT em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica 69

Figura 17. Valores de E_{max} para contração induzida por fenilefrina 70

Lista de tabelas

Tabela 1. Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2 alimentados com dieta controle ou hiperlipídica 53

Tabela 2. Valores de pD_2 para relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2 alimentados com dieta controle ou hiperlipídica 56

Tabela 3. Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C alimentados com dieta controle ou hiperlipídica 62

Tabela 4. Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2 alimentados com dieta controle ou hiperlipídica 70

Sumário

Introdução	24
Obesidade e risco cardiovascular	25
Tecido adiposo perivascular e a disfunção vascular na obesidade	28
Inflamação no tecido adiposo perivascular: um <i>link</i> entre interleucina 33 e células T reguladoras	32
Justificativa e hipótese	36
Objetivos	38
Objetivo geral	39
Objetivos específicos	39
Materiais e métodos	40
Animais	41
Dosagens bioquímicas	41
Estudo da reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência	42
Quantificação protéica por Western Blotting no PVAT	43
Citometria de fluxo	44
ELISA	45
Dosagem da enzima mieloperoxidase no PVAT	46
Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio no PVAT	46
Análise estatística	47
Resultados	48
Caracterização do modelo experimental	49
Efeito da dieta hiperlipídica sobre a resposta contrátil à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência	51
Efeito da dieta hiperlipídica sobre a resposta relaxante à acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência	54
Efeito da dieta hiperlipídica sobre os níveis de IL-33 plasmáticos e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência	57
Efeito da dieta hiperlipídica sobre os níveis do receptor ST2 plasmáticos e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência	58

Efeito da IL-33 sobre as respostas contrátil e relaxante de artérias mesentéricas de resistência	60
Efeito da dieta hiperlipídica sobre o número de Tregs no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência	63
Efeito da dieta hiperlipídica sobre o perfil neutrofílico no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência	64
Efeito da dieta hiperlipídica sobre os níveis de citocinas plasmáticas e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência	65
Efeito da dieta hiperlipídica sobre a geração de espécies reativas de oxigênio no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência	66
Contribuição da geração de espécies reativas de oxigênio para os efeitos da dieta hiperlipídica na função do PVAT de artérias mesentéricas de resistência	68
Discussão	71
Conclusão	78
Referências bibliográficas	80
Anexos	90

Introdução

Obesidade e risco cardiovascular

A obesidade é uma condição fisiopatológica crônica que surge como consequência do desequilíbrio entre a oferta abundante de calorias provenientes da dieta e nível limitado de atividade física, favorecendo os depósitos de gordura corporal (Kopelman, P.G. 2000). Tal condição também pode ser influenciada por fatores genéticos que interagem entre si, além de interagirem com diversos fatores ambientais e sociais, tais como estresse, sedentarismo, tabagismo e etilismo (Boutin, P. e Froguel, P. 2001).

O desenvolvimento de uma pandemia mundial de sobrepeso e obesidade tem sido alvo de interesse da comunidade científica. A Organização Mundial da Saúde (2016) estima que mais de 650 milhões de adultos no mundo estejam obesos e que este valor aumente em até 30% em 2020. Tais estatísticas são alarmantes e podem significar gigantesco ônus à sociedade, considerando que a obesidade está associada a várias outras comorbidades como osteoartrite, depressão, câncer, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias e fatores de riscos para doenças cardiovasculares como a aterosclerose e a hipertensão arterial (Brown, W.V. *et al.* 2009).

A obesidade como fator de risco para complicações cardiovasculares é amplamente relatada em estudos experimentais e clínicos. Neste sentido, é importante considerar a magnitude e distribuição da gordura corporal, ao passo que há diferenças significativas no risco atribuível à localização do tecido adiposo entre indivíduos obesos (Larsson, B. *et al.* 1984, Nakamura, M. *et al.* 2000). Por exemplo, a deposição de tecido adiposo em extremidades superiores e inferiores é favorável, enquanto que a deposição de tecido adiposo na região torácica e abdominal é considerada prejudicial e está associada ao aumento da mortalidade (Garg, A. 2004, McLaughlin, T. *et al.* 2011).

O tecido adiposo não é mais considerado apenas como responsável por armazenar o excesso de energia sob a forma de gordura. Há evidências convincentes de que o tecido adiposo atua como um órgão endócrino, capaz de produzir e secretar substâncias

biologicamente ativas que regulam a homeostase metabólica e cardiovascular (Waki, H. e Tontonoz, P. 2007, Coelho, M. *et al.* 2013). Sendo assim, um fator altamente relevante para a compreensão do impacto cardiovascular do aumento de tecido adiposo na obesidade é o reconhecimento de que os adipócitos são determinantes endócrinos e parácrinos da função cardiovascular.

A grande questão que surge a partir destas observações é como o acúmulo excessivo de tecido adiposo poderia levar ao desenvolvimento de complicações cardiovasculares. A resposta para esta questão é proporcionada pelas evidências de que o tecido adiposo está envolvido de fato na produção de diversas proteínas, coletivamente chamadas de adipocinas, incluindo quimiocinas, citocinas e hormônios, que são secretadas na circulação sistêmica e atuam em diversos processos fisiológicos, incluindo o balanço energético, respostas imunes, pressão arterial, homeostasia vascular e angiogênese, metabolismo de glicose e lipídios e até mesmo a sensibilidade à insulina (Prins, J.B. 2002), todos os quais podem contribuir significativamente para o elevado risco cardiovascular associado à obesidade (Figura 1) (Weyer, C. *et al.* 2000, Wang, Y. *et al.* 2005).

Figura 1 – Mecanismos pelos quais a disfunção sistêmica do tecido adiposo perivascular poderia levar ao desenvolvimento de disfunção vascular na obesidade. Fonte: adaptado de Costa *et al.*, 2018.

Independentemente dos mecanismos de expansão do tecido adiposo, o balanço energético positivo eventualmente leva à morte celular apoptótica e/ou necrótica, sendo paralela a mudanças quantitativas e qualitativas na composição celular, no genótipo e no fenótipo das células individuais do tecido adiposo (Weisberg, S.P. *et al.* 2003). Por exemplo, o tecido adiposo de indivíduos obesos é infiltrado por numerosas células do sistema imune, levando a aumento tanto no número absoluto de células imunes, quanto no nível relativo da relação célula imune-adipócito. Além dessas mudanças quantitativas, o genótipo das células imunes também é alterado pela condição da obesidade. Tais células tendem a expressar genes associados ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e produzem altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e intermediários de nitrogênio (Lumeng, C.N. *et al.* 2007).

A disfunção do tecido adiposo promove um estado de ativação sistêmica das células endoteliais, através das ações endócrinas de adipocinas inflamatórias (Skurk, T. *et al.* 2007, Dulloo, A.G. *et al.* 2010). O impacto dessas adipocinas na função vascular, por exemplo, não se limita à regulação momentânea da liberação de fatores vasoativos derivados do endotélio ou à regulação do tônus do músculo liso vascular. Algumas adipocinas também podem afetar profundamente o crescimento da musculatura lisa local e, conseqüentemente, o remodelamento vascular, além de mediar processos inflamatórios (Miao, C.Y. e Li, Z.Y. 2012). Obviamente, essas adipocinas se tornaram biomarcadores e preditores valiosos, e seu estudo oferece possibilidades promissoras para a identificação de novos alvos para o tratamento da obesidade e as complicações cardiovasculares associadas a esta condição (Bagi, Z. *et al.* 2012, Barton, M. *et al.* 2012).

Tecido adiposo perivascular e a disfunção vascular na obesidade

Além do papel endócrino do tecido adiposo, mediado por adipocinas, um importante conceito emergente indica que os depósitos de gordura ectópica que circundam o coração e quase todos os vasos sanguíneos sistêmicos, também podem afetar diretamente a função cardiovascular (Chang, L. *et al.* 2013). Estes incluem: o tecido adiposo perivascular (*perivascular adipose tissue* – PVAT), isto é, a gordura imediatamente adjacente à túnica adventicial; o tecido adiposo epicárdico, que se refere ao depósito de gordura localizado na superfície do miocárdio e que envolve as artérias coronárias; e o tecido adiposo pericárdico, o depósito de gordura localizado entre o pericárdio visceral e parietal (Iozzo, P. 2011). Notavelmente, essa proximidade anatômica do tecido adiposo tem uma enorme influência no sistema cardiovascular e nos órgãos altamente vascularizados (por exemplo, o rim) (Amis, E.S., Jr. e Cronan, J.J. 1988).

Nos últimos anos, evidências clínicas e experimentais reconheceram que o PVAT não apenas armazena triacilgliceróis e ácidos graxos livres, participando do metabolismo energético, mas também secreta uma grande variedade de adipocinas e fatores vasoativos, como óxido nítrico, leptina, adiponectina, angiotensina-(1-7), chemerina, visfatina, resistina, factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), EROs e outros, que modulam o tônus vascular (Maenhaut, N. e Van de Voorde, J. 2011), migração e proliferação de células musculares lisas (Miao, C.Y. e Li, Z.Y. 2012), hiperplasia da camada íntima (Takaoka, M. *et al.* 2010, Schroeter, M.R. *et al.* 2013), respostas inflamatórias e estresse oxidativo (Salgado-Somoza, A. *et al.* 2010). Esta propriedade secretora do PVAT é capaz de influenciar de modo parácrino os vasos sanguíneos, não apenas em veias e artérias de condutância, mas também em vasos de menor calibre, considerados de suma importância na regulação da pressão arterial (Szasz, T. *et al.* 2013, Xia, N. e Li, H. 2017).

As características estruturais e fisiológicas do PVAT variam de acordo com sua localização. Demonstrou-se que, no leito mesentérico, o PVAT assemelha-se ao tecido adiposo branco (TAB), mostrando adipócitos menos diferenciados, com pouca vascularização e perfil de produção/secreção de citocinas específicas, além de apresentar infiltrados de macrófagos, fibroblastos e células do sistema imune (Guzik, T.J. *et al.* 2007). Por outro lado, o PVAT que circunda a aorta torácica exibe características que assemelham-se ao tecido adiposo marrom (TAM) (Fitzgibbons, T.P. *et al.* 2011, Chang, L. *et al.* 2012), incluindo a presença de adipócitos multiloculares e a grande abundância de mitocôndrias.

O conceito de que o PVAT influencia a função vascular só começou a ser desenvolvido a partir da década de 1990. Soltis e Cassis descreveram que o PVAT retinha e prejudicava a difusão dos agentes farmacológicos, justificando uma redução na resposta contrátil (Soltis, E.E. e Cassis, L.A. 1991). Porém, estudos posteriores que utilizavam diversos agonistas de baixa lipossolubilidade (menor retenção nos adipócitos) também demonstraram tal diminuição, contestando a teoria inicial (Gollasch, M. e Dubrovskaya, G. 2004). Lohn e colaboradores demonstraram que a resposta contrátil à angiotensina II, serotonina e fenilefrina são reduzidas em aortas circundadas por PVAT, sugerindo que o tecido adiposo periaórtico regula o tônus vascular pela liberação de fatores anticontráteis, inicialmente definidos como fatores relaxantes derivados da adventícia (*Adventitium-Derived Relaxing Factors* – ADRFs) (Lohn, M. *et al.* 2002) e atualmente definidos como fatores relaxantes derivados do PVAT (*PVAT-Derived Relaxing Factors* – PVRFs) (Gollasch, M. e Dubrovskaya, G. 2004).

