

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Joyce Elisa Heredia

**INFLUÊNCIA DO METABOLISMO NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA DA ARTRITE CRÔNICA EM MODELO  
EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte

2023

Joyce Elisa Heredia

**INFLUÊNCIA DO METABOLISMO NA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA DA ARTRITE CRÔNICA EM MODELO  
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marina Chaves de Oliveira

Belo Horizonte

2023

043

Heredia, Joyce Elisa.

Influência do metabolismo na resposta inflamatória da artrite crônica em modelo experimental [manuscrito] / Joyce Elisa Heredia. – 2022.  
72 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marina Chaves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Artrite Experimental. 3. Artrite Reumatoide. 4. Metformina. 5. Metabolismo. 6. Obesidade. I. Oliveira, Marina Chaves de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE JOYCE ELISA HEREDIA

Às **nove horas** do dia **29 de novembro de 2022**, reuniu-se online, via a plataforma Microsoft Teams, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**INFLUÊNCIA DO METABOLISMO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DA ARTRITE CRÔNICA EM MODELO EXPERIMENTAL**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Marina Chaves de Oliveira**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Marina Chaves de Oliveira	UFMG	APROVADA
Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira	UFMG	APROVADA
Dr. Flávio Almeida Amaral	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de novembro de 2022.**

Dra. Marina Chaves de Oliveira (Orientadora)

Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira

Dr. Flávio Almeida Amaral

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2022, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Chaves de Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 29/11/2022, às 14:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adaliene Versiani Matos Ferreira, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 30/11/2022, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 01/12/2022, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1929159** e o código CRC **09F1666F**.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à minha mãe Eliziane, à minha irmã Jéssica e ao meu pai Antônio que me deram todo o apoio emocional para que eu pudesse realizar esse trabalho. Sem vocês nada seria possível !

Agradeço também ao Pedro, por me escutar nos inúmeros ensaios de apresentações, por palpitar, por ler meus resumos, pelas noites de trabalho em claro e o mais importante: por sempre acreditar em mim e me apoiar.

Agradeço aos meus companheiros de graduação (Adma, Andressa, Cristiana, Lucas, Mariana, Mary e Dani), por trilhar essa caminhada comigo.

Agradeço à minha chefe Marina que me acompanhou desde a minha entrada no grupo, sempre acreditou na minha capacidade e sempre me deu inúmeras responsabilidades que possibilitou o meu crescimento como pesquisadora e docente. Muito obrigada por tudo!

Aproveito para agradecer à Dadá, que abriu as portas do IME para mim, sempre deu ótimos palpites e contribuiu expressivamente na minha formação como cientista; à Aninha por sempre me dar suporte e pela troca constante de conhecimento; à Adma, Mariele, Amandinha e Bruna, que foram companheiras de pós-graduação e sempre estavam presentes quando eu precisava. Agradecimento especial à Francine por todas as atividades desenvolvidas juntas, inclusive para compartilhar os perrengues; e ao Imunometabolismo e todos os integrantes, que me mostraram os caminhos para a ciência.

Agradeço à todas as agências financiadoras e ao meu programa de pós-graduação, Biologia Celular, pelo suporte financeiro; ao Lab Imunofarmacologia e toda equipe técnica que foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho; e à banca da disciplina seminários que contribuiu grandemente para o aperfeiçoamento desse trabalho.

A todos que me acompanharam nessa caminhada, meu muito obrigada!

## RESUMO

Artrite reumatoide (AR) é a doença reumática mais prevalente no mundo e seu prognóstico está relacionado com enrijecimento das articulações sinoviais, associado a dor e inchaço. Entretanto, os efeitos da AR não se restringem apenas às articulações. Pacientes com AR possuem alterações metabólicas sistêmicas, levando ao risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares. Quando a AR está associada com a obesidade, doença caracterizada pela expansão e inflamação do tecido adiposo, há pior prognóstico da doença. Entretanto, poucos trabalhos elucidam o papel do metabolismo na gravidade da artrite reumatoide. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar se as alterações metabólicas causadas pela obesidade alteram a resposta imunológica da artrite crônica experimental. Para isso, camundongos machos Balb/c foram alimentados durante todo o período experimental com dieta rica em carboidratos refinados (HC) ou dieta controle (C). Após 4 semanas, foi iniciado o protocolo de indução de artrite com injeção intra-articular de PBS ou mBSA (AIA). Após a primeira imunização, os animais foram tratados com 5mg/mL de metformina, administrada na água de beber *ad libitum* (MET). Foi formado os grupos experimentais (i) C PBS, (ii) C AIA, (iii) HC PBS, (iv) HC AIA, (v) C MET AIA, (vi) HC MET PBS e (vii) HC MET AIA. No dia do sacrifício foram realizados os seguintes procedimentos: medida de nocicepção e contagem total e diferencial de leucócitos no joelho, foram retirados e quantificados os tecidos adiposos viscerais e o soro para dosagem de glicose. O tecido adiposo epididimal e o joelho foram retirados para histologia. O joelho foi utilizado para dosagem das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-17 e para avaliação da mieloperoxidase (MPO). Os animais do grupo HC não tiveram aumento de peso, mas sim do índice de adiposidade, da glicemia e da área de adipócito, com aumento mais expressivo nos animais obesos com artrite. Esse mesmo grupo teve piora em marcadores da gravidade da artrite, como hiper nocicepção, aumento de neutrófilos e das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-17 na cavidade articular e maior score de artrite. O tratamento com metformina no grupo magro resultou em redução de todos os parâmetros metabólicos avaliados, como a glicemia, a área de adipócitos e o índice de adiposidade, além da redução inflamação articular, evidenciada pela menor contagem de neutrófilos e redução da enzima MPO. Ao avaliar animais obesos tratados com metformina, constatou que o houve redução foi a glicemia e a área de adipócitos mas não do índice de adiposidade. Entretanto, mais uma vez, todos os parâmetros

inflamatórios da artrite foram minimizados após o tratamento com a metformina. Com base nisso, conclui-se que o metabolismo da glicose parece ter influência no processo inflamatório nesse modelo de artrite experimental e em animais com dieta rica em carboidratos refinados. Nossos dados indicam, portanto, que a metformina tem potencial terapêutico na artrite associada ou não a obesidade.

**Palavras-chave:** Artrite experimental. Artrite reumatoide. Metformina. Metabolismo. Obesidade.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is the most prevalent rheumatic disease in the world, and its prognosis is related to synovial joints stiffing, associated with pain and swelling. However, RA's effects are not only restricted to joints. Patients with RA have systemic metabolic alterations, leading to an increased risk of developing cardiovascular diseases. When RA is associated with obesity, a disease characterized by the expansion and inflammation of adipose tissue, there is a worse prognosis. However, few studies elucidate the role of metabolism in the severity of rheumatoid arthritis. Thus, this study aimed to evaluate whether the metabolic alterations caused by obesity alter the immune response of chronic experimental arthritis. Male Balb/c mice were fed a high-carb diet (HC) or a chow diet (C) throughout the experimental period. After four weeks, the arthritis induction protocol started with an intra-articular injection of PBS or mBSA (AIA). After the first immunization, we treated animals with 5mg/mL of metformin, administered in the drinking water ad libitum (MET). Therefore, we formed experimental groups (i) C PBS, (ii) C AIA, (iii) HC PBS, (iv) HC AIA, (v) C MET AIA, (vi) HC MET PBS, and (vii) HC MET AIA. On the day of sacrifice, we performed the following procedures: measurement of nociception and total and differential leukocyte count in the knee, visceral adipose tissues, and serum were removed and quantified for glucose measurement. We removed the epididymal adipose tissue and knee for histology. In addition, we used the knee to measure IL-1 $\beta$  and IL-17 cytokines and to assess the myeloperoxidase enzyme (MPO). The animals that received the HC diet did not have a difference in weight but had an increase in the adiposity index, adipocyte area, and blood glucose. This same group had worsening markers of arthritis severity, such as hypernociception, increased neutrophils, IL-1 $\beta$ , and IL-17 cytokines in the joint cavity, and a higher arthritis score. Treatment with metformin in the lean group resulted in a reduction in all metabolic parameters evaluated, such as blood glucose, adipocyte area, and adiposity index, in addition to reduced joint inflammation, evidenced by lower neutrophil counts and reduced MPO enzyme. When evaluating obese animals treated with metformin, it was found that the reduction was in blood glucose and adipocyte area but not in the adiposity index. However, once again, all inflammatory parameters of arthritis were minimized after metformin treatment. Based on this, we found evidence that glucose metabolism influences the inflammatory process in this experimental arthritis model and animals with a diet rich in refined carbohydrates. Our data,

therefore, indicate that metformin has therapeutic potential in arthritis associated or not with obesity.

**Keywords:** Experimental arthritis. Rheumatoid arthritis. Metformin. Metabolism. Obesity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Articulação saudável e articulação com artrite reumatoide .....	19
Figura 2 - Expansão saudável e não saudável do tecido adiposo .....	22
Figura 3 - Interrelação da obesidade com a artrite .....	24
Figura 4 - Funções da metformina .....	27
Figura 5 - Delineamento Experimental .....	33
Figura 6 - Alterações sistêmicas decorrentes da dieta rica em carboidratos refinados (HC) e da artrite induzida por antígeno (AIA) .....	40
Figura 7 - Nocicepção e alterações inflamatórias na cavidade articular de animais com dieta rica em carboidratos refinados (HC) e com artrite induzida por antígeno (AIA)42	
Figura 8 - Alterações do tecido adiposo e da glicemia pelo tratamento com metformina .....	44
Figura 9 - Nocicepção e alterações inflamatórias na cavidade articular de animais com artrite induzida por antígeno (AIA) e tratados com metformina (MET) .....	46
Figura 10 - Alterações do tecido adiposo e da glicemia em animais moderadamente obesos e com artrite induzida por antígeno (AIA) e tratados com metformina (MET). .....	48
Figura 11 - Nocicepção e alterações inflamatórias na cavidade articular de animais moderadamente obesos, com artrite induzida por antígeno (AIA) e tratados com metformina (MET).....	50
Figura 12 - Alterações inflamatórias no joelho em animais obesos e o efeito da metformina nesse cenário .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas. ....	31
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPA: Anticorpos Anti-peptídeos Citrulinados

AGL: Ácidos Graxos Livres

AIA: Artrite Induzida por Antígeno

AINEs: Anti-Inflamatórios não Esteroidais

ALT: Alanina Aminotransferase

AMP: Adenosina Monofosfato

AMPK: Proteína Quinase Ativada por AMP

ANOVA: Análise de variância

AR: Artrite Reumatoide

AST: Aspartato Aminotransferase

BSA: Albumina Bovina Sérica

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA: Adjuvante Completo de Freund

CIA: Artrite Induzida por Colágeno

DAS28-CRP: *Disease Activity Score-28 for Rheumatoid Arthritis with CRP* - Pontuação de Atividade da Doença para Artrite Reumatoide com PCR

DCV: Doença Cardiovascular

DM2: Diabetes tipo 2

DMARDs: Drogas Anti-Reumáticas Modificadoras da Doença

DMSO: Dimetilsulfoxido

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* – Imunoensaio enzimático

FLS: Sinoviócitos Semelhantes a Fibroblastos

FR: Fator Reumatoide

GC: Glicocorticoides

GLUT-( ): Proteína Transportadora de Glicose

HC: High Carb Diet (Dieta Rica em Carboidrato)

H&E – Hematoxilina-Eosina

IFA: Adjuvante Incompleto de Freund

IG( ): Imunoglobulina ( )

IMC: Índice de Massa Corporal

IRS-( ): Substrato 1 do Receptor de Insulina

Kcal: Quilocaloria  
Kg: Quilo  
LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade  
mBSA: Albumina Bovina Sérica Metilada  
MCP-1: Quimioatraente de Monócitos 1  
MET: Metformina  
Mg: Miligrama  
mL: Mililitro  
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade  
MLS: Sinoviócitos Semelhantes a Macrófagos  
MMP: Metaloproteinase de Matriz  
MPO: Mieloperoxidase  
NFκB: *Factor Nuclear Kappa B*  
OPD: O-phenylenediamine Dihydrochloride  
PBS: Phosphate Buffered Saline  
PCR: Proteína C Reativa  
RANKL: *Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand* - Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B  
RI: Resistência à Insulina  
RPM: Rotação por Minuto  
SEM: Erro Padrão da Média  
STAT3: *Signal Transducers and Activators of Transcription*  
TA: Tecido Adiposo  
TAE: Tecido Adiposo Epididimal  
TAG: Triacilglicerol  
Th17: Linfócitos T auxiliares 17  
TNFα: Fator de Necrose Tumoral α  
IL-( ): Interleucina ( )  
Treg: Linfócitos T Reguladores  
VHS: Velocidade de Hemossedimentação  
VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
2.1 Artrite Reumatoide	19
2.2 Obesidade	21
2.3 Envolvimento do tecido adiposo e do metabolismo na patogênese da Artrite Reumatoide	23
2.4 Potenciais terapêuticos da metformina	26
2.5 Justificativa	29
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
4.1 Delineamento Experimental	32
4.2 Avaliação do comportamento nociceptivo	34
4.3 Eutanásia dos animais	35
4.4 Contagem de leucócitos totais e diferenciais da cavidade articular	35
4.5 Extração e dosagem de citocinas dos tecidos	36
4.6 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)	36
4.7 Determinação de citocinas por ELISA	36
4.8 Dosagem bioquímica	37
4.9 Histomorfometria	37
4.10 Análises estatísticas	38
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>40</b>
5.1 O consumo de dieta rica em carboidrato refinado contribui para a expansão do tecido adiposo e alterações metabólicas	40

5.2 O consumo de dieta HC piora a dor e a inflamação articular de animais com artrite induzida por antígeno	42
5.3 A metformina tem ação no tecido adiposo, agindo no remodelamento e metabolismo desse tecido	44
5.4 O tratamento com metformina reduz marcadores inflamatórios na cavidade articular	46
5.5 Animais moderadamente obesos tratados com metformina apresentam melhora glicêmica	48
5.6 Animais moderadamente obesos apresentam melhora na inflamação articular após alterações metabólicas	50
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é a doença reumática mais prevalente no mundo, podendo atingir cerca de 0,5% a 1% da população, sendo mais predominante em mulheres (LIN, Y. J.; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020). Essa doença autoimune é caracterizada por inflamação nas membranas sinoviais das articulações, com consequente hiperplasia desse tecido devido ao aumento do número de sinoviócitos e infiltração de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T (LIN, Y. J.; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020). Pacientes com AR apresentam um quadro de degradação óssea e cartilaginosa da articulação, que culminam em dor, sensibilidade e edema. O prognóstico está relacionado com enrijecimento das articulações e redução da função do membro atingido (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016), além de poder ser determinado pela composição corporal (VAN SON, J. *et al.*, 2021), o que torna a obesidade um dos influentes na resposta da doença.