O efeito anticontrátil do PVAT, mediado por PVRFs, em condições fisiológicas é descrito em várias espécies. O efeito anticontrátil do PVAT é mediado por diferentes mecanismos dependendo do leito vascular. Evidências convincentes demonstraram que os canais para potássio (K^+) nas células de músculo liso vascular (CMLV) desempenham papel crítico na mediação das respostas de relaxamento aos PVRFs. O estudo de Lohn mostrou que o efeito anticontrátil do PVAT periaórtico foi reduzido pela inibição de canais K^+ dependentes de trifosfato de adenosina (ATP) (Lohn, M. *et al.* 2002). Após esse achado, estudos

subsequentes demonstraram que os PVRFs produzem vasodilatação pela abertura de canais K^+ dependentes de voltagem (Dubrovskaya, G. *et al.* 2004, Verlohren, S. *et al.* 2004, Gao, Y.J. *et al.* 2005, Fesus, G. *et al.* 2007). Além da abertura de canais K^+ , os efeitos dos PVRFs incluem estímulo da atividade endotelial, aumentando a produção de óxido nítrico e ativando a via nitrérgica nas CMLV, resultando em aumento de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) (Gao, Y.J. *et al.* 2007).

Como observado com o tecido adiposo total, há aumento da massa do PVAT ao longo da vasculatura em modelos animais e em humanos com obesidade (Marchesi, C. *et al.* 2009, Ketonen, J. *et al.* 2010, Lehman, S.J. *et al.* 2010). Considerando que a influência anticontrátil do PVAT depende diretamente do seu tamanho (Verlohren, S. *et al.* 2004, Gao, Y.J. *et al.* 2006), seria possível inferir que tal aumento estaria associado ao aprimoramento do efeito anticontrátil do PVAT. No entanto, o suporte disponível para a compreensão da conexão entre PVAT e disfunção vascular na obesidade mostram que a obesidade está associada a mudanças estruturais e funcionais no PVAT, levando a um desequilíbrio em favor da liberação de substâncias vasoconstritoras e pró-inflamatórias, bem como mudanças nas vias de sinalização no vaso, e que estas condições interferem de modo negativo com a função vascular.

Gao e colaboradores demonstraram que o aumento da adiposidade corporal causa prejuízos no relaxamento vascular. Neste sentido, camundongos obesos Neozelandeses (NZO, *New Zealand Obese mice*) apresentam redução no efeito anticontrátil do PVAT (Gao, Y.J. *et al.* 2005). Além disso, em animais obesos por dieta hiperlipídica, a presença do PVAT periaórtico reduz a fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) no resíduo de ativação Serina¹¹⁷⁷, reduzindo a biodisponibilidade de óxido nítrico (Ma, L. *et al.* 2010). Outro marco importante para a compreensão básica da relação entre disfunção do PVAT e disfunção vascular associada à obesidade foi a demonstração de alterações no perfil proteômico de 186 proteínas no PVAT de artérias coronárias, que se correlacionam com o aumento do efeito contrátil e a ativação de canais para cálcio (Ca^{2+}) em CMLV de suínos obesos Ossabaw (Owen, M.K. *et al.* 2013).

Além das considerações descritas acima, os diversos aspectos da influência do PVAT na disfunção vascular durante a obesidade também podem ser enquadrados pela sua íntima associação com o estresse oxidativo. EROs, como ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), desempenham papéis importantes na modulação da função vascular pelo PVAT. A enzima NAD(P)H oxidase, principal fonte de O_2^- na vasculatura, é expressa no PVAT de artérias mesentéricas de ratos e contribui para aumentar a resposta contrátil à estimulação do nervo perivascular (Gao, Y.J. *et al.* 2006). De fato, há aumento da expressão da subunidade p67phox do complexo NAD(P)H oxidase no tecido adiposo periaórtico de camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica; fenômeno acompanhado por aumento na geração de O_2^- e H_2O_2 (Ketonen, J. *et al.* 2010). O aumento da atividade de NAD(P)H oxidase também está intimamente associado à redução na expressão de eNOS e na produção de óxido nítrico no PVAT de camundongos obesos (Gil-Ortega, M. *et al.* 2014). Ainda neste contexto, nosso grupo demonstrou que a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial contribui para o estresse oxidativo no PVAT durante a obesidade experimental (da Costa, R.M. *et al.* 2017).

Inflamação no tecido adiposo perivascular: um *link* entre interleucina 33 e células T reguladoras

Nas últimas décadas, a obesidade tem sido associada a um grau moderado de inflamação no tecido adiposo, condição que resulta da ativação crônica dos sistemas imune inato e adaptativo. Este tipo de inflamação, denominada metainflamação ou inflamação metabólica, é isenta de patógenos e orquestrada por células metabólicas em resposta ao excesso de nutrientes e energia (Hotamisligil, G.S. 2017).

O suporte inicial para o entendimento da inflamação metabólica veio das seguintes observações: o TNF- α derivado de macrófagos induz resistência à insulina em adipócitos (Pekala, P. *et al.* 1983); o tecido adiposo de indivíduos obesos apresenta aumento da expressão de mediadores inflamatórios (Hotamisligil, G.S. *et al.* 1993, Uysal, K.T. *et al.* 1997); e a inflamação promove distúrbios no metabolismo da glicose (Weisberg, S.P. *et al.* 2003, Xu, H. *et al.* 2003). Esses achados foram a base para elucidar o envolvimento de células do sistema imune infiltradas no tecido adiposo como moduladores diretos do metabolismo.

Mecanismos moleculares que ligam a inflamação do PVAT na obesidade e doença cardiovascular indicam vários componentes-chave. Estes podem incluir a migração quimiotática de células imunes para o PVAT, com liberação de citocinas, que podem alterar a função vascular (Figura 1) (Mikolajczyk, T.P. *et al.* 2016). A este respeito, demonstrou-se anteriormente que o PVAT humano exibe uma forte atividade quimiotática de monócitos, granulócitos e linfócitos T, principalmente mediada pela secreção de interleucinas e MCP-1. Na obesidade, estes fatores quimiotáticos têm sua produção aumentada (Henrichot, E. *et al.* 2005).

A participação crucial de citocinas e quimiocinas na disfunção cardiovascular observada na hipertensão arterial, diabetes, obesidade e aterosclerose é hoje claramente reconhecida. É evidente que todas as camadas dos vasos sanguíneos são afetadas diretamente por citocinas. O aumento na resposta contrátil do músculo liso vascular em ratos

espontaneamente hipertensos é mediado por mecanismos dependentes de interleucina 1-beta (IL-1 β) (Dorrance, A.M. 2007). Em modelos de diabetes, o aumento de interleucina 6 (IL-6) e TNF- α promove redução na biodisponibilidade de óxido nítrico, com consequente disfunção endotelial e injúria vascular (Hartge, M.M. *et al.* 2007).

No contexto da associação entre inflamação e riscos cardiovasculares, inúmeras citocinas se destacam. Alguns estudos sugerem que interleucina-33 (IL-33) é capaz de promover a resolução da inflamação, bem como de estabelecer uma doença (Miller, A.M. 2011, Miller, A.M. e Liew, F.Y. 2011). De modo geral, a IL-33 é produzida por fibroblastos, CMLV, células endoteliais, adipócitos e diversas células do sistema imune como macrófagos e células dendríticas (Le, H. *et al.* 2013). Em condições inflamatórias, como na obesidade, o perfil de liberação da IL-33 é característico de alarminas, sendo sua produção visivelmente aumentada em células endoteliais, evidenciando um *crosstalk* entre a vasculatura e o sistema imune (Moussion, C. *et al.* 2008).

Pertencente à família da IL-1, a IL-33 se liga ao receptor ST2 (Tominaga, S. 1989). O gene do receptor ST2 codifica três isoformas de proteína, dentre as quais estão a isoforma ligada à membrana, uma forma variante e uma forma solúvel (Tago, K. *et al.* 2001). O ST2 ligado à membrana é expresso em diversas células, mas preferencialmente em linfócitos T (Thomassen, E. *et al.* 1995). Quando expresso na forma solúvel, liga-se à IL-33, impossibilitando que a mesma ative vias de sinalização celular e, portanto, funcionando como um receptor sequestrador de IL-33 (*scavenger receptor*) (Hayakawa, H. *et al.* 2007).

A expressão de IL-33 pode ser induzida em células do infiltrado inflamatório e células residentes (Kobori, A. *et al.* 2010). Na ausência de estímulos inflamatórios, a IL-33 se localiza no núcleo, comportando-se como um fator transcricional com propriedades regulatórias (Haraldsen, G. *et al.* 2009). Os alvos transcricionais específicos, os mecanismos e função biológica da IL-33 não são ainda totalmente conhecidos.

Um estudo recente mostra que a sinalização da IL-33 através do receptor ST2 e do fator de diferenciação mielóide MYD88 é essencial para o desenvolvimento e manutenção de

linfócitos T reguladores (Tregs) no tecido adiposo visceral (TAV) (Vasanthakumar, A. *et al.* 2015).

As células Tregs são uma sub-população de linfócitos T cuja função é manter a tolerância periférica através da modulação da resposta imune contra antígenos próprios, além de limitar uma resposta imune exacerbada (Feurerer, M. *et al.* 2009). De fato, as Tregs possuem atividade supressora sobre linfócitos de memória, macrófagos, células dendríticas e mastócitos (Feurerer, M. *et al.* 2009, Shevach, E.M. 2009). Neste contexto, as Tregs podem ser classificadas como Tregs naturais, induzidas e Tregs produtoras de interleucina 10 (IL-10) ou fator de transformação do crescimento (TGF- β) (Jonuleit, H. e Schmitt, E. 2003). Embora estes subtipos celulares apresentem em comum a atividade supressora, a diferença entre os estágios funcionais destas células é dependente do tecido em que residem e os mecanismos utilizados em sua diferenciação (Haribhai, D. *et al.* 2011). As Tregs encontradas na periferia diferenciam-se a partir de linfócitos T CD4⁺ *naive* após estímulos derivados da microbiota residente, reconhecimento de antígenos oferecidos por células apresentadoras, citocinas e TGF- β (Belkaid, Y. 2007).

O controle genético de diversas funções das Tregs é realizado pelo fator de transcrição *forkhead box protein P3* (Foxp3), que regula positivamente a ativação das Tregs. A partir de análises do genoma de indivíduos com doença autoimune severa (IPEX) e de camundongos da linhagem *scurfin*, que apresentam espontaneamente doenças autoimunes, foi determinada uma correlação entre mutações no gene Foxp3 e a frequência destas doenças (Brunkow, M.E. *et al.* 2001, Kasprowicz, D.J. *et al.* 2003). Posteriormente, foi demonstrado que a transfecção do gene de Foxp3 para as células T CD4⁺ induz em tais células atividade supressora (Hori, S. *et al.* 2003).

O conceito de que células Tregs tem suma importância no desenvolvimento de complicações cardiovasculares, como na hipertensão arterial, surgiu recentemente. Barhoumi e colaboradores demonstraram que a injeção de Tregs, em animais com hipertensão induzida por angiotensina II, atenua os níveis pressóricos por reduzir o remodelamento vascular, facilitar o relaxamento dependente de endotélio e diminuir a geração de EROs. No entanto, os

mecanismos envolvidos nestas ações benéficas das Tregs ainda não estão elucidados (Barhoumi, T. *et al.* 2011).

Além da hipertensão arterial, as células Tregs desempenham papel significativo na síndrome metabólica. Ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta rica em frutose mostram índices reduzidos de diferenciação de células T CD4⁺ em Tregs e menor produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Leibowitz, A. *et al.* 2013).

De fato, a perda da proteção oferecida pelas células Tregs residentes nos tecidos periféricos contribui para as condições metabólicas que culminam em riscos cardiovasculares. Tregs Foxp3⁺ residentes no TAV são funcionalmente especializadas para prevenir a inflamação associada à obesidade, preservar a sensibilidade à insulina e evitar diminuição da tolerância à glicose (Feuerer, M. *et al.* 2009). O desenvolvimento das Tregs no tecido adiposo é dependente do fator de transcrição PPAR- γ produzido pelos adipócitos (Cipolletta, D. *et al.* 2012).

Na obesidade, o número e função de Tregs estão diminuídos no TAV (Leibowitz, A. *et al.* 2013). Animais obesos por dieta hiperlipídica tratados com IL-33 apresentam aumento na população de Tregs, maior tolerância à glicose e diminuição de diversos parâmetros inflamatórios (Vasanthakumar, A. *et al.* 2015). Estes dados indicam que a IL-33 é mecanismo importante na regulação da população e atividade de Tregs no TAV e, possivelmente, em demais tecidos, tal como o PVAT e o músculo liso vascular.

Justificativa e hipótese

Evidências recentes destacam o papel parácrino exercido pelo tecido adiposo localizado em torno da vasculatura, conhecido como PVAT. Este tecido é considerado um componente funcional da vasculatura, capaz de produzir e secretar uma variedade de moléculas bioativas que contribuem para a regulação da reatividade vascular, da proliferação celular e de processos inflamatórios locais. O aumento no consumo energético desencadeia mudanças estruturais e funcionais no PVAT, levando a um desequilíbrio em favor da liberação de fatores vasoconstritores e pró-inflamatórios, bem como a alterações nas vias de sinalização ativadas por estes fatores em células vasculares. Nesta condição, o sistema imune é de fundamental importância para a manutenção da homeostasia do PVAT e da vasculatura adjacente. A sinalização da IL-33 via receptor ST2 é essencial para o desenvolvimento e manutenção de Tregs, as quais limitam respostas imunes. As Tregs possuem função protetora em doenças cardiovasculares e modulam negativamente a inflamação associada à obesidade. A IL-33 é mecanismo importante na regulação da população e atividade de Tregs no tecido adiposo visceral e, possivelmente no PVAT. Este estudo proporcionará maior compreensão da importância fisiológica da IL-33 sobre o PVAT, bem como sobre sua contribuição para as alterações funcionais deste tecido, e consequentes efeitos sobre a vasculatura, em condições de alto consumo energético e obesidade.

Dada a importância do PVAT no controle do tônus vascular e do papel direto que as citocinas desempenham neste tecido, este estudo testará a hipótese que o aumento do consumo energético e posterior obesidade diminuem os níveis e a função da IL-33 no PVAT. Nesta condição, o PVAT está comprometido pela ausência de ação direta da IL-33 e eventos associados às ações desta citocina, tais como, menor diferenciação de Tregs, inflamação e estresse oxidativo. A Figura 2 mostra um esquema representativo da hipótese deste estudo.

Figura 2 – Esquema representativo da hipótese deste estudo.

IL-33: interleucina 33; PVAT: tecido adiposo perivascular; Tregs: células T reguladoras

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a contribuição da IL-33 e os possíveis mecanismos envolvidos nas ações desta citocina nas alterações funcionais do PVAT e, conseqüentemente, na perda dos efeitos moduladores deste tecido sobre a função vascular, em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

Objetivos específicos

- 1) Confirmar que camundongos submetidos à dieta hiperlipídica apresentam perda da modulação anticontrátil do PVAT. Para tal, camundongos Balb/C receberam dietas controle e hiperlipídica cronicamente (por 18 semanas) e a reatividade vascular a agentes vasoconstritores e vasodilatadores foi avaliada.
- 2) Determinar se a dieta hiperlipídica diminui os níveis de IL-33 na circulação e no PVAT, e se a IL-33 contribui efetivamente para as alterações funcionais do PVAT. Para tal, os níveis de IL-33 foram medidos através de ensaios enzimáticos e a reatividade vascular foi avaliada em camundongos *wild type* e *knockout* para o receptor de IL-33 (*ST2 receptor*) tratados ou não com dieta hiperlipídica.
- 3) Determinar se o tratamento com IL-33 (*in vitro*) e consequente ativação dos receptores ST2 restaura os efeitos anticontráteis do PVAT. Para tal, segmentos vasculares isolados de camundongos Balb/C submetidos à dieta hiperlipídica, foram tratados agudamente com IL-33 recombinante. Nestas condições, a reatividade vascular foi avaliada.
- 4) Investigar possíveis mecanismos envolvidos nas ações da IL-33, determinando se a diminuição de IL-33 acarreta em menor população de Tregs, aumento de mediadores inflamatórios e EROs no PVAT. Para tal, a população de Tregs, citocinas inflamatórias e EROS foram avaliadas por citometria de fluxo, ensaios enzimáticos e fluorescentes, respectivamente, em artérias de animais Balb/C submetidos às dietas controle e hiperlipídica.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados camundongos controle Balb/C provenientes do Biotério de Criação do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, e camundongos *knockouts* para o receptor ST2, gerados a partir de camundongos Balb/C, provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Esses animais foram alocados no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, mantidos em temperatura controlada (20 a 22°C), ciclos claro/escuro de 12 horas, 60% de umidade e alimentação e água *ad libitum*. Os camundongos foram adquiridos na idade de 4 semanas e divididos em dois grupos experimentais: 1) camundongos alimentados com dieta controle (3,4 kcal/g – 10% de lipídeos, 70% de carboidratos, 20% de proteínas – PragSoluções); 2) camundongos alimentados com dieta hiperlipídica [(*high fat diet* – HFD) (9,6 kcal/g – 60% de lipídeos, 20% de carboidratos, 20% de proteínas – PragSoluções)]. Os camundongos foram alimentados com ambas as dietas durante 18 semanas, a partir da 5ª semana de idade. Todos os protocolos experimentais em animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo nº 209/2016).

Dosagens bioquímicas

Os níveis plasmáticos de colesterol total foram determinados por espectrofotometria (Labtest). Os níveis plasmáticos de insulina foram determinados por método de radioimunoensaio (Insulin Kit). A realização do teste oral de tolerância à glicose (TOTG) baseou-se em estudos anteriores do nosso grupo. A glicemia de cada animal foi verificada por glicosímetro portátil (Accu-Check Active, Roche, Alemanha), caracterizando a glicemia do tempo zero. Em seguida, glicose na dose de 2 g/kg foi administrada aos camundongos por gavagem. A partir desse momento, o cronômetro foi acionado e novas determinações da

glicemia foram feitas nos tempos de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*), que leva em consideração a insulina e a glicemia de jejum, através da seguinte fórmula matemática: $\text{HOMA-IR} = \text{insulina em jejum} \times \text{glicemia em jejum} / 22,5$.

Estudo da reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência

O método descrito por Mulvany e Halpern (Mulvany, M.J. e Halpern, W. 1977) foi utilizado nos ensaios de reatividade vascular. O leito mesentérico foi removido, colocado em placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 11) e o segundo ramo da artéria mesentérica superior foi dissecado e cortado em segmentos de 2,0 mm de comprimento com auxílio de microscópio de dissecação (Nikon, SMZ 645, USA). Dois fios de tungstênio (25 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e montados em miógrafo para vasos de resistência para estudo de tensão isométrica. Esse miógrafo, por sua vez, é conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab/8SP, ADInstruments, Austrália) e este a um computador.

Após período de normalização e estabilização, as artérias foram contraídas com a administração de cloreto de potássio (KCl 120 mM), com a finalidade de se avaliar a integridade funcional. Após um período de lavagem e estabilização por mais 30 minutos, a eficiência na remoção do endotélio foi testada por meio da avaliação do relaxamento à acetilcolina (ACh, vasodilatador dependente de endotélio, concentração 10⁻⁶ M) em vasos pré-contraídos com fenilefrina (FE, concentração 10⁻⁶ M). A ausência de relaxamento à ACh ou a presença de relaxamento de até 5% do valor da pré-contracção, em anéis de artérias mesentérica previamente submetidos à remoção mecânica do endotélio, foi dada como prova da retirada do endotélio.

Protocolo experimental

Foram realizadas curvas concentração-efeito para FE e ACh (10^{-11} M – 10^{-4} M) em segmentos vasculares com endotélio intacto. Alguns segmentos foram dissecados com o PVAT, enquanto outros foram limpos de todo o tecido conectivo. As artérias mesentéricas foram incubadas com IL-33 recombinante (0,5 mg/ml, 60 minutos) e a participação das EROs nos efeitos promovidos pelo PVAT foi investigada utilizando o 4,5-dihidroxi- ácido 1,3-benzenodisulfônico dissódico monohidratado (Tiron, sequestrador seletivo de O_2^- , 10^{-4} M, 60 minutos). Os valores das respostas de contração foram corrigidos pelo valor máximo de contração induzida por KCl e os valores das respostas de relaxamento foram expressos como porcentagem do relaxamento da pré-contração induzida pela FE. Para cada curva concentração-efeito, a resposta máxima e a EC_{50} foram calculadas utilizando-se análise de regressão não linear.

Quantificação protéica por Western Blotting no PVAT

Extrato total

O PVAT retirado dos segmentos de artérias mesentéricas foi isolado, congelado em nitrogênio líquido, pulverizado e homogeneizado em tampão de lise gelado (coquetel inibidor de proteases ([4-2-aminoetil fluoreto de benzenosulfonil, pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina e aprotinina]; Sigma Aldrich) acrescido de ortovanadato de sódio (10^{-3} M) e PMSF (fluoreto de fenilmetil-sulfonil, 10^{-3} M). Os extratos teciduais foram centrifugados a 13000 rpm a 4°C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, o conteúdo proteico total foi quantificado, pelo método de Bradford (Bradford, M.M. 1976). As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli contendo ditioneitol (DTT, 200 mM) e 50 µg de proteína total foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE,

dodecil sulfato de sódio) em aparelho para mini gel (BioRad, Hercules, USA). Em cada gel havia um marcador com peso molecular de valores estabelecidos.

“Immunoblotting”

A transferência das proteínas separadas no gel para a membrana de nitrocelulose foi feita eletricamente por 1 hora a 100 V. O tampão foi acrescido de SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. As membranas foram incubadas com solução bloqueadora (albumina de soro bovino 5% - bovine serum albumin), a temperatura ambiente por 1 hora, para reduzir a ligação inespecífica de proteínas na membrana. As membranas foram incubadas individualmente com os anticorpos anti-ST2 (1:500, Abcam: #ab228543), anti-Foxp3 (1:500, Abcam: #ab23683) e anti-GAPDH (1:10.000, Sigma Aldrich: #G9545). Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora TBS (solução salina tamponada com Tris - tris-buffered saline) contendo 1% BSA, por 18 horas a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução tampão TBS-T (tris-buffered saline and tween) por 30 minutos e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, por 1 hora, em temperatura ambiente e, logo após, com a solução para detecção por quimioluminescência, como descrito no protocolo do kit. A emissão de luz foi detectada e visualizada por quimioluminescência. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica através da utilização de programa de análise de intensidade de bandas (ImageJ, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland).