A obesidade é uma doença multifatorial e sua evolução segue com a hipertrofia dos adipócitos, ocasionando angiogênese prejudicada, hipóxia e apoptose de células do tecido. A doença cursa com uma inflamação crônica de baixo grau ocasionada pelo recrutamento de células inflamatórias, aumento de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina e resistina (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017). Devido as alterações inflamatórias, deposição ectópica de lipídeos e a característica lipolítica da gordura visceral, ocorre o desenvolvimento de diversas alterações metabólicas, como a resistência à insulina (RI) e alteração do metabolismo lipídico (PETERSEN; SHULMAN, 2018). Por causa disso, essa doença está relacionada com diversas comorbidades como diabetes, dislipidemia, doenças cardiovasculares, hepáticas, ósseas e articulares (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017).

As alterações inflamatórias da AR podem influenciar na homeostase metabólica, induzindo uma RI e aumentando a incidência de doenças cardiovasculares, independente do peso (FIGUS *et al.*, 2021). Por outro lado, a AR está relacionada também com o tecido adiposo, coincidindo em pontos relativos às alterações metabólicas e inflamatórias. Citocinas comuns na patogênese da artrite, como IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-17, também estão alteradas na obesidade (MCINNES; SCHETT, 2011). Ademais, estudos com animais obesos e com artrite demonstram alterações metabólicas, degradação óssea e cartilaginosa associadas a piora dos

sintomas da artrite experimental (DE LA ROSA, IVÁN ARIAS *et al.*, 2021; OLIVEIRA, MARINA CHAVES *et al.*, 2017). Sob outra perspectiva, foi observado que pacientes com IMC, circunferência de cintura e percentual de gordura corporal elevados possuíam maior contagem de articulações inflamadas (ALVAREZ-NEMEGYEI *et al.*, 2020).

Devido ao aumento da incidência da obesidade, possibilidades terapêuticas vêm sendo estudadas para minimizar as consequências decorrentes do aumento de adiposidade. A metformina é um dos medicamentos utilizados como hipoglicemiante, que além de ser primeira linha de tratamento para o diabetes tipo 2, também vem sendo discutido como coadjuvante no tratamento da obesidade (BAILEY, 2017; LAMOIA; SHULMAN, 2021). Esse medicamento atua em diversos componentes do metabolismo, melhorando assim a resposta da insulina, o colesterol, glicose e triglicérides séricos, refletindo na inflamação (WANG, Y. W. *et al.*, 2017). Por isso, o seu uso em pacientes com artrite reumatoide tem sido investigado, sendo relacionada a uma redução da inflamação na articulação e da dor, melhora da qualidade de vida (GHARIB *et al.*, 2021), e redução da degradação da articulação em animais (FAN *et al.*, 2020). Entretanto, estudos que abordam esse assunto não investigaram como a melhora do metabolismo de forma independente poderia influenciar na gravidade da artrite.

A metformina é um regulador do metabolismo e possui um papel emergente no tratamento da artrite experimental. Ainda não está claro se alterações metabólicas intrínsecas da obesidade podem resultar na piora da artrite, pois a artrite também possui associação com o metabolismo (HE, 2020), além de não haver evidências nítidas sobre o papel do tecido adiposo na patogênese da artrite experimental. Dessa forma, o presente trabalho propõe em modelo de artrite crônica experimental uma avaliação do efeito do consumo de uma dieta rica em carboidratos refinados (HC), além de uma intervenção metabólica deste contexto por meio da administração oral de metformina em camundongos, a fim de investigar a sua influência na resposta da artrite.

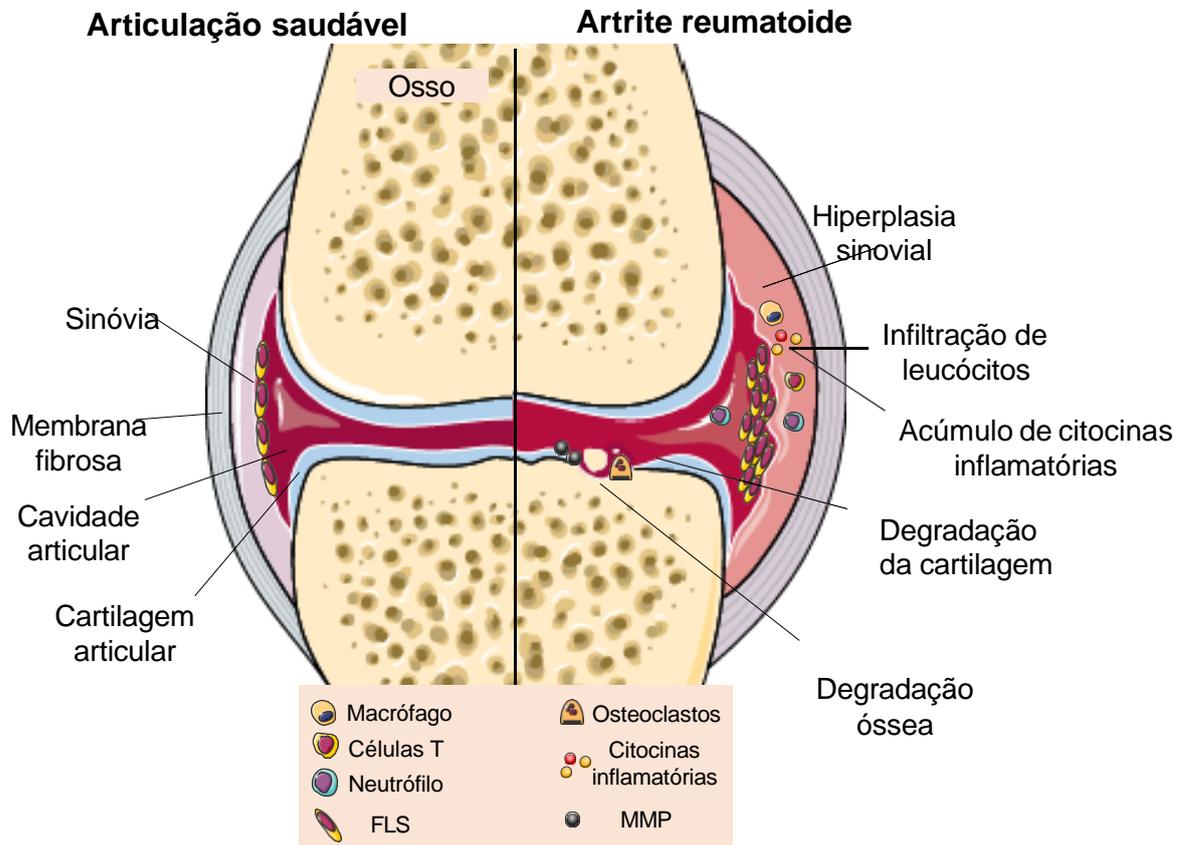
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Artrite Reumatoide

As articulações são compostas pela cartilagem hialina e a cápsula articular, que pode ser subdividida em fibrosa e membrana sinovial. A membrana sinovial possui ainda uma delgada camada em contato com a cavidade intra-articular, que é composta por dois tipos de células: os sinoviócitos semelhantes a macrófagos (MLS) e os sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS) (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; SMOLEN *et al.*, 2018). Os MLS migram para a sinóvia e se tornam células residentes, mas continuam a expressar marcadores comuns à linhagem dos macrófagos. Os FLS são células mesenquimais com algumas características de fibroblastos, como secreção de colágenos do tipo IV e V, além de secretar proteínas importantes para a lubrificação das articulações (BUSTAMANTE *et al.*, 2017). Na cavidade articular está presente também o líquido sinovial que possui a função de nutrir a cartilagem e lubrificar as articulações (BARTOK; FIRESTEIN, 2010). Quando há predisposição genética associado a estímulos ambientais, as articulações apresentam manifestações inflamatórias e crônicas presentes em doenças como a artrite reumatoide (AR) (DEANE; HOLERS, 2021; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

A AR é descrita como inflamação das membranas sinoviais das articulações que cursam com a hiperplasia desse tecido devido ao aumento do número de sinoviócitos (LIN, Y. J.; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). Associado a esse processo ocorre a infiltração de células inflamatórias na cavidade articular, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos T, o que culmina na intensa liberação de citocinas pró inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, e IL-17. Essas citocinas estimulam a ativação dos FLS, que por sua vez, produzem metaloproteinases de matriz (MMPs) que levam a degradação da cartilagem articular (HANNEMANN; APPARAILLY; COURTIES, 2021). Além disso, o FLS e os linfócitos T, podem estimular a expressão do Ativador do Receptor de NF $\kappa$ B (RANKL), uma citocina que está relacionada com a ativação de osteoclastos. Os osteoclastos são células residentes do tecido ósseo com função de degradar a matriz óssea que também são ativadas pela presença de macrófagos (SCHERER; HÄUPL; BURMESTER, 2020). Dessa forma, pacientes com AR apresentam um quadro de degradação óssea e cartilaginosa da articulação, que culminam inicialmente em dor,

sensibilidade nas articulações e edema (Figura 1). Em níveis avançados, pode gerar enrijecimento das articulações e redução da função do membro atingido, impossibilitando a execução de atividades do cotidiano (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).



**Figura 1 - Articulação saudável e articulação com artrite reumatoide.** A fisiopatologia da artrite reumatoide cursa com a hiperplasia sinovial devido ao aumento de sinoviócitos e infiltração de leucócitos na cavidade articular. Com isso, há liberação de citocinas inflamatórias na região que culminam em degradação óssea e cartilaginosa. FLS: sinoviócitos semelhantes a fibroblastos; MMP: metaloproteinase de matriz.

Diversos fatores ambientais estão envolvidos no desenvolvimento da AR, principalmente na formação de proteínas citrulinadas, molécula relacionada com a fisiopatologia da doença (DISSICK *et al.*, 2010; MAKRYGIANNAKIS *et al.*, 2008; SMOLEN *et al.*, 2018). Pacientes com soropositividade para auto-anticorpos contra peptídeos citrulinados (ACPAs) e auto-anticorpos contra IgG (fator reumatóide [FR]) apresentam risco aumentado para AR (MALMSTRÖM; CATRINA; KLARESKOG, 2017). As proteínas citrulinadas estimulam a ativação de células B que sintetizam anticorpos que reconhecem auto proteínas, o ACPA e o FR (IgG) (SMOLEN *et al.*, 2018). O FR pode estar diretamente envolvido na indução de citocinas inflamatórias

(ANQUETIL *et al.*, 2015). Assim, durante o curso da doença, citocinas e quimiocinas agravam a resposta inflamatória e sinalizam para que haja uma infiltração e acúmulo de leucócitos na cavidade sinovial, principalmente células T ativadas, neutrófilos, macrófagos e células B (SPARKS, 2019). Dentre os modelos experimentais de artrite, o uso de um antígeno para indução da doença (*antigen-induced arthritis* - AIA) é uma das formas de desencadear um processo inflamatório local (FISCHER *et al.*, 2017). Esse modelo é caracterizado por uma infiltração de neutrófilos no joelho, presença de citocinas inflamatórias na cavidade articular e degradação da cartilagem, erosão óssea e hipernocicepção, se assemelhando à patogênese em pacientes com essa doença (COELHO *et al.*, 2008; CORRÊA *et al.*, 2016; OLIVEIRA, MARINA CHAVES *et al.*, 2017; QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2011).

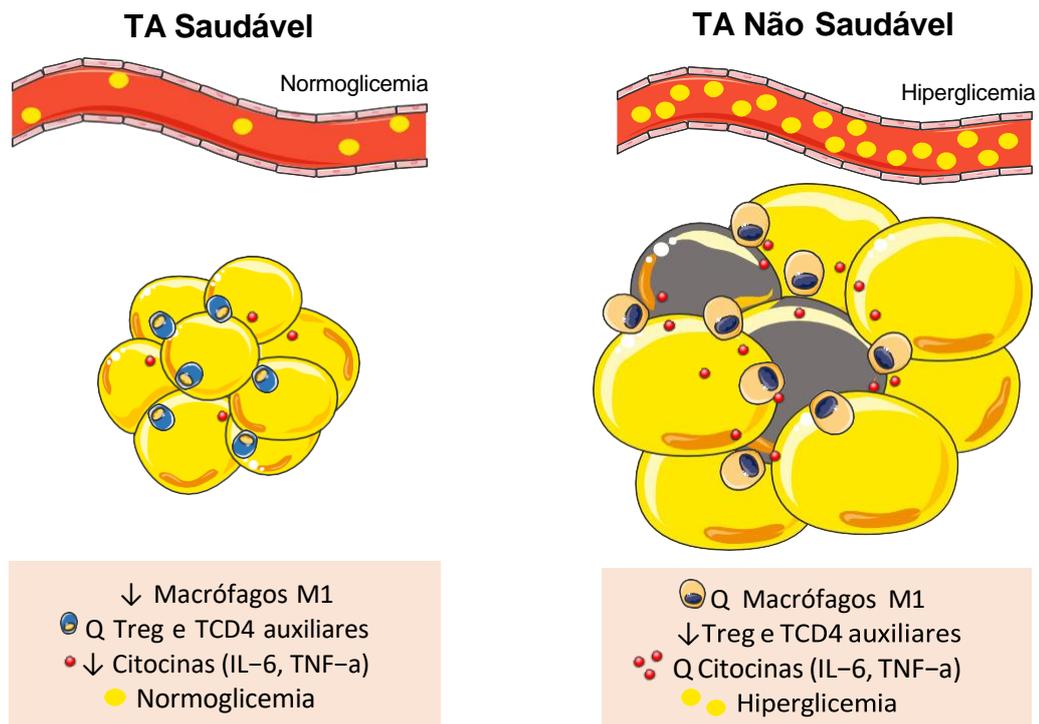
## 2.2 Obesidade

Aumento expressivo da prevalência da obesidade tem sido observado nos últimos anos, sendo que mais da metade da população mundial está acima do peso. Além disso, o aumento de doenças crônicas não transmissíveis nos últimos 10 anos ultrapassou 50% (HRUBY; HU, 2015). Esses dados podem se justificar devido ao estilo de vida adotado por maior parte da população, já que o sobrepeso e a obesidade são advindos, principalmente, do sedentarismo e de uma alimentação desbalanceada. Apesar desses dois fatores serem os mais relacionados ao desenvolvimento da doença, a obesidade ainda é considerada de etiologia multifatorial, pois pode envolver aspectos psíquicos, sociais, comportamentais, ambientais, metabólicos e genéticos (ITEM; KONRAD, 2012).

A obesidade é caracterizada pela hipertrofia dos adipócitos ocasionada, dentre outros fatores, por um consumo calórico maior que o gasto energético (HEYMSFIELD; WADDEN, 2017; LIN, X.; LI, 2021; STIGLER; LUSTIG; MA, 2017). Todavia, o tipo de nutriente consumido também é fundamental para o processo de acúmulo de gordura. Dietas ricas em carboidratos refinados (OLIVEIRA, MARINA C. *et al.*, 2013; RODRÍGUEZ-CORREA *et al.*, 2020; SPADARO *et al.*, 2015) e ricas em gordura saturadas (PEREIRA *et al.*, 2012; RAMALHO *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-CORREA *et al.*, 2020) desencadeiam em aumento da adiposidade, acompanhado por elevação da inflamação e alterações metabólicas no tecido adiposo. Durante a hipertrofia dos adipócitos, a angiogênese do tecido fica prejudicada, ocasionando em hipóxia e morte

celular do tecido (GONZÁLEZ-MUNIESA et al., 2017; LACKEY; OLEFSKY, 2015; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014). Com isso, ocorre um recrutamento de células inflamatórias para o local, como macrófagos do tipo M1, com concomitante redução de células Treg e TCD4 auxiliares. Esse perfil celular contribui com a secreção de citocinas no tecido, incluindo TNF- $\alpha$  e IL-6 (KRATZ et al., 2014; LACKEY; OLEFSKY, 2015). Assim, indivíduos com obesidade apresentam uma inflamação crônica de baixo grau (GREMESE et al., 2014), sendo que com o aumento da adiposidade abdominal ou visceral, essas alterações ocorrem de forma mais acentuada (ALVEHUS et al., 2010; DROLET et al., 2009).

A localização física do tecido adiposo define a sua função central. O tecido adiposo visceral é mais lipolítico, contribuindo com a liberação de ácidos graxos livres (AGL) na circulação (DESPRÉS, 2012; SAGHAFI-ASL *et al.*, 2017). Parte dessas moléculas vão para o tecido adiposo de outras localidades do corpo, mas outra parte vai para o fígado e para o músculo, o que pode induzir a resistência à insulina. O depósito dos AGL em outros tecidos leva a lipotoxicidade (NISHI; HIGASHIHARA; INAGI, 2019). A oxidação dos ácidos graxos em tecidos que não o adiposo interfere na fosforilação do substrato do receptor da insulina, o IRS (MALHI; GORES, 2008). As citocinas inflamatórias também desencadeiam RI devido a fosforilação do IRS em serina/tirosina em vez de treonina. Isso faz com que o GLUT4, o transportador de glicose no tecido adiposo e músculo, não seja translocado para a membrana plasmática, impedindo a sinalização da insulina (Figura 2) (PETERSEN; SHULMAN, 2018). Assim, já foi demonstrado que aumento da circunferência de cintura reflete os estoques de gordura visceral e estaria relacionado com o aumento do risco de comorbidades como doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (DM2) (DESPRÉS, 2012).



**Figura 2 - Expansão saudável e não saudável do tecido adiposo.** A hipertrofia dos adipócitos está relacionada com angiogênese prejudicada do tecido, morte celular e recrutamento de células inflamatórias para a região lesada, como macrófagos, com concomitante redução de células Treg e TCD4 auxiliares. Há aumento de citocinas inflamatórias e de AGL que levam à RI, resultando em hiperglicemia.

### 2.3 Envolvimento do tecido adiposo e do metabolismo na patogênese da Artrite Reumatoide

Estudos demonstram relação entre a AR e a obesidade. Elevado índice de massa corporal (IMC), presente na obesidade, parece contribuir para maior risco de AR em comparação com indivíduos eutróficos (MARCHAND *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2015). Ademais, o aumento da gordura corporal está associado à maior atividade da doença e à incapacidade funcional de pacientes com AR (SON, K. M. *et al.*, 2021). No geral, ocorre uma correlação positiva entre o peso, a circunferência de cintura e o percentual de gordura corporal com a contagem de articulações sensíveis e inchadas de pacientes com AR (ALVAREZ-NEMEGYEI *et al.*, 2020).

Essa associação também ocorre com as alterações inflamatórias presentes na obesidade. Camundongos com artrite experimental e obesidade induzida por dieta tiveram maior resposta inflamatória articular devido à amplificação da inflamação ocasionada pela obesidade (JHUN *et al.*, 2012). Citocinas e quimiocinas inflamatórias

são pontos que coincidem entre a AR e a obesidade. Estas estão aumentadas no tecido adiposo obeso e tem importante papel na inflamação local da artrite reumatoide, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 e IL-17 (CHEN, Z. *et al.*, 2019; SURENDAR *et al.*, 2019). O tecido adiposo parece ser um ponto comum entre as duas doenças e as alterações metabólicas presentes em ambas. De fato, no TA de camundongos com artrite experimental ocorre redução de genes envolvidos no metabolismo da glicose (IRS-1, IRS-2 e GLUT-4) e aumento de genes relacionados à lipólise, facilitando o estado de RI (ARIAS DE LA ROSA *et al.*, 2021).

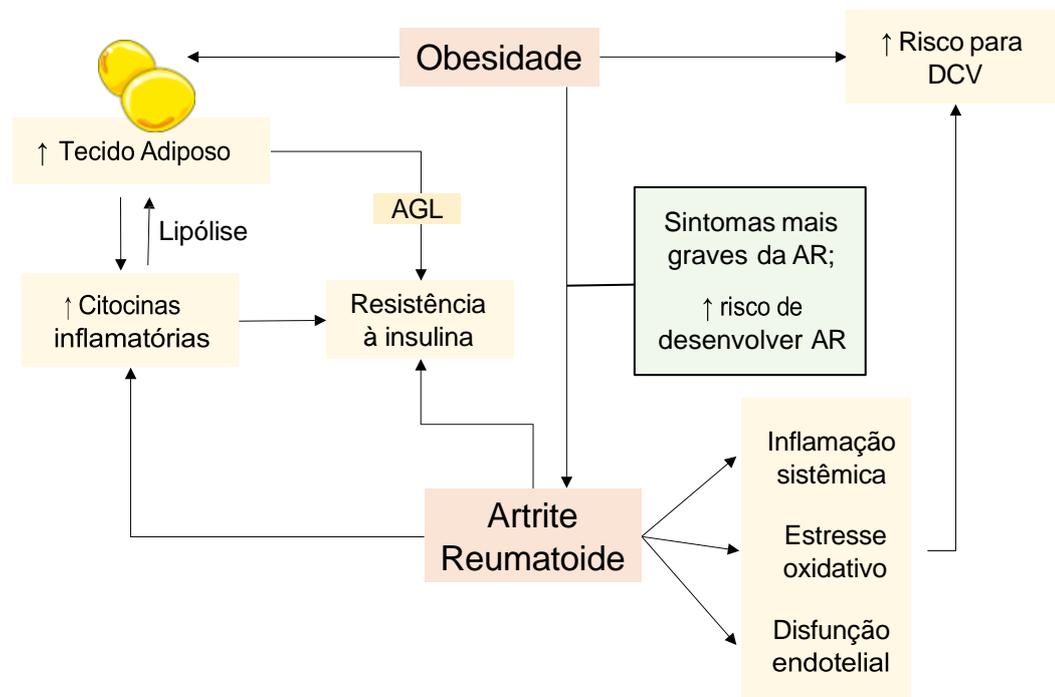
A relação inversa também parece estar presente, já que pacientes com AR apresentam risco aumentado de ter doenças relacionadas ao metabolismo, como doenças cardiovasculares. Essa condição é responsável por 39% das causas de mortalidade em indivíduos com artrite (ENGLAND *et al.*, 2018; SOKKA; ABELSON; PINCUS, 2008). As principais causas dessa associação é uma aterogênese acelerada devido a inflamação sistêmica inerente da artrite que leva ao aumento do estresse oxidativo, resistência à insulina e disfunção endotelial em pacientes com a doença reumática ativa (BAKER *et al.*, 2018; FIGUS *et al.*, 2021; HANSSON, 2005). O estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), está relacionado com o aumento do LDL oxidado, principal componente no processo de aterogênese (KATTOOR *et al.*, 2017).

A AR também está relacionada com piora do metabolismo de glicose em indivíduos não obesos (ARIAS DE LA ROSA *et al.*, 2018) e aumento da resistência à insulina em pacientes com AR não tratada precocemente (MONTAGNA *et al.*, 2007; SHAHIN *et al.*, 2010). Essa relação parece ser ocasionada por um ambiente inflamatório sistêmico desencadeado pela doença articular, já que pacientes e camundongos com artrite apresentam aumento de citocinas e marcadores inflamatórios plasmático como PCR (Proteína C Reativa), VHS (Velocidade de Hemossedimentação) e TNF- $\alpha$  (ARIAS DE LA ROSA *et al.*, 2018; PI *et al.*, 2017; RISTIĆ *et al.*, 2021).

Outra alteração que também acontece durante a AR é a secreção de adipocinas pelo tecido adiposo. Além da influência na função metabólica, a leptina, adiponectina e resistina são descritas por possuírem relação com a AR (NEUMANN

*et al.*, 2021), apesar de classicamente estarem relacionadas com o remodelamento do tecido adiposo (ZORENA *et al.*, 2020). Trabalhos com indivíduos sem obesidade avaliaram a relação de adipocinas na AR (CAO *et al.*, 2016; CARRIÓN *et al.*, 2019). Houve uma relação positiva nas concentrações séricas de leptina, que tem ação pro inflamatória, em pacientes acometidos com a artrite reumatoide com alta atividade da doença (CAO *et al.*, 2016; OTERO *et al.*, 2006). Além disso, já foi mostrado que a resistina, que está relacionada com a resistência à insulina, se encontra aumentada no soro, plasma, líquido sinovial e tecido sinovial de pacientes com AR (CARRIÓN *et al.*, 2019). Na artrite experimental, sem associação a obesidade, demonstrou-se relação entre a concentrações plasmáticas reduzidas de adiponectina e aumento de leptina (ARIAS DE LA ROSA *et al.*, 2018; OLIVEIRA, MARINA C *et al.*, 2016).

Esses dados, em conjunto, indicam que a artrite pode alterar a dinâmica do tecido adiposo e predispor a alterações metabólicas e que as alterações metabólicas comuns ao aumento da adiposidade podem interferir na dinâmica da articulação com artrite (Figura 3).



**Figura 3 - Interrelação da obesidade com a artrite.** A obesidade aumenta o risco de desenvolver AR e desencadeia sintomas mais graves dessa doença. Além disso, há aumento do TA e do risco para DCV. O TA leva a uma inflamação crônica de baixo grau, tendo citocinas

coincidentes da patogênese da AR. Essa inflamação aumenta a lipólise do tecido, aumentando também os AGL. As citocinas e os AGL levam à resistência à insulina. Por outro lado, a AR leva a uma inflamação sistêmica, ao aumento do estresse oxidativo e a disfunção endotelial, sendo fatores de risco para DCV, além de aumentar as citocinas inflamatórias e levar a resistência à insulina.

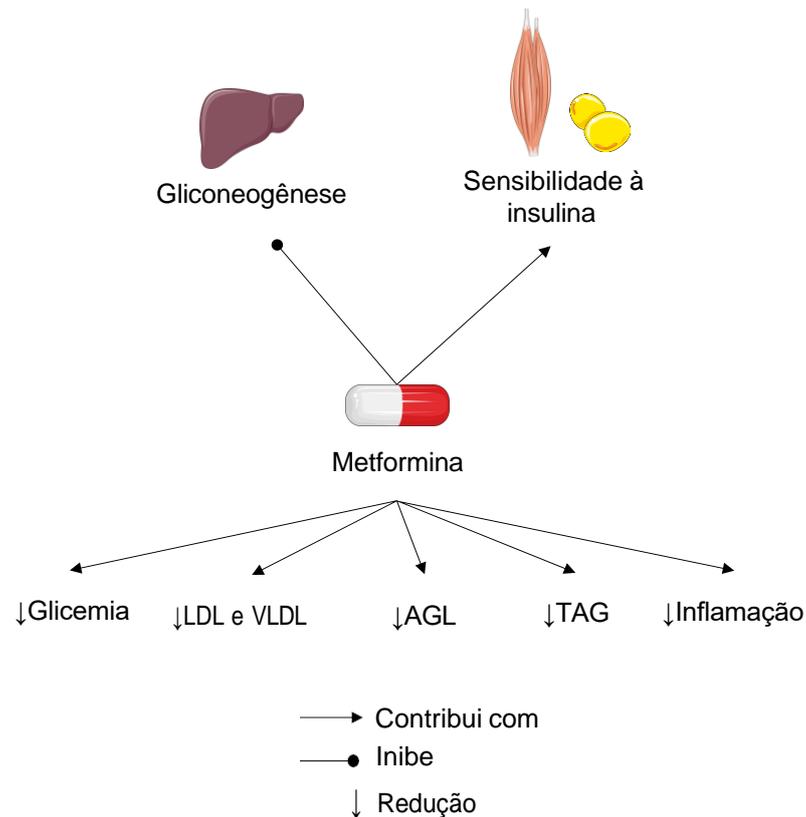
## 2.4 Potenciais terapêuticos da metformina

Diversas abordagens terapêuticas podem ser utilizadas para o tratamento da obesidade, a depender do histórico de peso, tentativas anteriores de perda de peso, grau de obesidade e presença de comorbidades. Dentre as possibilidades, pode-se destacar mudanças no estilo de vida, dietas, tratamento cirúrgico e medicamentoso (LIN, X.; LI, 2021). O cloridrato de metformina já foi retratado como um potencial terapêutico para a obesidade, mas apresenta efeitos modestos na perda de peso, apesar de múltiplos efeitos metabólicos (YEREVANIAN; SOUKAS, 2019). O metabolismo é o elo entre várias doenças, e por isso, a metformina tem mostrado eficácia terapêutica em outros distúrbios, como a AR (FAN *et al.*, 2020; GHARIB *et al.*, 2021; KIM, E. K. *et al.*, 2018). O tratamento medicamentoso da AR consiste no uso de drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs), que atuam na remissão ou retardo da artrite e previne degradação óssea e cartilaginosa, ou no uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) ou glicocorticoides (GC), que atuam reduzindo a dor e a inflamação (SMOLEN *et al.*, 2018; SMOLEN; ALETAHA; MCINNIS, 2016). Entretanto, esses medicamentos podem não trazer a resposta terapêutica esperada, ou estão associados a efeitos colaterais (FARISOĞULLARI *et al.*, 2020; SMOLEN *et al.*, 2017, 2018; STREHL *et al.*, 2016). A busca por outras estratégias são, portanto, necessárias, e o tratamento metabólico parecer ser promissor nesse cenário, o que pode ser remetido ao uso de metformina.