Citometria de fluxo

PVAT foi digerido em RPMI-I (livre de soro fetal bovino) acrescido de collagenase (1 mg/ml) por 60 minutos a 37°C. A marcação extracelular da suspensão de células do PVAT foi realizada com anticorpo anti-CD4 (BD Biosciences), anti-CD11b (BD Biosciences), anti-

Ly6G (BD Biosciences) e com marcador de viabilidade celular (Dye fixable viability-Ebioscience), por 10 minutos. Após a marcação extracelular as células foram centrifugadas (450G, 8 minutos, 4°C) e fixadas (Cytoperm/Cytofix) por 15 minutos. Após isso, as células foram novamente centrifugadas e permeabilizadas com *Perm/wash buffer* (BD Biosciences) e marcadas com anticorpo anti-Foxp3 (BD Biosciences) por 15 minutos. Todas as incubações foram realizadas a temperatura ambiente e com as amostras protegidas da luz. Após esse período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS para posterior leitura no FACS Verse BD Biosciences (Veras, F.P. *et al.* 2015).

ELISA

A determinação dos níveis de IL-33, ST2, ST2 solúvel, KC, IL-6 e IL-10 murinos foi feita pelo método imunoenzimático (ELISA) utilizando kits DuoSet ELISA Development Systems (R&D Systems) de acordo com as informações do fabricante. Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 µl/ poço do anticorpo específico anti-IL-33, anti-ST2, anti-ST2 solúvel, anti-KC, anti-IL-6 e anti-IL-10, nas concentrações descritas pelo fabricante diluídos em PBS e incubados overnight a 4°C. As placas foram lavadas com PBS/Tween-20 (0,05% - Sigma Aldrich) e as ligações não específicas foram bloqueadas com 100 µl de PBS contendo BSA 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram adicionadas, seguindo nova incubação por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas e adicionou-se 50µl dos anticorpos biotinizados específicos para cada citocina. Após duas horas, as placas foram lavadas e o conjugado estreptavidina-peroxidase, na diluição de 1:40 foi adicionado a cada poço. As placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas e foi adicionado 100µl do substrato tetrametilbenzidina (TMB). A densidade ótica foi medida a 630 nm no espectrofotômetro SpectraMAX 190 Microplate Reader (Molecular Devices) e os dados foram analisados usando o software SoftMax Pro5. A concentração de citocinas

contidas nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão com 11 pontos obtidos por diluição seriada. Os resultados foram expressos em pg/ml. Nas amostras de PVAT, o valor obtido foi corrigido pela massa do PVAT em pg/mg.

Dosagem da enzima mieloperoxidase no PVAT

O PVAT foi homogeneizado em solução tampão de fosfato de sódio (0.08 M, pH 5.4) acrescido de brometo de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB, 0,5%). O homogenato foi centrifugado (10.000G, 20 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A reação enzimática ocorreu em alíquotas de 25 µl do sobrenadante acrescidos de TMB (1.6 mM) e H₂O₂ (0.5 mM), em um volume final de 200 µl, por 3 minutos e em temperatura ambiente. A densidade ótica foi medida a 630 nm no espectrofotômetro SpectraMAX 190 Microplate Reader (Molecular Devices). Os valores foram expressos em unidades relativas.

Estudo da geração de espécies reativas de oxigênio no PVAT

Medida da produção de ânion superóxido por Lucigenina

A geração de ânion superóxido no PVAT foi medida por ensaio de quimiluminescência, utilizando a lucigenina como acceptor de elétrons e NAD(P)H como substrato. PVAT foi homogeneizado em tampão de trabalho (50 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA e 150 mM sacarose, pH 7.4). Os ensaios foram realizados com 100 µl de amostra, lucigenina (5 µM), NAD(P)H (0,1 mM) e tampão de trabalho. A luminescência foi medida por 30 ciclos de 18 segundos cada. A geração de ânion superóxido foi expressa em unidades relativas de luminescência por miligrama de proteína.

Medida da produção de peróxido de hidrogênio por Amplex Red

PVAT proveniente das artérias mesentéricas foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido. Posteriormente, foi pulverizado em solução de Krebs gelada e centrifugado. A produção de peróxido de hidrogênio foi avaliada em alíquotas de 50 μ l do sobrenadante, usando kit para dosagem de peróxido de hidrogênio, Amplex Red (Molecular Probes, Invitrogen). A fluorescência emitida foi medida nos comprimentos de excitação: 530 nm e emissão: 590 nm. Curva padrão para peróxido de hidrogênio foi construída com o padrão do fabricante, em temperatura ambiente e utilizada para determinar a concentração de peróxido de hidrogênio das amostras. O resultado foi expresso com a média das concentrações absolutas detectadas nas amostras (μ mol/l). A quantificação foi corrigida pela concentração de proteínas totais.

Análise estatística

As curvas concentração-efeito individuais à FE foram plotadas em uma curva sigmoidal pela análise de regressão não linear. Estas curvas, por sua vez, fornecem a pD_2 (definida como o logaritmo negativo dos valores de EC_{50} – concentração que produz 50% da resposta máxima) e a resposta máxima ($Em_{\max}$). Os valores de pD_2 e de resposta máxima foram comparados por meio da análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Bonferroni. Outras análises foram feitas utilizando o teste t de Student ou ANOVA de duas vias. O programa Prisma, versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San. Diego, CA, USA) foi utilizado para analisar estes parâmetros, bem como para a construção das curvas sigmóides e demais gráficos. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O nível de significância mínima determinado foi $p < 0,05$.

Resultados

Caracterização do modelo experimental

Após 18 semanas, a dieta hiperlipídica não promoveu aumento na massa corporal dos camundongos Balb/C. No entanto, os camundongos *knockouts* para o receptor ST2, apresentaram aumento significativo da massa corporal (Figura 3A). Houve aumento nos níveis de colesterol total (Figura 3B) e insulina (Figura 3C) nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, tanto em camundongos Balb/C, quanto em camundongos *knockouts* para o receptor ST2. Similarmente, o índice HOMA-IR foi maior naqueles camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 3D). No teste oral de tolerância à glicose (Figura 3E), a glicemia basal T0 (antes da administração oral de glicose) foi significativamente maior nos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica quando comparada à dos camundongos alimentados com dieta controle. A área sob a curva da concentração de glicose sanguínea se mostrou diferente entre os grupos, com aumento significativo nos camundongos *knockouts* para o receptor ST2 comparado ao camundongo Balb/C, ambos alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 3F).

Figura 3 – A dieta hiperlipídica compromete parâmetros bioquímicos em camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2. As figuras mostram valores da massa corporal (A), colesterol total (B), insulina (C), índice HOMA-IR (D) e teste oral de tolerância à glicose (E e F) de camundongos Balb/C e ST2 *knockout* (ST2 KO) alimentados por 18 semanas com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. Balb/C Controle; #, $p < 0,05$ vs. ST2 KO Controle; +, $p < 0,05$ vs. Balb/C HFD ($n = 7-8$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica.

Efeito da dieta hiperlipídica sobre a resposta contrátil à fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência

Na avaliação de reatividade vascular, a remoção do PVAT em artérias de camundongos Balb/C alimentados com dieta controle potencializou a contração vascular induzida por fenilefrina, confirmando que o PVAT modula negativamente respostas de contração, ou seja, possui efeito anticontrátil. Também observamos que em camundongos Balb/C alimentados com dieta hiperlipídica houve perda parcial no efeito anticontrátil do PVAT em comparação com o observado em camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Figuras 4A e 5A). Camundongos *knockouts* para o receptor ST2 apresentaram perda completa do efeito anticontrátil do PVAT em comparação com o observado em camundongos *knockouts* para o receptor ST2 alimentados com dieta controle (Figuras 4B e 5B). Avaliando isoladamente as respostas de artérias mesentéricas circundadas por PVAT de camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2, observamos que, de fato, os efeitos causados pela dieta hiperlipídica no efeito anticontrátil do PVAT foram amplificados na ausência de atividade de IL-33 via receptor ST2 (Figura 4C).

Figura 4 – Dieta hiperlipídica promove disfunção do tecido adiposo perivascular e compromete a modulação da função contrátil. Curvas concentração-efeito para fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C (A) e *knockouts* (KO) para o receptor ST2 (B) alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). Curvas realizadas apenas na presença de PVAT (C). Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. Controle PVAT (-); #, $p < 0,05$ vs. HFD PVAT (-); +, $p < 0,05$ vs. Controle PVAT (+); π, $p < 0,05$ vs. Balb/C HFD PVAT (+) ($n = 6-7$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Figura 5 – Valores de E_{max} para contração induzida por fenilefrina. E_{max} de curvas concentração-efeito para fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C (A) e *knockouts* (KO) para o receptor ST2 (B) alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. respectivo Controle PVAT (-); #, $p < 0,05$ vs. respectivo HFD PVAT (-); +, $p < 0,05$ vs. respectivo Controle PVAT (+) ($n=6-7$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Tabela 1 – Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2 alimentados com dieta controle ou hiperlipídica.

Grupos	pD_2	
	Balb/C	ST2 <i>knockouts</i>
Controle PVAT (-)	6.4 ± 0.08 ($n=6$)	6.4 ± 0.09 ($n=7$)
Controle PVAT (+)	6.0 ± 0.07 ($n=6$)*	6.1 ± 0.09 ($n=7$)*
HFD PVAT (-)	6.7 ± 0.07 ($n=6$)	6.9 ± 0.08 ($n=7$)
HFD PVAT (+)	6.3 ± 0.09 ($n=6$)#	6.7 ± 0.11 ($n=7$)

Dados representam a média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$ vs. respectivo Controle PVAT (-); #, $p < 0,05$ vs. respectivo HFD PVAT (-). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Efeito da dieta hiperlipídica sobre a resposta relaxante à acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência

Em camundongos Balb/C alimentados com dieta hiperlipídica, o efeito vasodilatador da ACh foi comprometido em artérias circundadas por PVAT em comparação com o observado em camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Figuras 6A e 7A). Similarmente, em camundongos *knockouts* para o receptor ST2, o efeito vasodilatador da ACh foi comprometido em artérias circundadas por PVAT (Figuras 6B e 7B). Todavia, avaliando isoladamente as respostas de artérias mesentéricas circundadas por PVAT de camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2, observamos que os efeitos causados pela dieta hiperlipídica no efeito vasodilatador da ACh foram amplificados na ausência de atividade de IL-33 via receptor ST2 (Figura 6C).

Figura 6 – Dieta hiperlipídica promove disfunção do tecido adiposo perivascular e compromete o relaxamento vascular. Curvas concentração-efeito para acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C (A) e *knockouts* (KO) para o receptor ST2 (B) alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). Curvas realizadas apenas na presença de PVAT (C). Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. #, $p < 0,05$ vs. HFD PVAT (-); π , $p < 0,05$ vs. Balb/C HFD PVAT (+) ($n = 6-7$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Figura 7 – Valores de Emáx para relaxamento induzido por acetilcolina. Emáx de curvas concentração-efeito para acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C (A) e *knockouts* (KO) para o receptor ST2 (B) alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). Dados expressos como média ± E.P.M. #, $p < 0,05$ vs. respectivo HFD PVAT (-) ($n=6-7$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Tabela 2 – Valores de pD_2 para relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2 alimentados com dieta controle ou hiperlipídica.