A metformina é um dos medicamentos mais utilizados para o tratamento do DM2 (BAILEY, 2017). Ela possui uma biodisponibilidade de 50 a 60%, e após sua absorção intestinal ocorre um acúmulo hepático do medicamento (HE, 2020; LAMOIA; SHULMAN, 2021). Além do seu importante papel no metabolismo da glicose, já foi relatado que a MET poderia ter efeito em outras condições como em doenças cardiovasculares (DCV), doenças hepáticas e na obesidade (LAMOIA; SHULMAN, 2021). O seu mecanismo de ação ainda é controverso. A hipótese mais aceita é de

que a MET ativa a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), um inibidor da gliconeogênese e da lipogênese hepática (FORETZ *et al.*, 2010). Assim, o seu principal efeito como hipoglicemiante parece estar relacionado com a redução da produção hepática de glicose pela inibição da gliconeogênese (LV; GUO, 2020). Além disso, a metformina parece ter um efeito secundário de aumentar a captação periférica de glicose (LAMOIA; SHULMAN, 2021).

Apesar do seu efeito primário como hipoglicemiante, a metformina também atua em outros aspectos do metabolismo (Figura 4). Foi relatado que em pacientes com DM2, a metformina reduziu as concentrações séricas de VLDL, LDL, ácidos graxos livres (AGL) e triglicérides (JEPPESEN *et al.*, 1994). Além disso, a MET reduziu a reabsorção de ácidos biliares no intestino, reduzindo assim o colesterol disponível na corrente sanguínea e auxiliou na redução de VLDL circulante e no aumento da oxidação lipídica (KARISE *et al.*, 2019; WANG, C. *et al.*, 2014). Na inflamação, a metformina foi capaz de reduzir a diferenciação de monócitos em macrófagos via inibição da atividade do STAT3, importante proteína em funções imunológicas (VASAMSETTI *et al.*, 2015), e reduziu a relação Th17/Treg *in vitro* (KIM, E. K. *et al.*, 2020). Além disso, o medicamento parece ter função na mucosa intestinal, alterando a composição da microbiota de forma a inibir sinalizações pró-inflamatórias inerentes da disbiose intestinal (CANI *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2014). Entretanto, o papel da metformina nesses processos segue sendo coadjuvante ao seu desempenho nas alterações metabólicas. Ademais, grande parte da funcionalidade da metformina como antiinflamatório é devido a seu efeito metabólico (TRIGGLE *et al.*, 2022). Por isso, o seu uso em doenças de cunho inflamatório e metabólico ainda é investigado.



**Figura 4 - Funções da metformina.** A função da metformina como hipoglicemiante é devido ao efeito inibitório da gliconeogênese e ao aumento da sensibilidade à insulina. A metformina também tem ação em outros componentes do metabolismo, como redução do LDL, VLDL, AGL e TAG. Esses efeitos em conjunto levam a uma redução da inflamação pela ação do medicamento. LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade; VLDL: Lipoproteína de Muito Baixa Densidade; AGL: Ácidos Graxos Livres; TAG: Triacilglicerol.

O efeito benéfico do tratamento com metformina tem sido demonstrado tanto em animais quanto em humanos. Fan e colaboradores (2020) mostraram que o tratamento com metformina em animais com artrite induzida por colágeno reduziu o edema articular, hiperplasia e infiltração inflamatória sinovial e as concentrações de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas. Além disso, houve redução da erosão óssea e da destruição da cartilagem articular (FAN *et al.*, 2020). De forma interessante, o tratamento com metformina em animais obesos com artrite experimental pôde reduzir a inflamação articular bem como reduzir alguns marcadores hepáticos como a infiltração de células inflamatórias, enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase [AST] e alanina aminotransferase [ALT]), e colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) no soro ao mesmo tempo que exerceu um efeito protetor no tecido adiposo marrom, como a redução de infiltração de células imunológicas (KIM, E.-K. *et al.*, 2018). Em pacientes com artrite reumatoide, a metformina reduziu a inflamação, avaliada pela proteína C-reativa (PCR), reduzir a pontuação no DAS-28-CRP (escala

que avalia a atividade da artrite reumatoide), e possibilitou a melhora da qualidade de vida de pacientes após 3 meses de tratamento (GHARIB *et al.*, 2021). Apesar do evidente efeito da MET na inflamação articular, ainda não está claro o papel do tecido adiposo e do metabolismo na patogênese da artrite.

## 2.5 Justificativa

Apesar da limitação de estudos relacionando a artrite e a obesidade, nosso grupo de pesquisa, nos últimos anos, tem tentado compreender a combinação entre elas. Visamos conhecer melhor os mecanismos associados à sua fisiopatologia com o intuito de no futuro contribuir para tratamentos mais específicos para pacientes com AR, ainda restritos a medicamentos. Por essa razão, avaliamos previamente qual seria a resposta metabólica frente a um desafio intra-articular no joelho de camundongos em modelo agudo de artrite induzida por antígeno (AIA) dentro de uma cinética. Observamos alterações metabólicas sistêmicas ao longo do tempo e concluímos que a presença de citocinas seria mais importante para causar essas mudanças do que células inflamatórias na articulação (OLIVEIRA, MARINA CHAVES *et al.*, 2017).

Em estudo posterior, demonstramos que após o consumo crônico de diferentes dietas que causam modulação do tecido adiposo, com aumento ou redução desse tecido, houve uma menor resposta inflamatória na articulação, novamente em modelo agudo (24h) de AIA. Essa menor resposta atribuímos às alterações metabólicas que foram o elo comum dentre todas as dietas utilizadas, que poderiam reduzir a rápida migração de leucócitos para o sítio de inflamação devido a um quadro inflamatório de baixo grau. Ademais, foi observada uma hipertrofia dos adipócitos infrapatelar somente pela resposta a AIA, sem aumento de adiposidade corporal, diferente do consumo das dietas que aumentou os dois parâmetros (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Entendemos a limitação existente em um modelo de artrite aguda pelo fato de pacientes com AR apresentarem uma cronicidade da doença. Contudo, esses dados já indicam que o metabolismo e adipócitos podem ter alguma relação e/ou participação no processo da doença. Ainda, queremos nos aproximar da realidade clínica para posteriormente fazer a translação dos dados obtidos para pacientes com AR por meio de um modelo crônico de AIA associado ao consumo de dieta indutora de obesidade. Assim, verificaremos como o tecido adiposo e o metabolismo participam da resposta imunológica articular para possibilitar novos tratamentos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se as alterações metabólicas causadas pela obesidade alteram a resposta imunológica da artrite crônica experimental.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito do aumento de adiposidade em parâmetros metabólicos sistêmicos induzido por dieta rica em carboidratos refinados na artrite crônica;
- Determinar se a dieta rica em carboidratos refinados influencia a inflamação articular na artrite;
- Verificar se o tratamento com metformina altera parâmetros metabólicos sistêmicos e adiposidade na artrite;
- Verificar se o tratamento com metformina modifica parâmetros inflamatórios articulares na artrite crônica;
- Avaliar a resposta metabólica do tratamento com metformina em animais obesos com artrite;
- Verificar se o tratamento com metformina altera a resposta inflamatória na articulação em animais com obesidade e artrite crônica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

Esse projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foi aprovado sob o protocolo 288/2017. Para padronizar o modelo de obesidade associado a artrite crônica experimental, foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c provindos do Biotério Central da UFMG com 8 semanas de vida. Esses animais foram alimentados durante todo o período experimental com (i) dieta controle Labina® (C) e (ii) dieta rica em carboidratos refinados (HC), indutora de aumento de adiposidade (OLIVEIRA, MARINA C. *et al.*, 2013). As dietas possuem 4,0 kcal/g, 4,4 kcal/g, respectivamente (Tabela 1). Após 4 semanas do esquema alimentar, os animais foram divididos novamente em 4 grupos experimentais e passaram pelo processo de indução da artrite experimental:

- (i) Controle sem artrite (alimentado com dieta controle + PBS intra-articular) (C)
- (ii) Controle com artrite (alimentado com dieta controle + mBSA intra-articular) (C AIA)
- (iii) Dieta HC sem artrite (alimentado com dieta HC + PBS intra-articular) (HC)
- (iv) Dieta HC com artrite (alimentado com dieta HC + mBSA intra-articular) (HC AIA)

**Tabela 1 - Composição nutricional das dietas.**

	<b>Dieta Controle</b>	<b>Dieta HC</b>
<b>Composição</b>	<b>g%</b>	<b>g%</b>
Carboidrato	55,6	64,8
Proteína	26,3	17,5
Lipídeos	2,6	5
<b>kcal/g</b>	<b>4,0</b>	<b>4,4</b>

Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2013

Para avaliar o efeito do metabolismo na resposta da artrite, foram avaliados mais 3 grupos com tratamento medicamentoso, onde os animais foram alimentados

durante todo o período experimental com (i) dieta controle Labina® (C) e (ii) dieta rica em carboidratos refinados (HC), indutora de aumento de adiposidade (OLIVEIRA, MARINA C. *et al.*, 2013). Após 4 semanas do esquema alimentar e após o primeiro desafio articular, foi iniciado o tratamento com um hipoglicemiante oral na água de beber, a metformina, na dosagem de 5mg/mL conforme descrito anteriormente (MA *et al.*, 2007), formando os seguintes grupos experimentais:

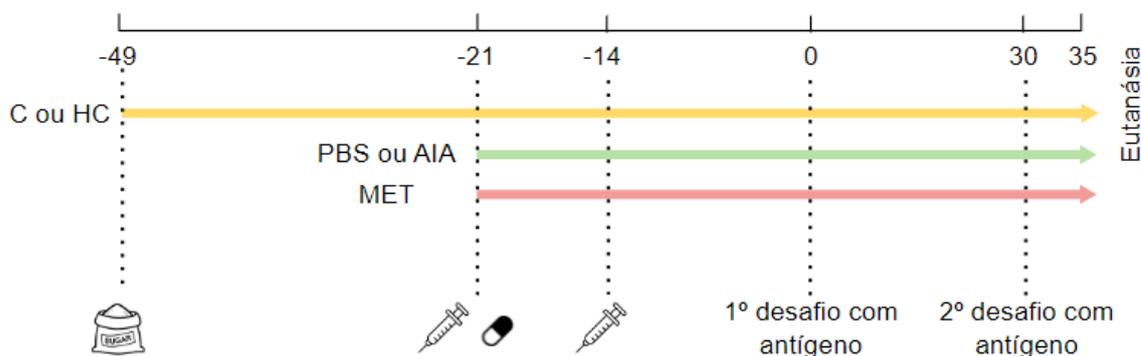
(i) Controle com artrite (alimentado com dieta controle + mBSA intra-articular) e tratados com metformina (5mg/mL) (C AIA MET)

(ii) Dieta HC sem artrite (alimentado com dieta HC + PBS intra-articular) e tratados com metformina (5mg/mL) (HC PBS MET)

(iii) Dieta HC com artrite (alimentado com dieta HC + mBSA intra-articular) e tratados com metformina (5mg/mL) (HC AIA MET)

A metformina foi triturada e dissolvida na água e ofertada *ad libitum*. A água potável foi completamente substituída a cada 2-3 dias e a sua ingestão foi mensurada para avaliar o consumo do medicamento.

Para a indução de artrite experimental, os camundongos foram imunizados com injeção subcutânea de uma solução contendo 500 µg de Albumina Bovina Sérica Metilada (mBSA) em 100 µl de uma emulsão de salina e igual volume de adjuvante completo de Freund (CFA), e suplementada com 4 mg/ml de cepa aquecida de *Mycobacterium Tuberculosis H37RA*. Após uma semana, foi realizada outra imunização com mBSA em adjuvante incompleto de Freund (IFA), utilizando as mesmas quantidades que a imunização anterior. Após mais 14 dias, ocorreu a injeção na articulação do joelho esquerdo com PBS (Phosphate Buffered Saline) para os respectivos grupos controles ou mBSA (10µg de mBSA em 10µl de salina estéril) para indução de artrite. Trinta dias depois, foi feito um novo desafio no joelho com mBSA (AIA) ou PBS (controle) para estabelecer o modelo crônico de artrite (Figura 5). Os animais foram eutanasiados após 5 dias (CORRÊA *et al.*, 2016). Os animais foram mantidos em ambiente com controle de luz, temperatura e livre acesso à água e à dieta determinada aos respectivos grupos.



**Figura 55 - Delineamento Experimental.** Os animais receberam as dietas (C ou HC) durante todo período experimental. Após 4 semanas no início da dieta, foi feita a primeira imunização com albumina bovina sérica metilada (mBSA). Após a primeira imunização, foi iniciado o tratamento com metformina (MET) na água de beber dos animais. Após uma semana foi feita a segunda imunização. No tempo 0, foi realizado o primeiro desafio com injeção intra-articular com PBS (controle) ou com mBSA (AIA) para indução de artrite experimental. Após 30 dias foi feito um novo desafio para estabelecer a cronicidade da doença. Após 5 dias foi feito a eutanásia dos animais.

Ao longo das 12 semanas os animais foram pesados 1 vez por semana para monitorar o ganho de peso e 2 vezes por semana foi medida a ingestão alimentar. No dia da eutanásia, foi realizada a contagem total do lavado da cavidade articular do joelho, além do comportamento nociceptivo.

Os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico foram removidos e pesados, assim como o joelho que também foi removido e conservado em freezer à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Foi retirada uma parte do tecido adiposo epididimal e o joelho para a confecção da lâmina histológica, sendo, portanto, fixado em formol 4% tamponado e conservado posteriormente em álcool 70% até o momento do uso. O sangue foi coletado em tubos e então centrifugado para a obtenção do soro e armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$  para as dosagens de glicose. Além disso, amostras de joelho foram retiradas para medir a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e de citocinas (ELISA).

#### 4.2 Avaliação do comportamento nociceptivo

No dia da eutanásia foi avaliado o comportamento nociceptivo. Em uma sala tranquila, os animais foram colocados em gaiolas de acrílico ( $12 \times 10 \times 17$  cm altura) com uma grade de arame no piso 15-30 minutos antes do teste para a adaptação

ambiental. Uma série de estímulos foram realizados apenas quando os animais estavam quietos. Para esses estímulos, um medidor eletrônico de pressão foi usado. Ele é composto de um transdutor de força de mão equipado com uma ponta de polipropileno (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). Uma força perpendicular crescente foi aplicada à área central da superfície plantar da pata posterior direita para induzir a flexão da articulação do joelho, seguido por retirar a pata. Um espelho inclinado abaixo da grade fornece uma visão clara da pata traseira do animal. O ponto final foi caracterizado pela remoção da pata. Após a flexão provocada até o limiar de retirada, a intensidade da pressão é registrada automaticamente. O valor para a resposta foi obtido pela média de três medições. Os resultados são expressos como limiar de retirada (g).

#### **4.3 Eutanásia dos animais**

Após o período experimental, os animais foram submetidos à eutanásia por sangria. Antes da eutanásia os animais passaram por um período de jejum de 6 horas. No momento da eutanásia os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal na dose de 12,5ml/kg de solução de cloridratos de xilasina (10mg/kg) e cloridrato de quetamina (80mg/kg) diluídos em NaCl 0,9%.

#### **4.4 Contagem de leucócitos totais e diferenciais da cavidade articular**

Para recuperação dos leucócitos da cavidade do joelho, foi feita duas vezes a lavagem com 5µl de albumina bovina sérica (BSA) 3% em PBS. Esse lavado, que foi coletado junto com a solução de albumina utilizado, foi diluído em 90µl de BSA 3% para posterior contagem total e diferencial.

O número total de leucócitos no líquido sinovial foi determinado pela contagem na câmara de Neubauer. Para isso, 10µl do lavado articular foi diluído em 10µl de solução de Turk (Renylab) e foi feita a contagem utilizando zoom óptico de 40x.

A contagem diferencial de leucócitos da cavidade articular foi feita utilizando citocentrifugação de uma alíquota de 90µl do lavado articular (citospin;Shandon III, Thermo Shandon, Frankfurt, Alemanha). As lâminas foram coradas utilizando o Kit panótico rápido (Laborclin, Paraná) e a contagem das células polimorfonucleares e mononucleares foi feita utilizando óleo de imersão e um zoom óptico de 100x.

#### **4.5 Extração e dosagem de citocinas dos tecidos**

Fragmentos do joelho foram homogeneizados na presença de 1 mL de solução inibidora de proteases (NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina), preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8g, KCl 0,2g e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 2,89g diluídos em 1 litro de água destilada). O homogeneizado resultante foi centrifugado por 10 min a 10000 RPM a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para a dosagem de citocinas por ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) e de enzimas por MPO (Mieloperoxidase).

#### **4.6 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)**

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada principalmente em leucócitos polimorfonucleares. A dosagem de MPO correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação. A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi avaliada por meio de testes enzimáticos utilizando como substrato tetrametilbenzidina (TMB) conforme descrito anteriormente (SOUZA *et al.*, 2002).

Primeiramente foi realizado o processamento das amostras do joelho dos animais. O tecido foi homogeneizado em solução inibidora de proteases e foi centrifugado. O pellet resultante foi submetido a lise hipotônica utilizando NaCl em diferentes concentrações e glicose 5%. Após mais uma centrifugação, o pellet foi resuspenso em tampão NaPO<sub>4</sub> e homogeneizado. Alíquotas da suspensão foram transferidas para outro microtubo e passaram por um processo de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. As alíquotas foram centrifugadas e o sobrenadante coletado. As amostras foram diluídas, colocadas em placas de 96 poços com substrato TMB, dimetilsulfoxido (DMSO) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O produto da reação foi detectado por colorimetria a 450 nm.

#### **4.7 Determinação de citocinas por ELISA**

As citocinas IL-1 $\beta$  e IL-17 foram avaliadas no tecido periarticular. Para a sua quantificação foi utilizado o kit DuoSet de ELISA (Enzyme Linked Immune Sorbent Assay). O ensaio foi realizado em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc,

Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). No dia anterior ao experimento, as placas foram preparadas com 27,75  $\mu$ L do anticorpo de captura específico de cada citocina diluído em 5mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) e armazenadas durante a noite a 4°C em local úmido e protegido da luz. Após esse período, os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem (PBS diluído em Tween 20) e foi pipetada a solução de bloqueio (BSA 1% [Bovine Serum Albumin] diluída em PBS) em cada poço. Após lavar a placa três vezes, as amostras foram diluídas em BSA 0.1% e 50 $\mu$ L da solução foi pipetada na placa, junto ao branco (BSA 0,1%) e ao padrão. A placa foi então incubada durante a noite a 4°C em ambiente úmido e protegido da luz. Após esse tempo, a placa foi lavada três vezes com o tampão de lavagem e foi adicionado aos poços 27,75  $\mu$ L de anticorpo de detecção específico para as amostras diluído em 5mL de BSA 0,1%. Foi feita a lavagem da placa e foi adicionada uma solução de estreptavidina que foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos. Transcorrido esse tempo, uma nova lavagem foi realizada e foi adicionada à placa o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e o produto da reação foi detectado por colorimetria a 490 nm.

#### **4.8 Dosagem bioquímica**

O sangue coletado foi centrifugado para obtenção do soro que foi armazenado em freezer a -20°C. Foi então quantificada as concentrações séricas de glicose por meio de Kit Enzimático (Bioclin, Belo Horizonte, MG). A amostra foi diluída nos reagentes segundo o fabricante e colocada em banho maria à 37°C por 10 minutos. A reação foi detectada por colorimetria a 505 nm.

#### **4.9 Histomorfometria**

Para o processamento histológico, o tecido adiposo epididimal e o joelho foram coletados no dia da eutanásia. Foi realizada a fixação do tecido adiposo e joelho em formol 4% tamponado onde permaneceram por no máximo 48 horas. O tecido adiposo foi transferido para álcool 70% e o joelho foi descalcificado por meio de incubação em uma solução contendo EDTA 14% (ácido etilenodiamino tetra-acético - pH 7,2) por 28 dias e transferido para álcool 70% até o dia do seu processamento. Os tecidos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. A técnica H&E (Hematoxilina-

Eosina) foi utilizada para coloração dos cortes histológicos e as lâminas foram avaliadas em microscópio de luz equipada com câmera digital.

O escore histopatológico foi realizado a fim de verificar a inflamação e alterações morfológicas no joelho dos camundongos com e sem indução de artrite experimental, conforme descrito anteriormente (OLIVEIRA, MARINA CHAVES *et al.*, 2017). Foi atribuída uma pontuação de 0-9 em que “0” representa articulação normal, e “9” representa articulação alterada. Foram avaliados a hiperplasia sinovial (0-3 pontos), intensidade e extensão do infiltrado inflamatório (0-4 pontos) e erosão óssea (0-2 pontos). A avaliação do infiltrado inflamatório foi realizada por meio do software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA).

Além disso, a quantificação da área de adipócitos foi feita nas lâminas de tecido adiposo e joelho. Para o tecido articular, foram feitas três fotografias em zoom óptico de 20x. As células que tocavam a borda da fotografia e aquelas que não possuíam formato ovóide não foram contabilizadas. Foi utilizado o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) para a contagem manual das células do joelho.

Para a área de adipócitos do tecido adiposo epididimal, foram utilizados os softwares ImageJ e Adipo Count (versão 1.0) conforme descrito anteriormente (HU *et al.*, 2021). Em resumo, as imagens foram capturadas com uma objetiva de 20x e foram importadas para o Adipo Count, onde as imagens sofreram um pré-tratamento. Os adipócitos foram segmentados e re-segmentados para maior precisão, possibilitando a visualização em duas cores do tecido, em que o adipócito ficou totalmente branco e o restante do tecido ficou totalmente preto. Caso necessário, foi feita a correção manual dos limites dos adipócitos. As imagens segmentadas monocromáticas foram transferidas para o software ImageJ, e foi realizada a área dos adipócitos (por meio da área de partículas). As células que tocavam a borda da fotografia e aquelas que não possuíam um formato ovóide não foram contabilizadas.

#### **4.10 Análises estatísticas**

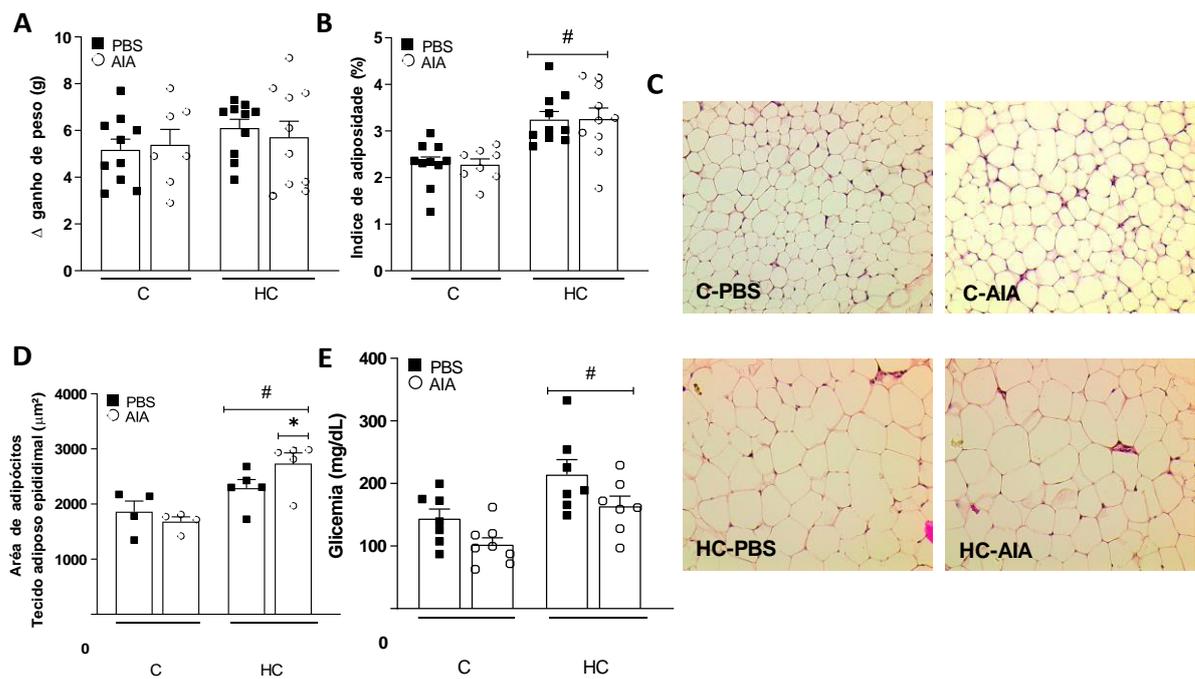
Após a verificação de normalidade, foram feitas as comparações estatísticas entre os vários grupos utilizando ANOVA “one way” seguida de pós-teste Newman–

Keuls. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão médio. O nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ . Para a realização de todas as análises, o software GraphPad PRISM 8.0, GraphPad software Inc. (San Diego, CA, USA) foi utilizado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 A artrite altera a área de adipócitos mas não desencadeia alterações metabólicas mais expressivas, mesmo após o consumo de dieta HC

Não houve alteração do peso entre as diferentes dietas e nos animais sem ou com artrite (Figura 6A). Apesar de não haver diferença no consumo alimentar entre os grupos (dados não mostrados), os animais que receberam a dieta HC, independente da artrite, tiveram aumento no índice de adiposidade, o qual considera os tecidos adiposos viscerais (Figura 6B). Esse aumento foi acompanhado pela expansão da área de adipócitos do tecido adiposo epididimal (Figura 6C-D) nos mesmos grupos. Curiosamente, os animais alimentados com dieta HC AIA tiveram o aumento da área de adipócitos mais expressivo do que aqueles sem artrite. Além disso, a concentração sérica de glicose em jejum aumentou no grupo que recebeu a dieta HC em relação a dieta controle independente da artrite (Figura 6E).