Grupos	pD_2	
	Balb/C	ST2 <i>knockouts</i>
Controle PVAT (-)	6.9 ± 0.09 ($n=6$)	6.0 ± 0.08 ($n=7$)
Controle PVAT (+)	7.0 ± 0.07 ($n=6$)	5.9 ± 0.06 ($n=7$)
HFD PVAT (-)	6.8 ± 0.08 ($n=6$)	6.4 ± 0.07 ($n=7$)
HFD PVAT (+)	6.1 ± 0.07 ($n=6$) [#]	6.1 ± 0.07 ($n=7$) [#]

Dados representam a média ± EPM. #, $p < 0,05$ vs. respectivo HFD PVAT (-). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Efeito da dieta hiperlipídica sobre os níveis de IL-33 plasmáticos e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência

Em camundongos Balb/C alimentados com dieta hiperlipídica houve aumento nos níveis plasmáticos de IL-33 (Figura 8A). Similarmente, a dieta hiperlipídica também promoveu aumento nos níveis de IL-33 no PVAT de camundongos Balb/C (Figura 8B).

Figura 8 – A dieta hiperlipídica aumenta os níveis de IL-33 no plasma e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C. As figuras mostram os níveis de IL-33 plasmáticos (A) e no PVAT (B), quantificados por ELISA, em camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. Balb/C Controle ($n=5$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Efeito da dieta hiperlipídica sobre os níveis do receptor ST2 plasmáticos e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência

Não houve diferenças nos níveis totais do receptor ST2 no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência entre camundongos Balb/C alimentados com dieta controle e alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 9A e 9B). Todavia, a dieta hiperlipídica promoveu aumento nos níveis do receptor ST2 solúvel. Este aumento foi detectado no plasma (Figura 9C) e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência (Figura 9D).

Figura 9 – A dieta hiperlipídica aumenta os níveis de ST2 solúvel no plasma e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C. As figuras mostram os níveis totais do receptor ST2 no PVAT (A e B) e níveis do receptor ST2 solúvel plasmáticos (C) e no PVAT (D), quantificados por ELISA, em camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. Balb/C Controle ($n=5$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Efeito da IL-33 sobre as respostas contrátil e relaxante de artérias mesentéricas de resistência

A incubação aguda com IL-33 recombinante (0,5 mg/ml por 60 minutos) não alterou a modulação fisiológica do PVAT em artérias mesentéricas de resistência de camundongos alimentados com dieta controle. Similarmente, em camundongos Balb/C alimentados com dieta hiperlipídica, a incubação com IL-33 não reverteu a perda do efeito anticontrátil do PVAT. A ausência de efeitos agudos da IL-33 foi observada tanto em curvas contráteis para fenilefrina (Figuras 10A, 10B, 11A e 11B), quanto em curvas relaxantes para acetilcolina (Figuras 10C, 10D, 11C e 11D).

Figura 10 – IL-33 *in vitro* não restaura o efeito anticontrátil do PVAT em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Curvas concentração-efeito para fenilefrina (A e B) acetilcolina (C e D) em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). As curvas foram realizadas em artérias com ou sem PVAT e na presença de IL-33 recombinante (0,5 mg/ml por 60 minutos) ou veículo. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. ($n=6-7$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular; IL-33: interleucina 33.

Figura 11 – Valores de Emáx para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina. Emáx de curvas concentração-efeito para fenilefrina e acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Controle, A e C) ou hiperlipídica (HFD, B e D). Os valores foram determinados em artérias com ou sem PVAT e na presença de IL-33 recombinante (0,5 mg/ml por 60 minutos) ou veículo. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=6-7 para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular; IL-33: interleucina 33.

Tabela 3 – Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina e relaxamento induzido por acetilcolina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C alimentados com dieta controle ou hiperlipídica.

Grupos	pD_2	
	Balb/C Controle	Balb/C HFD
PVAT (-)	6.9 ± 0.09 (n=7)	6.8 ± 0.08 (n=7)
PVAT (-)_IL-33	6.8 ± 0.07 (n=6)	6.7 ± 0.10 (n=6)
PVAT (+)	7.0 ± 0.07 (n=7)	6.1 ± 0.07 (n=7)
PVAT (+)_IL-33	7.1 ± 0.06 (n=6)	6.4 ± 0.08 (n=6)

Dados representam a média $\pm$ EPM. HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular; IL-33: interleucina 33.

Efeito da dieta hiperlipídica sobre o número de Tregs no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência

Em camundongos Balb/C alimentados com dieta hiperlipídica houve diminuição na expressão proteica (Figura 12A) e na quantidade relativa (Figura 12B) de células Foxp3^+ no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência em comparação com camundongos Balb/C alimentados com dieta controle.

Figura 12 – Dieta hiperlipídica promove diminuição de Tregs no PVAT. As figuras mostram a expressão (A) e o número de Tregs (B) no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Controle) ou dieta hiperlipídica (HFD). Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. Balb/C Controle ($n=5-6$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica.

Efeito da dieta hiperlipídica sobre o perfil neutrofílico no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência

Em camundongos Balb/C alimentados com dieta hiperlipídica houve aumento na quantidade relativa de neutrófilos no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência em comparação com camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Figura 13A). Ainda neste contexto, a dieta hiperlipídica promoveu aumento nos níveis da quimiocina KC (Figura 13B) e na atividade de mieloperoxidase (MPO, Figura 13C).

A

B

C

Figura 13 – Dieta hiperlipídica promove aumento de neutrófilos no PVAT. As figuras mostram o número de neutrófilos (A), níveis da quimiocina KC (B) e atividade de MPO (C) no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Controle) ou dieta hiperlipídica (HFD). Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. Balb/C Controle ($n=5$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; MPO: mieloperoxidase.

Efeito da dieta hiperlipídica sobre os níveis de citocinas plasmáticas e no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência

Em camundongos Balb/C alimentados com dieta hiperlipídica houve aumento nos níveis plasmáticos de IL-6. Todavia, este aumento foi pronunciado em camundongos *knockouts* para o receptor ST2 (Figura 14A). Antagônico a este achado, em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica houve redução significativa nos níveis plasmáticos de IL-10 (Figura 14B). Houve aumento de IL-6 (Figura 14C) e redução de IL-10 (Figura 14D) no PVAT de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, este aumento foi pronunciado em camundongos *knockouts* para o receptor ST2.

Figura 14 – A ausência do receptor para IL-33 exacerba o aumento de IL-6 e redução de IL-10 em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. As figuras mostram os níveis plasmáticos de IL-6 (A), IL-10 (B) e os níveis no PVAT de IL-6 (C), IL-10 (D), quantificados por ELISA, em camundongos Balb/C e *knockouts* (KO) para o receptor ST2 alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. Balb/C Controle; #, $p < 0,05$ vs. ST2 KO Controle; +, $p < 0,05$ vs. Balb/C HFD ($n = 5$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Efeito da dieta hiperlipídica sobre a geração de espécies reativas de oxigênio no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência

Em camundongos Balb/C alimentados com dieta hiperlipídica houve aumento na geração do radical livre ânion superóxido no PVAT, todavia, este aumento foi pronunciado em camundongos *knockouts* para o receptor ST2 (Figura 15A). Houve aumento significativo na geração de peróxido de hidrogênio apenas no PVAT de camundongos *knockouts* para o receptor ST2 alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 15B). Dieta hiperlipídica promoveu aumento nos níveis de TBARS no PVAT de camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2, com aumento mais pronunciado em camundongos *knockouts* para o receptor ST2 (Figura 15C).

Figura 15 – A ausência do receptor para IL-33 exacerba o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio no PVAT de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. As figuras mostram medidas de ânion superóxido (A) e peróxido de hidrogênio (B) através de quimiluminescência da lucigenina e amplex red, respectivamente e níveis de TBARS (C) no PVAT de camundongos Balb/C e *knockout* (KO) para o receptor ST2 alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. *, $p < 0,05$ vs. Balb/C Controle; #, $p < 0,05$ vs. ST2 KO Controle; +, $p < 0,05$ vs. Balb/C HFD ($n=6$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica.

Contribuição da geração de espécies reativas de oxigênio para os efeitos da dieta hiperlipídica na função do PVAT de artérias mesentéricas de resistência

A incubação com o antioxidante tiron (10^{-4} M por 60 minutos) promoveu a perda parcial do efeito anticontrátil do PVAT em camundongos Balb/C alimentados com dieta controle (Figuras 16A e 17A). No entanto, tiron reduziu a contração nos vasos circundados por PVAT de camundongos Balb/C alimentados com dieta hiperlipídica (Figuras 16B e 17B). Efeitos similares foram observados nos camundongos *knockouts* para o receptor ST2, onde tiron promoveu perda parcial do efeito anticontrátil do PVAT após dieta controle (Figuras 16C e 17C) e reduziu a contração de vasos circundados por PVAT após dieta hiperlipídica (Figura 16D e 17D).

Figura 16 – Tiron *in vitro* restaura o efeito anticontrátil do PVAT em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Curvas concentração-efeito para fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C (A e B) e *knockouts* (KO) para o receptor ST2 (C e D) alimentados com dieta controle (Controle) ou hiperlipídica (HFD). As curvas foram realizadas com ou sem PVAT e na presença de Tiron (10^{-4} M por 60 minutos) ou veículo. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=7-8 para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Figura 17 – Valores de Emáx para contração induzida por fenilefrina. Emáx de curvas concentração-efeito para fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C e ST2 *knockout* (KO) alimentados com dieta controle (Controle, A e C) ou hiperlipídica (HFD, B e D). Os valores foram determinados em artérias com ou sem PVAT e na presença de Tiron (10^{-4} M por 60 minutos) ou veículo. Dados expressos como média $\pm$ E.P.M. +, $p < 0,05$ vs. respectivo PVAT (+); *, $p < 0,05$ vs. PVAT (-)_Tiron ($n=6-7$ para cada grupo experimental). HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Tabela 4 – Valores de pD_2 para contração induzida por fenilefrina em artérias mesentéricas de resistência de camundongos Balb/C e *knockouts* para o receptor ST2 alimentados com dieta controle ou hiperlipídica.

pD_2				
Grupos	Balb/C Controle	Balb/C HFD	ST2 KO Controle	ST2 KO HFD
PVAT (-)	6.3 ± 0.06 ($n=7$)	6.6 ± 0.07 ($n=7$)	6.3 ± 0.10 ($n=7$)	6.9 ± 0.06 ($n=7$)
PVAT (-)_Tiron	6.4 ± 0.07 ($n=6$)	6.6 ± 0.09 ($n=6$)	6.5 ± 0.09 ($n=6$)	6.5 ± 0.09 ($n=6$)
PVAT (+)	6.0 ± 0.07 ($n=7$)	6.7 ± 0.08 ($n=7$)	6.1 ± 0.07 ($n=7$)	6.8 ± 0.11 ($n=7$)
PVAT (+)_Tiron	6.1 ± 0.09 ($n=6$)	6.2 ± 0.08 ($n=6$) ⁺	6.4 ± 0.08 ($n=6$) ⁺	6.5 ± 0.08 ($n=6$) ⁺

Dados representam a média $\pm$ EPM. +, $p < 0,05$ vs. respectivo PVAT (+) HFD: *high fat diet* – dieta hiperlipídica; PVAT: *perivascular adipose tissue* – tecido adiposo perivascular.

Discussão

É evidente que o tecido adiposo não participa apenas do controle da homeostasia energética do organismo. Diversos estudos mostram que o tecido adiposo é capaz de produzir e secretar adipocinas e outros fatores que atuam de maneira parácrina ou endócrina, influenciando uma série de processos fisiológicos. O consumo crônico de alimentos com alto teor em lipídeos proporciona diversas modificações estruturais e funcionais dos adipócitos, comprometendo assim a função integradora deste tecido. Os experimentos realizados neste estudo investigaram um dos possíveis mecanismos envolvidos na disfunção do PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência e, conseqüentemente, nas alterações de reatividade vascular de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

Inicialmente, caracterizamos as alterações no perfil bioquímico dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Após 18 semanas de dieta rica em gordura, não observamos diferenças significativas na massa corporal dos camundongos Balb/C. Este fato corrobora dados da literatura que mostram que camundongos Balb/C são protegidos contra o aumento de massa corporal promovido por dieta rica em gordura (Montgomery, M.K. *et al.* 2013). Notavelmente, o caráter genético da espécie deve ser considerado cuidadosamente para explicar tal proteção. Entendemos que camundongos C57Bl/6J, cujo modelo de obesidade é bem caracterizado pelo nosso grupo, seriam o modelo preditivo a ser adotado. No entanto, considerando que o *background* dos animais *knockouts*, ou seja, a linhagem de camundongos utilizada para produzir os animais *knockouts* utilizados neste estudo está na linhagem Balb/C, e que devemos idealmente utilizar animais com mesma carga genética, optamos por usar camundongos Balb/C.

Embora a ausência de ganho de massa corporal dos camundongos Balb/C frente à dieta hiperlipídica represente uma limitação do estudo, o mesmo se tornou exequível mediante a observação que os camundongos *knockouts* para o receptor ST2 alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram significativo aumento da massa corporal e índice de adiposidade maior que 10% (dado não apresentado na seção resultados), parâmetros que caracterizam a

obesidade. De fato, a ausência do receptor ST2, e consequente perda da atividade da IL-33, compromete o metabolismo corporal frente à estímulos obesogênicos. Miller e colaboradores mostraram que camundongos *knockouts* para o receptor ST2, alimentados com dieta hiperlipídica durante 24 semanas, apresentam aumento na massa corporal, acompanhada por hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, e aumento significativo da relação água *versus* lipídeos corporais (Miller, A.M. *et al.* 2010).

A obesidade é uma condição metabólica em que se observa aumento nas concentrações séricas e teciduais de ácidos graxos livres, sejam estes esterificados ou não esterificados, proporcionando acúmulo de lipídeos nos adipócitos e produção de colesterol no fígado (Ginsberg, H.N. *et al.* 2005). Nosso estudo mostrou que os camundongos mantidos em dieta hiperlipídica apresentaram aumento nas concentrações de colesterol total, sugerindo modificações importantes no metabolismo de lipoproteínas. Além disso, a dieta hiperlipídica favoreceu aumento nos níveis plasmáticos de insulina, glicose, bem como intolerância a este carboidrato, fatores que predispoem a eventos cardiovasculares.

As alterações na função anticontrátil do PVAT na obesidade estão correlacionadas com desequilíbrio na produção de adipocinas, presença de inflamação e estresse oxidativo (Szasz, T. *et al.* 2013). A sequência destes eventos contrapõe os efeitos protetores deste tecido e conduz à disfunção vascular na obesidade. Os resultados apresentados neste estudo dão suporte a existência de alterações na função do PVAT e, consequentemente, na modulação pelo PVAT da contração vascular em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, uma vez que o efeito anticontrátil deste tecido foi perdido neste modelo. Nossos achados são consistentes com estudos que descreveram comprometimento da influência vasodilatadora do PVAT em camundongos obesos por dieta hiperlipídica (Marchesi, C. *et al.* 2009), além de aumento nos efeitos contráteis mediados pelo PVAT em artérias de animais obesos (Owen, M.K. *et al.* 2013). É importante considerar que a perda do efeito anticontrátil do PVAT nos camundongos Balb/C se mostrou parcial, ou seja, houve efeito anticontrátil em menor

amplitude. Este dado pode ter correlação direta apenas com as alterações no metabolismo corporal, ou seja, alterações no perfil glicêmico e colesterolêmico, e não necessariamente correlação com a massa corporal.

A inovação deste estudo está na tentativa de esclarecer o papel do sistema imune adaptativo, neste caso orquestrado pela IL-33 via receptor ST2, na manutenção da função anticontrátil do PVAT. Camundongos *knockouts* para o receptor ST2 mostraram resposta exacerbada aos efeitos deletérios da dieta hiperlipídica. Em ausência do receptor ST2, a perda do efeito anticontrátil do PVAT foi completa, uma vez que, os segmentos vasculares em presença ou ausência do PVAT conectivo mostraram respostas contráteis semelhantes à fenilefrina. De fato, o ligante deste receptor, a IL-33, desenvolve múltiplas ações na homeostasia do tecido adiposo corporal e perivascular. IL-33 via receptor ST2 previne a resistência insulínica no tecido adiposo epididimal, além de impedir a inflamação deste tecido, reduzindo a migração de macrófagos e recrutando células imunes com papel anti-inflamatório (Miller, A.M. *et al.* 2010).

Em condições fisiológicas, a presença ou ausência do PVAT não afeta a resposta vasodilatadora da acetilcolina, visto que os efeitos dos PVRFs produzidos pelo PVAT somam-se aos efeitos dos fatores relaxantes derivados do endotélio. Entretanto, observamos que a dieta hiperlipídica reduziu a resposta vasodilatadora da acetilcolina apenas em segmentos vasculares circundados pelo PVAT. Notavelmente, este efeito mostra que o PVAT é capaz de produzir e secretar fatores que promovem a contração do MLV e/ou que interferem com a liberação/ação de fatores relaxantes derivados do endotélio. Alguns fatores produzidos pelo PVAT, como leptina (Knudson, J.D. *et al.* 2005), resistina (Dick, G.M. *et al.* 2006), citocinas inflamatórias (Picchi, A. *et al.* 2006) e EROs (Gao, Y.J. *et al.* 2006), podem atenuar a resposta vasodilatadora da acetilcolina na condição de obesidade. É digno de nota que a redução da vasodilatação mediada pela acetilcolina foi acentuada nos camundongos *knockouts* para o receptor ST2. Sendo assim, é perfeitamente possível inferir que a IL-33 via receptor

ST2 é crucial para o controle das funções fisiológicas do PVAT e que a remoção deste mecanismo na condição de obesidade exacerba a disfunção do PVAT e, conseqüentemente, a disfunção vascular.

Nossa hipótese inicial pressupunha que a obesidade reduz os níveis de IL-33 no PVAT de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Contrariamente ao esperado, o consumo crônico de lipídeos resultou no aumento dos níveis de IL-33 no PVAT e também na corrente sanguínea. Achados semelhantes também foram encontrados pelo grupo do professor Kallies, onde camundongos alimentados durante 40 semanas com dieta hiperlipídica mostram aumento nos níveis de IL-33 no TAV (Vasanthakumar, A. *et al.* 2015).

Em função de termos encontrado aumento nos níveis de IL-33, avaliamos também a expressão do receptor ST2 no PVAT dos camundongos alimentados com dieta controle e hiperlipídica. Não observamos diferenças na expressão total do receptor. No entanto, ao avaliar a expressão da isoforma solúvel do receptor, observamos aumento desta isoforma no PVAT e no plasma de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Em indivíduos com obesidade severa, ocorre aumento da expressão do receptor ST2 solúvel no tecido adiposo e em células endoteliais de microvasos que irrigam o tecido adiposo (Zeyda, M. *et al.* 2013). Como mencionado anteriormente, a isoforma solúvel do receptor ST2 liga-se à IL-33 e impossibilita que a mesma ative vias de sinalização celular, após ligação ao receptor de membrana (Villacorta, H. *et al.* 2016).

Para avaliar se a IL-33 teria ações de curto prazo ou efeitos agudos sobre o PVAT, incubamos artérias circundadas por PVAT dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica com IL-33 recombinante por 60 minutos. Nenhuma mudança na função do PVAT foi observada nestas condições. Embora estudos mostrem que a IL-33 facilita a fosforilação de enzimas que produzem moléculas vasodilatadoras, como a óxido nítrico sintase endotelial (Choi, Y.S. *et al.* 2009), diminui a inflamação e o estresse oxidativo cardiovascular (Sanada, S. *et al.* 2007), acreditamos que o longo período de alimentação rica

em lipídeos promove modificações teciduais mais complexas e que demandam a integração de outros sistemas biológicos para o reparo tecidual.

A IL-33 garante a expansão e manutenção de Tregs. Logo, camundongos *knockouts* para o receptor ST2 teoricamente teriam deficiência na população e também na função destas células. De fato, camundongos obesos por dieta hiperlipídica apresentam redução na população de Tregs no TAV, devido a deficiente atividade de IL-33 (Vasanthakumar, A. *et al.* 2015). Nós mostramos neste estudo que a dieta hiperlipídica reduz significativamente a população de Tregs no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência, o que favorece a inflamação e posterior perda do efeito anticontrátil deste tecido. Bailey-Downs e colaboradores demonstraram que camundongos C57BL/6J obesos por dieta hiperlipídica apresentam aumento na infiltração de macrófagos inflamatórios e na produção de citocinas pró-inflamatórias no PVAT que circunda a aorta (Bailey-Downs, L.C. *et al.* 2013).

A redução da atividade da IL-33 favorece a migração de macrófagos e monócitos inflamatórios para o TAV de camundongos obesos (Vasanthakumar, A. *et al.* 2015). Temos indícios de que a dieta hiperlipídica não promove mudanças significativas no número de macrófagos e monócitos inflamatórios no PVAT que circunda artérias mesentéricas de camundongos Balb/C (dados não apresentados na seção resultados). Todavia, a dieta hiperlipídica promoveu aumento no infiltrado de neutrófilos no PVAT que circunda artérias mesentéricas de camundongos Balb/C. Este aumento é proporcionalmente acompanhado por maior atividade de MPO e aumento nos níveis da proteína quimiotática de neutrófilos KC. De fato, outros estudos reforçam que a obesidade está associada à maior atividade de neutrófilos (Xu, X. *et al.* 2015, Brotfain, E. *et al.* 2015). Além disso, em indivíduos obesos, o infiltrado de neutrófilos no PVAT contribui para resistência à insulina dos adipócitos e redução na produção de PVRFs (Guzik, T.J. *et al.* 2017).

Neste estudo, observamos aumento significativo nos níveis de citocinas pró-inflamatórias. O aumento de citocinas pró-inflamatórias tem papel importante na disfunção

vascular. Por ação direta, citocinas ativam vias de sinalização contráteis em CMLV, além de reduzir a ativação de vias relaxantes (Mozos, I. *et al.* 2017). No PVAT, citocinas pró-inflamatórias reduzem a liberação de PVRFs, favorecem a liberação de substâncias contráteis e contribuem para o *feedback* positivo de liberação de citocinas pró-inflamatórias (Nosalski, R. *et al.* 2017).

Além de efeitos vasculares diretos das citocinas pró-inflamatórias, atualmente se destaca o efeito indireto das mesmas na produção de EROs. EROs, tais como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, possuem papel importante na modulação da função vascular mediada pelo PVAT (Gao, Y.J. *et al.* 2006, Gao, Y.J. *et al.* 2007). Dados deste estudo permitem inferir que diminuição na população de Tregs no PVAT de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica favorece o infiltrado de neutrófilos e, conseqüentemente, o estresse oxidativo. Em consonância com nossos resultados, Gil-Ortega e colaboradores demonstraram que camundongos C57Bl/6J suplementados com dieta hiperlipídica durante 32 semanas apresentam aumento significativo na geração de EROs no PVAT da região mesentérica, e que este aumento está associado à infiltração de macrófagos pró-inflamatórios (Gil-Ortega, M. *et al.* 2014).