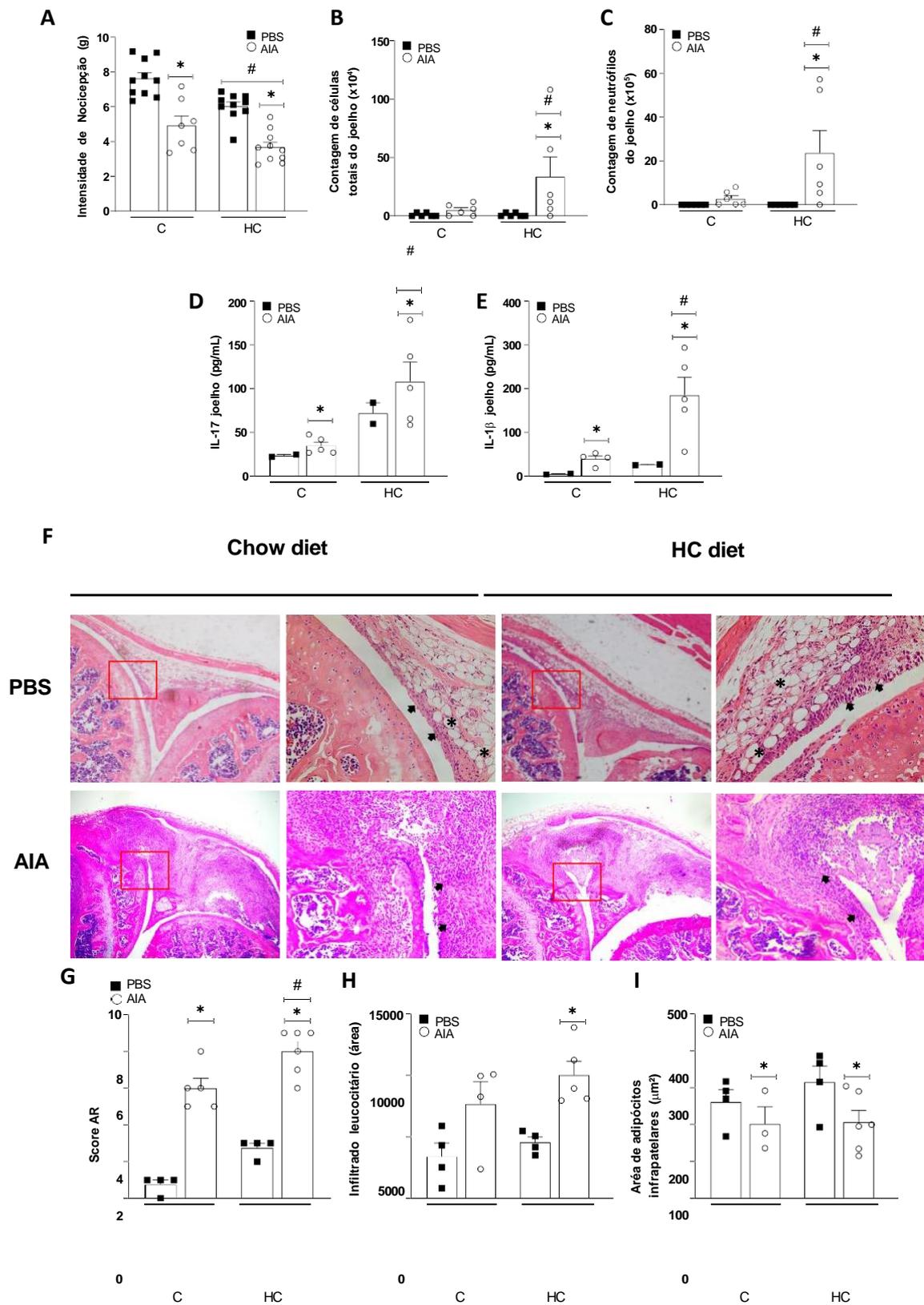
**Figura 66 - Alterações de adiposidade e sistêmica decorrentes do consumo de dieta rica em carboidratos refinados (HC) e da artrite induzida por antígeno (AIA).** (A) Diferença entre os pesos do início e do final do protocolo experimental, (B) Índice de adiposidade [(soma do peso do tecido epididimal, retroperitoneal e mesentérico (g))  $\div$  peso corporal  $\times$  100], (C) Imagem representativa da área de adipócitos do tecido adiposo epididimal, (D) Área de adipócitos do tecido adiposo epididimal e (E) Glicemia em jejum. Os dados representam as médias  $\pm$  SEM (erro padrão da média) de 6-10 animais por grupo. \*P < 0.05 versus respectivo PBS; #P < 0.05 versus dieta controle (C).

## **5.2 O consumo de dieta HC piora a dor e a inflamação articular de animais com artrite induzida por antígeno**

Para avaliar o efeito da dieta no limiar de dor dos animais com artrite, avaliamos a intensidade de nocicepção. O grupo AIA apresentou maior intensidade de nocicepção do que o seu respectivo PBS independente da dieta (Figura 7A). De forma interessante, os animais alimentados com dieta HC, apresentaram intensidade de nocicepção maior do que aqueles alimentados com dieta controle (Figura 7A). Essa piora foi acompanhada do aumento da contagem de leucócitos totais (Figura 7B) e neutrófilos (Figura 7C) no joelho de animais HC AIA em relação ao grupo controle.

Verificamos também a presença de citocinas inflamatórias no joelho. A IL-17 tem o papel de recrutar neutrófilos para a região lesada (LUBBERTS; KOENDERS; VAN DEN BERG, 2005), e a IL-1 $\beta$  que está envolvida na modulação da inflamação na artrite experimental (DAYER; BRESNIHAN, 2002). Houve o aumento de ambas as citocinas nos animais AIA em relação ao seu respectivo PBS, mas o grupo que recebeu a dieta HC teve o aumento dessas citocinas de forma mais significativa em relação ao grupo que recebeu a dieta controle (Figura 7D-E).

A histomorfometria do joelho foi avaliada em lâminas coradas com H&E. A Figura 7G mostra imagens representativas da cavidade articular, e pode-se observar a hiperplasia sinovial, erosão óssea e o aumento do infiltrado inflamatório nos animais com AIA. Essas alterações foram maiores no grupo que recebeu a dieta HC (Figura 7G-H). A avaliação da área do infiltrado leucocitário mostrou aumento apenas no grupo HC AIA em comparação com o seu respectivo PBS (Figura 7I). Por fim, é possível verificar que houve redução da área de adipócitos infrapatelar nos grupos AIA em relação ao respectivo PBS, mas que essa redução foi independente da dieta (Figura 7J-G).



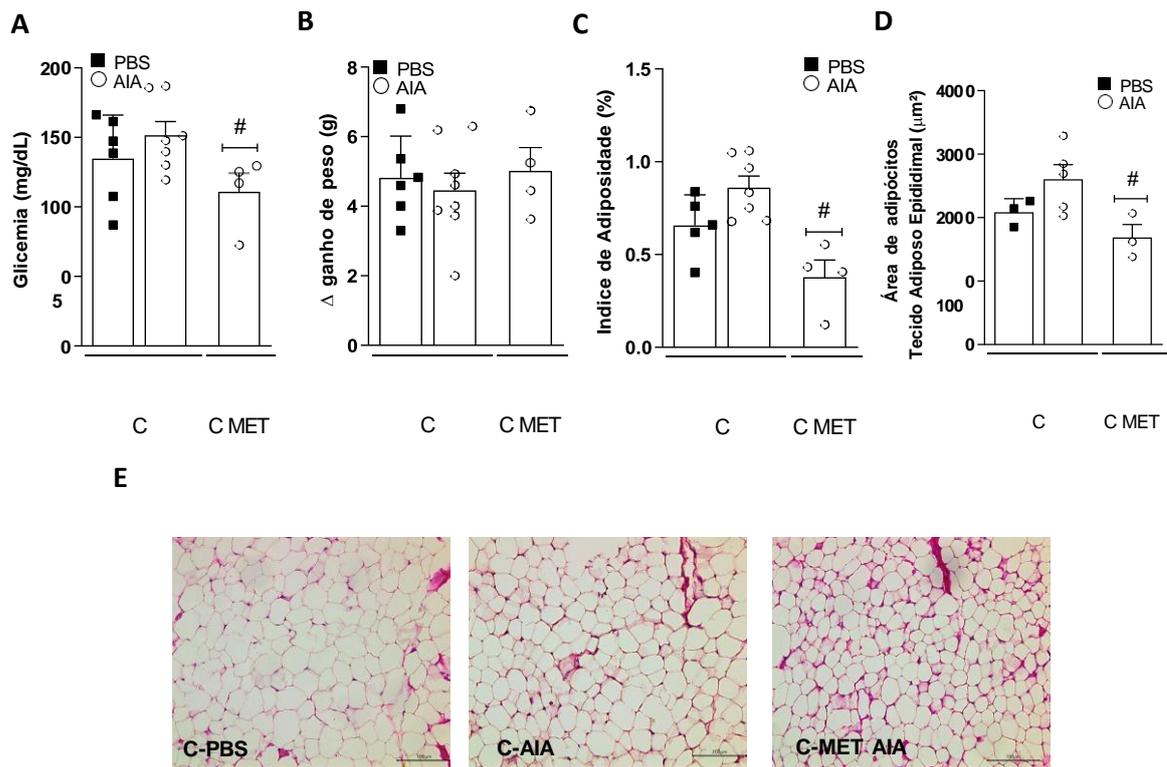
**Figura 7 - Alterações na cavidade articular de animais alimentados com dieta rica em carboidratos refinados (HC) e com artrite induzida por antígeno (AIA).** (A) Intensidade de nocicepção, Contagem de leucócitos (B) totais e (C) neutrófilos da cavidade articular; Dosagem das citocinas (D) IL-17 e (E) IL-1 $\beta$  no joelho, (G) Imagem representativa da articulação dos grupos AIA e PBS, com adipócitos infrapatelares (\*) e o infiltrado inflamatório (ponta da seta), (H) Score histopatológico de artrite que considera infiltrado inflamatório,

erosão óssea e hiperplasia sinovial; (I) Quantificação de infiltrado inflamatório, (J) Área de adipócitos infrapatelares. Os dados representam as médias  $\pm$  SEM (erro padrão da média) de 6-10 animais por grupo. \*P < 0.05 versus respectivo PBS; #P < 0.05 versus dieta controle (C).

### **5.3 A metformina tem ação no remodelamento e metabolismo do tecido adiposo de animais magros**

O aumento da adiposidade é acompanhado por alterações na morfologia do tecido adiposo, como a hipertrofia dos adipócitos, e está relacionada com uma piora da inflamação articular em animais com artrite experimental. Acreditamos que a melhora do metabolismo pode reduzir a inflamação articular. Para comprovar nossa hipótese, tratamos os animais com um hipoglicemiante oral.

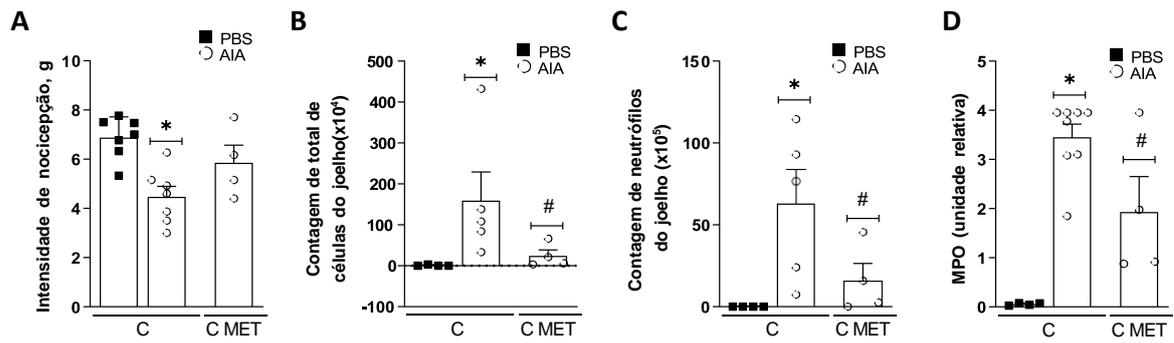
Não foi observado diferença no consumo hídrico entre todos os grupos tratados com metformina (C MET:  $3,2 \pm 0.13$  vs. HC MET PBS:  $3,14 \pm 0.12$  vs. HC MET AIA:  $3,14 \pm 0.12$  ml/dia/animal;  $P > 0.05$ ). Conforme esperado, o tratamento com a metformina reduziu a glicose sérica em jejum no grupo AIA se comparado com o grupo não tratado (Figura 8A). Além disso, não houve alteração do ganho de peso entre os grupos (Figura 8B). De forma interessante, o grupo AIA não apresentou aumento do índice de adiposidade (Figura 8C) e da área de adipócitos do tecido adiposo epididimal (Figura 8D-E) em comparação com o seu respectivo PBS, mas o tratamento com metformina reduziu esses marcadores do grupo AIA em relação ao não tratado.



**Figura 8 - Alterações do tecido adiposo e da glicemia pelo tratamento com metformina.** (A) Glicemia em jejum, (B) Diferença entre os pesos do início e do final do protocolo experimental, (C) Índice de adiposidade [(soma do peso do tecido epididimal, retroperitoneal e mesentérico (g)) ÷ peso corporal x 100], (D) Área de adipócitos do tecido adiposo epididimal e (E) Imagem representativa do tecido adiposo epididimal. Os dados representam as médias  $\pm$  SEM (erro padrão da média) de 4-8 animais por grupo. \*P < 0.05 versus respectivo PBS; #P < 0.05 versus grupo dieta controle (C) AIA.

#### **5.4 O tratamento com metformina reduz marcadores inflamatórios na cavidade articular de animais magros**

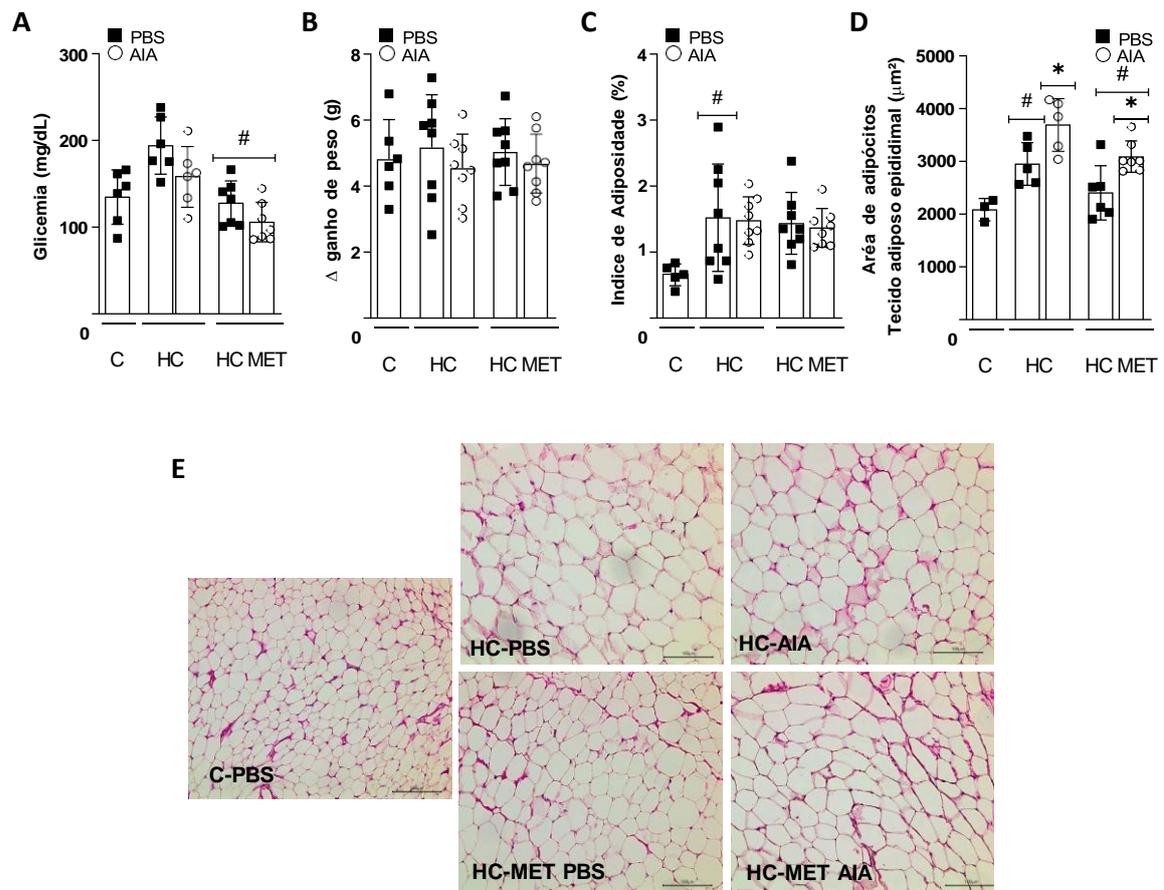
Para avaliar se as alterações no metabolismo têm impacto na inflamação articular, foi feita avaliação de marcadores inflamatórios nesse tecido. Não houve alteração na intensidade de nocicepção nos animais tratados, (Figura 9A). Contudo, foi observada uma redução dos leucócitos totais no joelho (Figura 9B) e neutrófilos (Figura 9C) em comparação com o grupo AIA não tratado. Foi feita também a avaliação da enzima mieloperoxidase (MPO), um marcador da atividade de neutrófilos, e de fato, essa enzima estava reduzida no tecido articular do grupo AIA tratado com metformina em comparação com o grupo não tratado (Figura 9D).



**Figura 9 - Nociceção e alterações inflamatórias na cavidade articular de animais com artrite induzida por antígeno (AIA) e tratados com metformina (MET).** (A) Intensidade de nociceção, (B) Contagem de leucócitos totais da cavidade articular, (C) Contagem de neutrófilos da cavidade articular, (D) Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase no joelho. Os dados representam as médias  $\pm$  SEM (erro padrão da média) de 4-8 animais por grupo. \*P < 0.05 versus respectivo PBS; #P < 0.05 versus grupo dieta controle (C).

### **5.5 Animais obesos tratados com metformina apresentam melhora glicêmica**

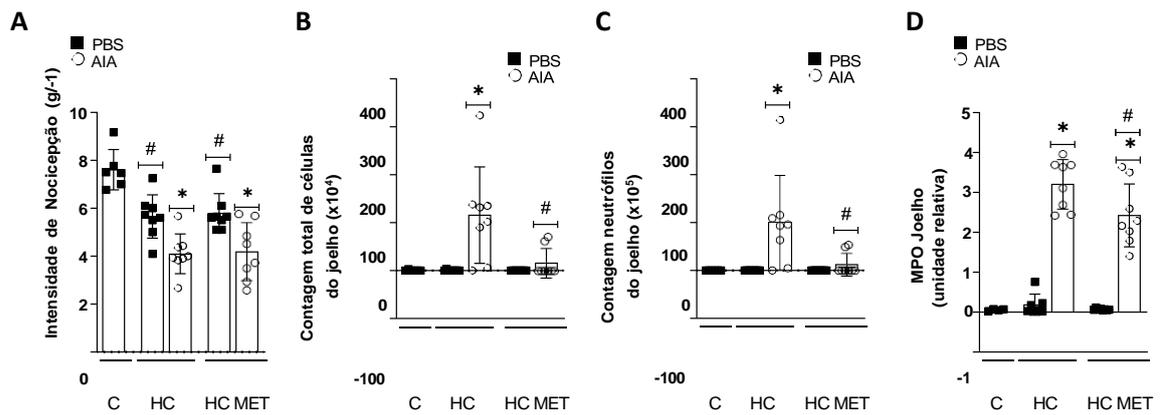
Para investigar o efeito da metformina na resposta metabólica após o consumo de dieta rica em carboidratos e com AIA, foi feita a avaliação sérica e do tecido adiposo dos camundongos. A avaliação da glicose sérica mostrou que o grupo MET teve uma redução na sua concentração em relação ao grupo HC não tratado (Figura 10A). Não houve diferença no ganho de peso entre os grupos experimentais (Figura 10B). Entretanto, o grupo HC teve um aumento de índice de adiposidade em relação ao grupo controle e o tratamento com metformina não alterou esse parâmetro (Figura 10C). Ao avaliar a área de adipócitos do tecido adiposo epididimal, observou-se que a artrite aumentou a área dessa célula nos grupos HC não tratado, e que o tratamento com metformina reduziu esse marcador independente da artrite (Figura 10D-E).



**Figura 10 - Alterações do tecido adiposo e da glicemia em animais obesos e com artrite induzida por antígeno (AIA) e tratados com metformina (MET).** A) Glicemia em jejum, (B) Diferença entre os pesos do início e do final do protocolo experimental, (C) Índice de adiposidade [(soma do peso do tecido epididimal, retroperitoneal e mesentérico (g)) ÷ peso corporal x 100], (D) Área de adipócitos do tecido adiposo epididimal e (E) Imagem representativa do tecido adiposo epididimal. Os dados representam as médias  $\pm$  SEM (erro padrão da média) de 6-10 animais por grupo. \* $P < 0.05$  versus respectivo PBS; # $P < 0.05$  HC MET versus HC ou HC versus C.

## **5.6 Animais obesos apresentam melhora na inflamação articular após alterações metabólicas**

Como esperado, o grupo HC PBS não tratado apresentou alteração na nocicepção se comparado com o grupo controle PBS, e isso foi intensificado no grupo HC AIA independente do tratamento com metformina (Figura 11A). Além disso, o grupo HC AIA teve maior contagem de células totais, neutrófilos e aumento da enzima mieloperoxidase no joelho em relação ao seu respectivo PBS (Figura B-D). Apesar do tratamento não alterar a intensidade de nocicepção do grupo HC com AIA (Figura 11A), o tratamento com MET possibilitou uma redução na contagem de leucócitos totais na cavidade articular em relação ao grupo HC AIA não tratado (Figura 11B), bem como a redução da contagem de neutrófilos (Figura 11C). Por fim, ao avaliar a atividade de neutrófilos por meio da enzima mieloperoxidase, mostra-se que de fato, houve redução desse marcador no grupo HC AIA tratado em relação ao grupo HC AIA não tratado (Figura 11D).



**Figura 11 11- Nociceção e alterações inflamatórias na cavidade articular de animais obesos, com artrite induzida por antígeno (AIA) e tratados com metformina (MET).** (A) Intensidade de nociceção, (B) Contagem de leucócitos totais da cavidade articular, (C) Contagem de neutrófilos da cavidade articular, (D) Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no joelho. Os dados representam as médias  $\pm$  SEM (erro padrão da média) de 6-10 animais por grupo. \*P < 0.05 versus respectivo PBS; #P < 0.05 HC MET versus HC ou HC versus C.

## 6 DISCUSSÃO

A artrite reumatoide é uma doença reumática que compromete a qualidade de vida devido a dores, enrijecimento e edema nas articulações (LIN, Y. J.; ANZAGHE; SCHÜLKE, 2020; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). Além disso, pacientes com AR apresentam distúrbios extra articulares como aumento da incidência de doenças cardiovasculares e alterações metabólicas. Esses efeitos em outras localizações são atribuídos a inflamação sistêmica comum durante a doença articular (BAKER et al., 2018; DE LA ROSA, I ARIAS et al., 2018; FERRAZ-AMARO et al., 2013; FIGUS et al., 2021; HANSSON, 2005; SOKKA; ABELSON; PINCUS, 2008). Além disso, pessoas com obesidade e alterações metabólicas apresentam um risco aumentado de desenvolver AR, além de uma piora dos sintomas em quem apresenta a doença reumática ativa (ALVAREZ-NEMEGYEI *et al.*, 2020; MARCHAND *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2015; SON, K. M. *et al.*, 2021). Assim, o melhor entendimento do impacto do metabolismo na patogênese da AR se faz necessária, já que estratégias focadas nessa questão poderiam melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Neste estudo mostramos que as alterações metabólicas na obesidade também podem impactar nos marcadores inflamatórios da artrite, e que estratégias que visem a melhora do metabolismo podem ser promissoras no auxílio do tratamento desses pacientes. No geral, os resultados demonstraram que a artrite em animais obesos (i) intensificou o aumento da área de adipócitos sem implicar em alterações metabólicas e isso se relacionou com a piora da resposta inflamatória articular; (ii) o tratamento do metabolismo com a metformina em camundongos magros com artrite reduziu a adiposidade e a resposta glicêmica, acompanhada da redução da inflamação articular; contudo, (iii) animais obesos com artrite tratados com metformina apresentaram menor glicemia e área de adipócitos associados a melhora importante dos marcadores inflamatórios da artrite analisados.

Os nutrientes apresentam efeitos distintos no metabolismo e no remodelamento do tecido adiposo. A dieta rica em carboidratos refinados tem a característica de aumentar a adiposidade, a área de adipócitos e tem impacto no metabolismo de lipídeos e de carboidratos, mas não tem impacto no peso dos animais (OLIVEIRA, MARINA C. et al., 2013; RODRÍGUEZ-CORREA et al., 2020; SPADARO et al., 2015). De fato, foi visto no nosso estudo que a dieta HC aumentou a glicemia

dos animais associado ao aumento da adiposidade e área de adipócitos sem alteração no peso corporal. A relação da dieta HC com a alteração glicêmica, mesmo na dieta isocalórica, parece ser devido a sua composição predominante de sacarose (glicose e frutose). Esse nutriente ativa o sistema imune por diversos mecanismos. A sacarose tem efeito na síntese de gordura, já que é substrato da lipogênese de novo hepática (SANDERS; GRIFFIN, 2016). Neste contexto, ocorre maior deposição de gordura na região abdominal, que é mais inflamatória, e aumenta a lipólise no tecido adiposo com consequente liberação dos AGL, induzindo a resistência à insulina (DINICOLANTONIO *et al.*, 2018). Além disso, a hipertrofia dos adipócitos, inerente ao processo de obesidade, também contribui para a hiperglicemia por meio da produção de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas fazem com que haja a fosforilação incorreta do receptor de insulina, gerando a resistência à insulina (PETERSEN; SHULMAN, 2018). Assim, mostramos que o consumo de dieta HC contribuiu para o desenvolvimento da obesidade nos animais, com incremento de adiposidade e alterações metabólicas associadas.

Curiosamente, os animais com artrite alimentados com dieta HC não apresentaram um incremento maior da massa adiposa em relação ao seu respectivo PBS, mas mostrou uma hipertrofia maior em seus adipócitos. De fato, há uma correlação positiva entre o aumento de adiposidade e a gravidade da artrite reumatoide de início precoce (ALIVERNINI *et al.*, 2019). Essa alteração na composição corporal no início da artrite está relacionada com redução da massa muscular. Foi relatado que o aumento crônico de citocinas inflamatórias, em conjunto com a inatividade física, pode levar a caquexia reumatoide, caracterizada pela perda de massa muscular e com a massa gorda estável ou aumentada (WALSMITH; ROUBENOFF, 2002). Além disso, o tecido adiposo de animais com artrite tem maior expressão de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (ARIAS DE LA ROSA *et al.*, 2021). Contrapondo os nossos achados, Hamaguchi em 2012 descreveu a redução da área de adipócitos após indução de artrite por colágeno, tanto em animais magros quanto em animais obesos (HAMAGUCHI *et al.*, 2012). Entretanto, a literatura carece de estudos experimentais que avaliem o remodelamento do tecido adiposo e a influência da artrite nesse contexto. O nosso estudo é o primeiro a descrever os efeitos da obesidade na artrite experimental crônica. Acreditamos que a duração da

inflamação articular pode ter impactado de forma negativa na movimentação dos animais e, por isso, apresentaram aumento mais expressivo dos adipócitos.

Diferente dos adipócitos do tecido adiposo visceral, os adipócitos infrapatelares são descritos por absorver o impacto mecânico, facilitar a distribuição do líquido sinovial, e secretar adipocinas na cavidade articular (MACCHI *et al.*, 2018). Nesse estudo, a avaliação histomorfométrica da articulação apresentou uma redução na área de adipócitos infrapatelar nos animais com artrite em relação àqueles sem artrite, independente da dieta ofertada. A inflamação articular parece reduzir a área de adipócitos infrapatelar. De forma contrária, Oliveira e colaboradores (2017) mostraram que animais submetidos a um modelo agudo de artrite induzida por antígeno tiveram aumento na área de adipócitos infrapatelar com o consumo de dietas indutoras de adiposidade. Foi sugerido que a inflamação aguda altera a produção de adipocinas no joelho e assim, influencia o tamanho dos adipócitos (OLIVEIRA, MARINA CHAVES *et al.*, 2017). Entretanto, foi também mostrado que na osteoartrite o tamanho do tecido adiposo infrapatelar teria um papel na proteção mecânica da doença, relacionada a menor dor e alterações estruturais da articulação (HAN *et al.*, 2014). Ademais, foi observada uma relação inversa entre o volume do tecido adiposo infrapatelar e as concentração séricas de IL-17 (WANG, K. *et al.*, 2016). Assim, acreditamos que o influxo de neutrófilos para a cavidade articular associado ao aumento de citocinas inflamatórias levou à lipólise do tecido adiposo infrapatelar, reduzindo assim a sua área (FOLEY *et al.*, 2021). Além disso, a redução desse tecido pode ter contribuído para a progressão da degradação articular. Dessa forma, a presença dos adipócitos infrapatelares parece ser importante para contribuir com a homeostase da cavidade articular e podem ser considerados como indicadores da intensidade inflamatória da doença, tendo em vista a redução de sua área neste ambiente inflamatório.

A artrite reumatoide é caracterizada pelo aumento de células inflamatórias na cavidade articular, que causam degradação óssea e cartilaginosa, culminando em dor e perda de função do membro atingido. O modelo de artrite induzida por antígeno, utilizado nesse estudo, é caracterizado pelo influxo de neutrófilos na articulação (OLIVEIRA, MARINA CHAVES *et al.*, 2017; QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2011). Os neutrófilos são os leucócitos mais abundante no líquido sinovial de pacientes com AR (CASCÃO *et al.*, 2010) e liberam grânulos contendo MPO, colagenase e MMPs. Foi

mostrado no nosso estudo que na articulação de animais AIA alimentados com dieta HC, houve aumento de neutrófilos na cavidade articular, MPO e as citocinas IL-17 e IL-1 $\beta$ . Essas citocinas estão envolvidas na patogênese da AR pois podem ser secretadas por neutrófilos e FLS (KONDO; KURODA; KOBAYASHI, 2021; LUBBERTS; KOENDERS; VAN DEN BERG, 2005; LUBBERTS; VAN DEN BERG, 2003). De acordo com nossos resultados, foi demonstrado também na literatura um aumento na articulação da citocina inflamatória IL-17 em animais obesos e com artrite induzida por colágeno (JHUN *et al.*, 2012). Um estudo anterior do nosso grupo, entretanto, mostrou redução de neutrófilos e inflamação em modelo agudo de artrite associado a obesidade (OLIVEIRA, MARINA CHAVES *et al.*, 2017). Segundo os autores, após a oferta de dietas com diferentes composições, houve um menor recrutamento de células inflamatórias para a região lesada, o que foi atribuído a uma resposta imunológica mais lenta, devido a presença de alterações metabólicas. Assim, sugerimos que no modelo de artrite crônica conseguimos estabelecer melhor esta relação que é observada na literatura de piora na artrite em pacientes obesos, sendo associada a intensidade da inflamação na articulação.

As alterações celulares e moleculares na AR associam-se a degradação articular na doença. A perda óssea é mediada pelo aumento do número de osteoclastos. Em situações patológicas como na AR, há super ativação dos osteoclastos devido ao aumento de células do sistema imune, como os neutrófilos e FLS. Além disso, citocinas inflamatórias, como IL-17 e IL-1 $\beta$ , são relatadas como osteoclastogênicas (JUNG *et al.*, 2014). A degradação da cartilagem é mediada pelas MMPs, que são altamente expressas durante a AR. Essas enzimas degradam principalmente o colágeno e são expressas por células do sistema imune, como os neutrófilos (YASUDA, 2006). Essas moléculas e células, em conjunto, são responsáveis pela inflamação e pelo dano tecidual na AR (O'NEIL; KAPLAN, 2019). No nosso estudo, animais obesos tiveram aumento de citocinas e células inflamatórias na cavidade articular, associado a maior pontuação no score de artrite, que avalia a infiltração de leucócitos, e dano articular. Outros estudos experimentais mostram um efeito similar ao que foi encontrado nesse estudo, com aumento da pontuação no score em animais obesos com artrite (ARIAS DE LA ROSA *et al.*, 2021; HAMAGUCHI *et al.*, 2012; JHUN *et al.*, 2012). Parece que a obesidade pode aumentar células inflamatórias e isso está envolvido com a piora da artrite em modelo experimental

(JHUN *et al.*, 2012). Sugerimos, portanto, que animais obesos tiveram maior pontuação no score de artrite devido ao aumento de células inflamatórias na articulação. Isso pode ter sido ocasionado pela inflamação crônica de baixa intensidade presente na obesidade decorrente da expansão do tecido adiposo.

A degradação da articulação está relacionada com dor e incapacidade em pacientes com artrite reumatoide (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). De fato, animais com artrite experimental tiveram hipernocicepção associada às alterações inflamatórias na articulação e animais obesos tiveram essa resposta exarcebada. Curiosamente, animais obesos sem artrite também apresentaram hipernocicepção, associada a uma tendência de aumento no score da artrite e do infiltrado inflamatório na articulação. O acúmulo de neutrófilos e de citocinas na cavidade articular, em especial a IL-1 $\beta$ , está relacionado com a hipernocicepção (SACHS *et al.*, 2011; VERRI *et al.*, 2006), e esse aumento foi observado em nosso estudo. Além disso, foi relatado que a obesidade pode aumentar o risco de desenvolvimento de AR (LU *et al.*, 2014). Portanto, sugerimos que a hipernocicepção dos animais pode estar relacionada com o aumento de neutrófilos e citocinas inflamatórias na cavidade articular e que na obesidade, por ter agravamento da inflamação articular, contribui também com a exacerbação da resposta nociceptiva.

Acreditamos que as alterações metabólicas desencadeadas pela dieta HC seriam as responsáveis pelo aumento da inflamação articular. Assim, tratamos os animais magros e obesos com um hipoglicemiante oral, a metformina, visando a melhora do metabolismo. Conforme esperado, o tratamento com metformina reduziu a glicemia dos animais independente da dieta. O tratamento com metformina reduziu, a adiposidade somente nos animais magros, mas reduziu, de forma interessante, a área de adipócitos em animais magros e obesos, independente da artrite, sugerindo que a ação anti-artrítica do medicamento foi associada a uma alteração na morfologia do tecido adiposo. Já foi mostrado que a metformina pode atuar no remodelamento do tecido adiposo. Os mecanismos para essa ação estão associados à redução da ingestão alimentar e ao aumento do gasto energético associado ao aumento de marcadores termogênicos do tecido adiposo marrom (COLL *et al.*, 2020; KARISE *et al.*, 2019; KIM, E. K. *et al.*, 2016). A metformina pôde, portanto, agir no tecido adiposo, regulando o remodelamento desse tecido em animais magros e obesos, e como

esperado, no metabolismo da glicose, provavelmente por meio da redução da gliconeogênese e agindo na sensibilidade periférica à glicose (BAILEY, 2017; LAMOIA; SHULMAN, 2021). Assim, a metformina agiu conforme proposto, contribuindo com uma melhora metabólica significativa nos animais.

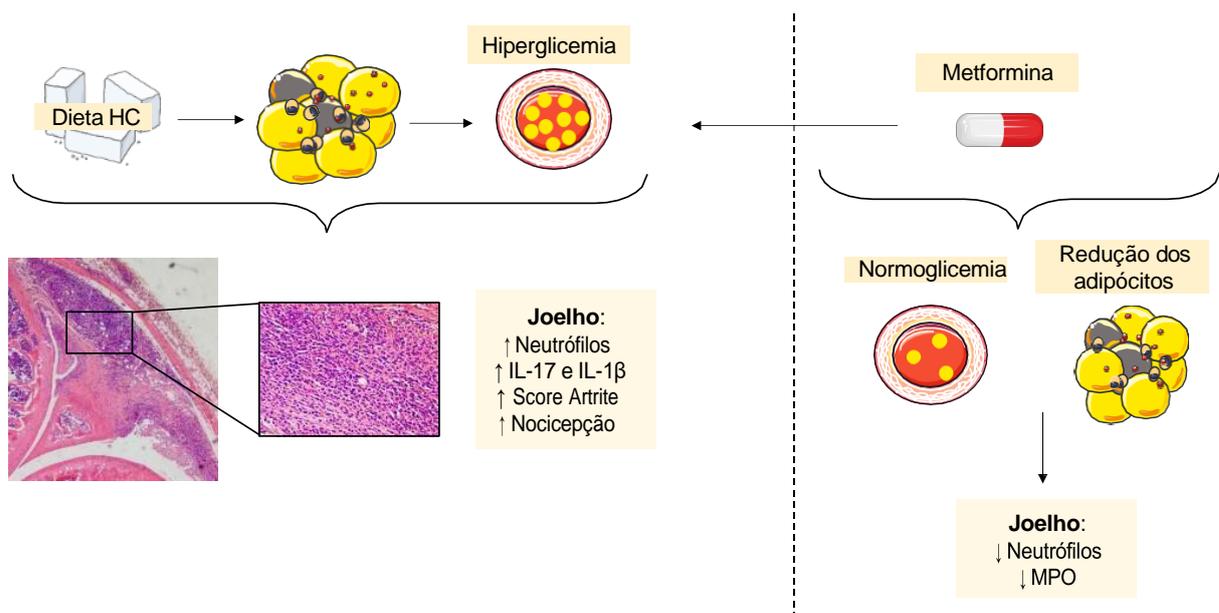
Os efeitos hipoglicemiantes da metformina foram acompanhados de redução significativa da inflamação articular. Nosso estudo mostrou que o tratamento com MET em magros e obesos reduziu esses marcadores, como infiltração de leucócitos e MPO na cavidade articular, apesar de não ter efeito na nocicepção dos animais. De fato, estudos anteriores mostraram o efeito protetor da metformina na artrite (FAN *et al.*, 2020; GHARIB *et al.*, 2021; NOVAIS *et al.*, 2018). Mahmoud Gharib e colaboradores (2021) ofertou metformina para pacientes em uso de DMARDs e com AR com atividade moderada ou alta. Foi constatado que o tratamento reduziu a inflamação articular e a gravidade da doença e melhorou a qualidade de vida de pacientes com AR. Entretanto, os mecanismos para isso não foram bem investigadas (GHARIB *et al.*, 2021). Assim, alguns estudos demonstram possíveis mecanismos relacionados ao efeito antiartrítico da metformina. Foi relatado que a metformina pode inibir a proliferação e a viabilidade celular de FLS *in vitro*, reduzindo assim a hiperplasia sinovial (CHEN, K. *et al.*, 2019). Eun-Kyung Kim e colaboradores (2018) utilizou animais obesos e tratados com metformina e viu que o medicamento restaurou o equilíbrio Th17/Treg pela redução da diferenciação de células Th17 e aumento da diferenciação de células Treg *in vitro* (KIM, E. K. *et al.*, 2020). De forma interessante, o equilíbrio Th17/Treg tem influência na diferenciação dos osteoclastos e no metabolismo de FLS, fatores fundamentais na patogênese da AR (TU *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2020). Já que a glicose tem papel no metabolismo dessas células imunológicas (MICHALEK *et al.*, 2011; WANG, R.; GREEN, 2012), sugerimos que o uso da metformina pode ter contribuído na restauração do equilíbrio entre esses dois tipos celulares devido a regulação do metabolismo da glicose, reduzindo as células inflamatórias na cavidade articular.

A obesidade tem elevada prevalência e com isso, se torna cada vez mais comuns as comorbidades, como a AR. A AR causa dor e piora na qualidade de vida dos pacientes e os tratamentos disponíveis podem não ser eficazes ou causam efeitos colaterais indesejados. O entendimento de mecanismos que possam melhorar a

qualidade de vida desses pacientes é importante, já que pode ser coadjuvante no tratamento. Além disso, a literatura carece de estudos que investiguem se de fato o metabolismo está envolvido na patogênese da artrite e como a melhora dele afeta o curso da doença, sendo assim proposto este estudo. Entretanto, entendemos que o nosso estudo apresenta limitações e pontos que deveriam ser aprofundados. Não fizemos avaliações mais aprofundadas de outros marcadores metabólicos que poderiam ser influenciados pelo uso da metformina. Além disso, o efeito secundário da metformina na inflamação pode ser um confundidor nos resultados. Entretanto, como o aumento do tecido adiposo está relacionado com piora da artrite por causa da inflamação e não houve alteração no índice de adiposidade nos animais tratados e com artrite, acreditamos que o principal efeito da metformina, como regulador do metabolismo, seja o responsável pela melhora da inflamação articular. O entendimento do efeito da metformina na morfologia da articulação e inflamação precisa ser mais bem investigada para entender o impacto do medicamento nessa questão. Além disso, a avaliação da expressão de marcadores lipogênicos, lipolíticos e relacionados ao metabolismo de glicose no tecido adiposo poderia ajudar a esclarecer como o medicamento afeta o remodelamento do tecido adiposo.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos dados expostos, viu-se que a dieta HC desencadeou o aumento do tecido adiposo, associado a hipertrofia dos adipócitos e ao aumento da glicose sanguínea. Essas alterações metabólicas ocorreram concomitantemente com piora da inflamação articular, hipernocicepção e redução da área de adipócitos infrapatelar, mesmo sem alteração no peso dos animais. No geral, ao tratar os camundongos com um hipoglicemiante oral, houve melhora dos marcadores inflamatórios articulares associados a uma melhor resposta metabólica e local no tecido adiposo (Figura 12). Esses dados em conjunto sugerem que o metabolismo parece ter influência no processo inflamatório nesse modelo de artrite experimental. Entretanto, estudos complementares que investigue mecanismos para essa ocorrência precisam ser realizados a fim de expandir, no futuro, a possibilidade de tratamentos para pessoas com AR.



**Figura 12 12– Alterações inflamatórias no joelho em animais obesos e o efeito da metformina nesse cenário.** A dieta HC leva ao aumento da área de adipócitos e do índice de adiposidade e isso está relacionado com o aumento da glicemia. Essas alterações levam ao aumento da inflamação articular, associado a maior pontuação no score de artrite e maior nocicepção. Entretanto, o tratamento com metformina possibilitou a melhora da glicemia nesse contexto e alterou a área de adipócitos desses animais, o que pode ter contribuído com a melhora de marcadores inflamatórios do joelho de animais tratados com o medicamento.

## REFERÊNCIAS

- ALIVERNINI, S. *et al.* Overweight/obesity affects histological features and inflammatory gene signature of synovial membrane of Rheumatoid Arthritis. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 10420, jul. 2019.
- ALVAREZ-NEMEGYEI, J. *et al.* Association between Overweight/Obesity and Clinical Activity in Rheumatoid Arthritis. *Reumatologia clinica*, v. 16, n. 6, p. 462–467, 2020.
- ALVEHUS, M. *et al.* The human visceral fat depot has a unique inflammatory profile. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, v. 18, n. 5, p. 879–883, maio 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20186138/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.
- ANQUETIL, F. *et al.* IgM and IgA Rheumatoid Factors Purified from Rheumatoid Arthritis Sera Boost the Fc Receptor– and Complement-Dependent Effector Functions of the Disease-Specific Anti–Citruinated Protein Autoantibodies. *The Journal of Immunology*, v. 194, n. 8, p. 3664–3674, 15 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/194/8/3664>>. Acesso em: 29 jun. 2021.
- ARIAS DE LA ROSA, I. *et al.* Impact of obesity on rheumatoid arthritis (RA) onset and progression. in vivo and in vitro effects of synthetic DMARDs on the raassociated metabolic alterations. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 77, p. 261, 2018. Disponível em: <<https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L623991286&from=export>>.
- ARIAS DE LA ROSA, I. *et al.* Molecular Changes in the Adipose Tissue Induced by Rheumatoid Arthritis: Effects of Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 744022, 2021.
- BAILEY, C. J. Metformin: historical overview. *Diabetologia*, v. 60, n. 9, p. 1566–1576, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28776081/>>.