Entendemos que os *links* entre IL-33, inflamação e estresse oxidativo no PVAT de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica podem ser aperfeiçoados. O tratamento dos camundongos alimentados com dieta hiperlipídica com IL-33 recombinante, a fim de reestabelecer a atividade funcional desta interleucina, bem como avaliação da população de Tregs, do perfil inflamatório e do estresse oxidativo no PVAT que circunda artérias mesentéricas de resistência, permitirão inferências mais diretas sobre o papel da IL-33 na inflamação e estresse oxidativo no PVAT de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. Estes experimentos, que ainda serão realizados, certamente permitirão estabelecer uma relação causal entre o sistema imune adaptativo e a atividade funcional do PVAT e da função vascular.

Conclusão

Com os dados apresentados neste estudo é possível concluir que IL-33 via receptor ST2 modula a função anticontrátil do PVAT e que deficiências nesta via, causadas pelo consumo crônico de lipídeos, favorece a inflamação, estresse oxidativo e perda da integridade funcional deste tecido.

Referências bibliográficas

Amis, E. S., Jr. e J. J. Cronan (1988). "The renal sinus: an imaging review and proposed nomenclature for sinus cysts." J Urol **139**(6): 1151-1159.

Bagi, Z., A. Feher e J. Cassuto (2012). "Microvascular responsiveness in obesity: implications for therapeutic intervention." Br J Pharmacol **165**(3): 544-560. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01606.x.

Bailey-Downs, L. C., Z. Tucsek, P. Toth, D. Sosnowska, T. Gautam, W. E. Sonntag, et al. (2013). "Aging exacerbates obesity-induced oxidative stress and inflammation in perivascular adipose tissue in mice: a paracrine mechanism contributing to vascular redox dysregulation and inflammation." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **68**(7): 780-792. DOI: 10.1093/gerona/gls238.

Barhoumi, T., D. A. Kasal, M. W. Li, L. Shbat, P. Laurant, M. F. Neves, *et al.* (2011). "T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury." Hypertension **57**(3): 469-476. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.162941.

Barton, M., O. Baretella e M. R. Meyer (2012). "Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction." Br J Pharmacol **165**(3): 591-602. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01472.x.

Belkaid, Y. (2007). "Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity." Nat Rev Immunol **7**(11): 875-888. DOI: 10.1038/nri2189.

Boutin, P. e P. Froguel (2001). "Genetics of human obesity." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **15**(3): 391-404. DOI: 10.1053/beem.2001.0153.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brown, W. V., K. Fujioka, P. W. Wilson e K. A. Woodworth (2009). "Obesity: why be concerned?" Am J Med **122**(4 Suppl 1): S4-11. DOI: 10.1016/j.amjmed.2009.01.002.

Brotfain, E., N. Hadad, Y. Shapira, E. Avinoah, A. Zlotnik, L. Raichel, et al. (2015). "Neutrophil functions in morbidly obese subjects." Clin Exp Immunol **181**(1): 156-163. DOI: 10.1111/cei.12631.

Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, *et al.* (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73. DOI: 10.1038/83784.

Chang, L., H. Milton, D. T. Eitzman e Y. E. Chen (2013). "Paradoxical roles of perivascular adipose tissue in atherosclerosis and hypertension." Circ J **77**(1): 11-18.

Chang, L., L. Villacorta, R. Li, M. Hamblin, W. Xu, C. Dou, *et al.* (2012). "Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis." Circulation **126**(9): 1067-1078. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.104489.

Choi, Y. S., H. J. Choi, J. K. Min, B. J. Pyun, Y. S. Maeng, H. Park, *et al.* (2009). "Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production." Blood **114**(14): 3117-3126. DOI: 10.1182/blood-2009-02-203372.

Cipolletta, D., M. Feuerer, A. Li, N. Kamei, J. Lee, S. E. Shoelson, *et al.* (2012). "PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells." Nature **486**(7404): 549-553. DOI: 10.1038/nature11132.

Coelho, M., T. Oliveira e R. Fernandes (2013). "Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ." Arch Med Sci **9**(2): 191-200. DOI: 10.5114/aoms.2013.33181.

da Costa, R. M., R. S. Fais, C. R. P. Dechandt, P. Louzada-Junior, L. C. Alberici, N. S. Lobato, *et al.* (2017). "Increased mitochondrial ROS generation mediates the loss of the anti-contractile effects of perivascular adipose tissue in high-fat diet obese mice." Br J Pharmacol **174**(20): 3527-3541. DOI: 10.1111/bph.13687.

Dick, G. M., P. S. Katz, M. Farias, 3rd, M. Morris, J. James, J. D. Knudson, *et al.* (2006). "Resistin impairs endothelium-dependent dilation to bradykinin, but not acetylcholine, in the coronary circulation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(6): H2997-3002. DOI: 10.1152/ajpheart.01035.2005.

Dorrance, A. M. (2007). "Interleukin 1-beta (IL-1beta) enhances contractile responses in endothelium-denuded aorta from hypertensive, but not normotensive, rats." Vascul Pharmacol **47**(2-3): 160-165. DOI: 10.1016/j.vph.2007.05.007.

Dubrovskaya, G., S. Verlohren, F. C. Luft e M. Gollasch (2004). "Mechanisms of ADRF release from rat aortic adventitial adipose tissue." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(3): H1107-1113. DOI: 10.1152/ajpheart.00656.2003.

Dulloo, A. G., J. Jacquet, G. Solinas, J. P. Montani e Y. Schutz (2010). "Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome." Int J Obes (Lond) **34** Suppl 2: S4-17. DOI: 10.1038/ijo.2010.234.

- Fesus, G., G. Dubrovskaya, K. Gorzelniak, R. Kluge, Y. Huang, F. C. Luft, *et al.* (2007). "Adiponectin is a novel humoral vasodilator." Cardiovasc Res **75**(4): 719-727. DOI: 10.1016/j.cardiores.2007.05.025.
- Feuerer, M., J. A. Hill, D. Mathis e C. Benoist (2009). "Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes." Nat Immunol **10**(7): 689-695. DOI: 10.1038/ni.1760.
- Fitzgibbons, T. P., S. Kogan, M. Aouadi, G. M. Hendricks, J. Straubhaar e M. P. Czech (2011). "Similarity of mouse perivascular and brown adipose tissues and their resistance to diet-induced inflammation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(4): H1425-1437. DOI: 10.1152/ajpheart.00376.2011.
- Gao, Y. J., C. Lu, L. Y. Su, A. M. Sharma e R. M. Lee (2007). "Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide." Br J Pharmacol **151**(3): 323-331. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707228.
- Gao, Y. J., K. Takemori, L. Y. Su, W. S. An, C. Lu, A. M. Sharma, *et al.* (2006). "Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion." Cardiovasc Res **71**(2): 363-373. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.03.013.
- Gao, Y. J., Z. H. Zeng, K. Teoh, A. M. Sharma, L. Abouzahr, I. Cybulsky, *et al.* (2005). "Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery." J Thorac Cardiovasc Surg **130**(4): 1130-1136. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2005.05.028.
- Garg, A. (2004). "Regional adiposity and insulin resistance." J Clin Endocrinol Metab **89**(9): 4206-4210. DOI: 10.1210/jc.2004-0631.
- Gil-Ortega, M., L. Condezo-Hoyos, C. F. Garcia-Prieto, S. M. Arribas, M. C. Gonzalez, I. Aranguez, *et al.* (2014). "Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates long-term high-fat diet-derived endothelial dysfunction." PLoS One **9**(4): e95312. DOI: 10.1371/journal.pone.0095312.
- Ginsberg, H. N., Y. L. Zhang e A. Hernandez-Ono (2005). "Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes." Arch Med Res **36**(3): 232-240. DOI: 10.1016/j.arcmed.2005.01.005.
- Gollasch, M. e G. Dubrovskaya (2004). "Paracrine role for periadventitial adipose tissue in the regulation of arterial tone." Trends Pharmacol Sci **25**(12): 647-653. DOI: 10.1016/j.tips.2004.10.005.
- Guzik, T. J., P. J. Marvar, M. Czesnikiewicz-Guzik e R. Korbut (2007). "Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction." J Physiol Pharmacol **58**(4): 591-610.

- Guzik, T. J., D. S. Skiba, R. M. Touyz e D. G. Harrison (2017). "The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue." Cardiovasc Res **113**(9): 1009-1023. DOI: 10.1093/cvr/cvx108.
- Haraldsen, G., J. Balogh, J. Pollheimer, J. Sponheim e A. M. Kuchler (2009). "Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin?" Trends Immunol **30**(5): 227-233. DOI: 10.1016/j.it.2009.03.003.
- Haribhai, D., J. B. Williams, S. Jia, D. Nickerson, E. G. Schmitt, B. Edwards, *et al.* (2011). "A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity." Immunity **35**(1): 109-122. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.03.029.
- Hartge, M. M., T. Unger e U. Kintscher (2007). "The endothelium and vascular inflammation in diabetes." Diab Vasc Dis Res **4**(2): 84-88. DOI: 10.3132/dvdr.2007.025.
- Hayakawa, H., M. Hayakawa, A. Kume e S. Tominaga (2007). "Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation." J Biol Chem **282**(36): 26369-26380. DOI: 10.1074/jbc.M704916200.
- Henrichot, E., C. E. Juge-Aubry, A. Pernin, J. C. Pache, V. Velebit, J. M. Dayer, *et al.* (2005). "Production of chemokines by perivascular adipose tissue: a role in the pathogenesis of atherosclerosis?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2594-2599. DOI: 10.1161/01.ATV.0000188508.40052.35.
- Hori, S., T. Nomura e S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061. DOI: 10.1126/science.1079490.
- Hotamisligil, G. S. (2017). "Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders." Nature **542**(7640): 177-185. DOI: 10.1038/nature21363.
- Hotamisligil, G. S., N. S. Shargill e B. M. Spiegelman (1993). "Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance." Science **259**(5091): 87-91.
- Iozzo, P. (2011). "Myocardial, perivascular, and epicardial fat." Diabetes Care **34 Suppl 2**: S371-379. DOI: 10.2337/dc11-s250.
- Jonuleit, H. e E. Schmitt (2003). "The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations." J Immunol **171**(12): 6323-6327.
- Kasprowicz, D. J., P. S. Smallwood, A. J. Tyznik e S. F. Ziegler (2003). "Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function." J Immunol **171**(3): 1216-1223.

Ketonen, J., J. Shi, E. Martonen e E. Mervaala (2010). "Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice." Circ J **74**(7): 1479-1487.

Knudson, J. D., U. D. Dincer, C. Zhang, A. N. Swafford, Jr., R. Koshida, A. Picchi, et al. (2005). "Leptin receptors are expressed in coronary arteries, and hyperleptinemia causes significant coronary endothelial dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(1): H48-56. DOI: 10.1152/ajpheart.01159.2004.

Kobori, A., Y. Yagi, H. Imaeda, H. Ban, S. Bamba, T. Tsujikawa, *et al.* (2010). "Interleukin-33 expression is specifically enhanced in inflamed mucosa of ulcerative colitis." J Gastroenterol **45**(10): 999-1007. DOI: 10.1007/s00535-010-0245-1.

Kopelman, P. G. (2000). "Obesity as a medical problem." Nature **404**(6778): 635-643. DOI: 10.1038/35007508.

Larsson, B., K. Svardsudd, L. Welin, L. Wilhelmsen, P. Bjorntorp e G. Tibblin (1984). "Abdominal adipose tissue distribution, obesity, and risk of cardiovascular disease and death: 13 year follow up of participants in the study of men born in 1913." Br Med J (Clin Res Ed) **288**(6428): 1401-1404.

Le, H., W. Kim, J. Kim, H. R. Cho e B. Kwon (2013). "Interleukin-33: a mediator of inflammation targeting hematopoietic stem and progenitor cells and their progenies." Front Immunol **4**: 104. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00104.

Lehman, S. J., J. M. Massaro, C. L. Schlett, C. J. O'Donnell, U. Hoffmann e C. S. Fox (2010). "Peri-aortic fat, cardiovascular disease risk factors, and aortic calcification: the Framingham Heart Study." Atherosclerosis **210**(2): 656-661. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.007.

Leibowitz, A., A. Rehman, P. Paradis e E. L. Schiffrin (2013). "Role of T regulatory lymphocytes in the pathogenesis of high-fructose diet-induced metabolic syndrome." Hypertension **61**(6): 1316-1321. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.203521.

Lohn, M., G. Dubrovskaja, B. Lauterbach, F. C. Luft, M. Gollasch e A. M. Sharma (2002). "Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor." FASEB J **16**(9): 1057-1063. DOI: 10.1096/fj.02-0024com.

Lumeng, C. N., J. L. Bodzin e A. R. Saltiel (2007). "Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization." J Clin Invest **117**(1): 175-184. DOI: 10.1172/JCI29881.

Ma, L., S. Ma, H. He, D. Yang, X. Chen, Z. Luo, *et al.* (2010). "Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats." Hypertens Res **33**(5): 446-453. DOI: 10.1038/hr.2010.11.

Maenhaut, N. e J. Van de Voorde (2011). "Regulation of vascular tone by adipocytes." BMC Med **9**: 25. DOI: 10.1186/1741-7015-9-25.

Marchesi, C., T. Ebrahimian, O. Angulo, P. Paradis e E. L. Schiffrin (2009). "Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome." Hypertension **54**(6): 1384-1392. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138305.

McLaughlin, T., C. Lamendola, A. Liu e F. Abbasi (2011). "Preferential fat deposition in subcutaneous versus visceral depots is associated with insulin sensitivity." J Clin Endocrinol Metab **96**(11): E1756-1760. DOI: 10.1210/jc.2011-0615.

Miao, C. Y. e Z. Y. Li (2012). "The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth." Br J Pharmacol **165**(3): 643-658. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01404.x.

Mikolajczyk, T. P., R. Nosalski, P. Szczepaniak, K. Budzyn, G. Osmenda, D. Skiba, *et al.* (2016). "Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension." FASEB J **30**(5): 1987-1999. DOI: 10.1096/fj.201500088R.

Miller, A. M., D. L. Asquith, A. J. Hueber, L. A. Anderson, W. M. Holmes, A. N. McKenzie, *et al.* (2010). "Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice." Circ Res **107**(5): 650-658. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.218867.

Miller, A. M. (2011). "Role of IL-33 in inflammation and disease." J Inflamm (Lond) **8**(1): 22. DOI: 10.1186/1476-9255-8-22.

Miller, A. M. e F. Y. Liew (2011). "The IL-33/ST2 pathway--A new therapeutic target in cardiovascular disease." Pharmacol Ther **131**(2): 179-186. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2011.02.005.

Montgomery, M. K., N. L. Hallahan, S. H. Brown, M. Liu, T. W. Mitchell, G. J. Cooney, *et al.* (2013). "Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding." Diabetologia **56**(5): 1129-1139. DOI: 10.1007/s00125-013-2846-8.

Moussion, C., N. Ortega e J. P. Girard (2008). "The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'?" PLoS One **3**(10): e3331. DOI: 10.1371/journal.pone.0003331.

Mozos, I., C. Malainer, J. Horbanczuk, C. Gug, D. Stoian, C. T. Luca, *et al.* (2017). "Inflammatory Markers for Arterial Stiffness in Cardiovascular Diseases." Front Immunol **8**: 1058. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01058.

Mulvany, M. J. e W. Halpern (1977). "Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats." Circ Res **41**(1): 19-26.

Nakamura, M., M. Tanaka, N. Kinukawa, S. Abe, K. Itoh, K. Imai, *et al.* (2000). "Association between basal serum and leptin levels and changes in abdominal fat distribution during weight loss." J Atheroscler Thromb **6**(1): 28-32.

Nosalski, R. e T. J. Guzik (2017). "Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease." Br J Pharmacol **174**(20): 3496-3513. DOI: 10.1111/bph.13705.

Owen, M. K., F. A. Witzmann, M. L. McKenney, X. Lai, Z. C. Berwick, S. P. Moberly, *et al.* (2013). "Perivascular adipose tissue potentiates contraction of coronary vascular smooth muscle: influence of obesity." Circulation **128**(1): 9-18. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001238.

Pekala, P., M. Kawakami, W. Vine, M. D. Lane e A. Cerami (1983). "Studies of insulin resistance in adipocytes induced by macrophage mediator." J Exp Med **157**(4): 1360-1365.

Picchi, A., X. Gao, S. Belmadani, B. J. Potter, M. Focardi, W. M. Chilian, *et al.* (2006). "Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome." Circ Res **99**(1): 69-77. DOI: 10.1161/01.RES.0000229685.37402.80.

Prins, J. B. (2002). "Adipose tissue as an endocrine organ." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **16**(4): 639-651.

Salgado-Somoza, A., E. Teijeira-Fernandez, A. L. Fernandez, J. R. Gonzalez-Juanatey e S. Eiras (2010). "Proteomic analysis of epicardial and subcutaneous adipose tissue reveals differences in proteins involved in oxidative stress." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(1): H202-209. DOI: 10.1152/ajpheart.00120.2010.

Sanada, S., D. Hakuno, L. J. Higgins, E. R. Schreiter, A. N. McKenzie e R. T. Lee (2007). "IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system." J Clin Invest **117**(6): 1538-1549. DOI: 10.1172/JCI30634.

Schroeter, M. R., N. Eschholz, S. Herzberg, I. Jerchel, M. Leifheit-Nestler, F. S. Czepluch, *et al.* (2013). "Leptin-dependent and leptin-independent paracrine effects of perivascular adipose tissue on neointima formation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(5): 980-987. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301393.

Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." Immunity **30**(5): 636-645. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.04.010.

Skurk, T., C. Alberti-Huber, C. Herder e H. Hauner (2007). "Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion." J Clin Endocrinol Metab **92**(3): 1023-1033. DOI: 10.1210/jc.2006-1055.

Soltis, E. E. e L. A. Cassis (1991). "Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness." Clin Exp Hypertens A **13**(2): 277-296.

Szasz, T., G. F. Bomfim e R. C. Webb (2013). "The influence of perivascular adipose tissue on vascular homeostasis." Vasc Health Risk Manag **9**: 105-116. DOI: 10.2147/VHRM.S33760.

Tago, K., T. Noda, M. Hayakawa, H. Iwahana, K. Yanagisawa, T. Yashiro, *et al.* (2001). "Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V." Biochem Biophys Res Commun **285**(5): 1377-1383. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5306.

Takaoka, M., H. Suzuki, S. Shioda, K. Sekikawa, Y. Saito, R. Nagai, *et al.* (2010). "Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(8): 1576-1582. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207175.

Thomassen, E., G. Kothny, S. Haas, J. Danescu, L. Hultner, P. Dormer, *et al.* (1995). "Role of cell type-specific promoters in the developmental regulation of T1, an interleukin 1 receptor homologue." Cell Growth Differ **6**(2): 179-184.

Tominaga, S. (1989). "A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor." FEBS Lett **258**(2): 301-304.

Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino e G. S. Hotamisligil (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function." Nature **389**(6651): 610-614. DOI: 10.1038/39335.

Vasanthakumar, A., K. Moro, A. Xin, Y. Liao, R. Gloury, S. Kawamoto, *et al.* (2015). "The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells." Nat Immunol **16**(3): 276-285. DOI: 10.1038/ni.3085.

Veras, F. P., R. S. Peres, A. L. Saraiva, L. G. Pinto, P. Louzada-Junior, T. M. Cunha, *et al.* (2015). "Fructose 1,6-bisphosphate, a high-energy intermediate of glycolysis, attenuates experimental arthritis by activating anti-inflammatory adenosinergic pathway." Sci Rep **5**: 15171. DOI: 10.1038/srep15171.

Verlohren, S., G. Dubrovskaya, S. Y. Tsang, K. Essin, F. C. Luft, Y. Huang, *et al.* (2004). "Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries." Hypertension **44**(3): 271-276. DOI: 10.1161/01.HYP.0000140058.28994.ec.

Villacorta, H. e A. S. Maisel (2016). "Soluble ST2 Testing: A Promising Biomarker in the Management of Heart Failure." Arq Bras Cardiol **106**(2): 145-152. DOI: 10.5935/abc.20150151.

Waki, H. e P. Tontonoz (2007). "Endocrine functions of adipose tissue." Annu Rev Pathol **2**: 31-56. DOI: 10.1146/annurev.pathol.2.010506.091859.

Wang, Y., E. B. Rimm, M. J. Stampfer, W. C. Willett e F. B. Hu (2005). "Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men." Am J Clin Nutr **81**(3): 555-563.

Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel e A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796-1808. DOI: 10.1172/JCI19246.

Weyer, C., J. E. Foley, C. Bogardus, P. A. Tataranni e R. E. Pratley (2000). "Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance." Diabetologia **43**(12): 1498-1506. DOI: 10.1007/s001250051560.

Xia, N. e H. Li (2017). "The role of perivascular adipose tissue in obesity-induced vascular dysfunction." Br J Pharmacol **174**(20): 3425-3442. DOI: 10.1111/bph.13650.

Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, *et al.* (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." J Clin Invest **112**(12): 1821-1830. DOI: 10.1172/JCI19451.

Xu, X., S. Su, X. Wang, V. Barnes, C. De Miguel, D. Ownby, *et al.* (2015). "Obesity is associated with more activated neutrophils in African American male youth." Int J Obes (Lond) **39**(1): 26-32. DOI: 10.1038/ijo.2014.194.

Zeyda, M., B. Wernly, S. Demyanets, C. Kaun, M. Hammerle, B. Hantusch, *et al.* (2013). "Severe obesity increases adipose tissue expression of interleukin-33 and its receptor ST2, both predominantly detectable in endothelial cells of human adipose tissue." Int J Obes (Lond) **37**(5): 658-665. DOI: 10.1038/ijo.2012.118.

Anexos

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Contribuição da interleucina 33 nas alterações vasculares mediadas pelo tecido adiposo perivascular em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica*", registrado com o número **209/2016**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Rita de Cássia Aleixo Tostes Passaglia**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 20 de fevereiro de 2017.

Este Protocolo prevê a utilização de 94 camundongos Balb/c machos pesando 35g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e 94 camundongos transgênicos machos ST2 KO pesando 35g oriundos do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 20/02/2017 a 20/08/2020.

We certify that the Protocol n° 209/2016, entitled "*Interleukin 33 contribution in vascular changes mediated by perivascular adipose tissue in mice submitted to high-fat diet*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 02/20/2017. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from phylum *Chordata*, subphylum *Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 94 male Balb/c mice weighing 35g from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo and 94 male transgenic mice ST2 KO weighing 35g from the Special Mice Breeding Center of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 08/20/2020.

Ribeirão Preto, 20 de fevereiro de 2017

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP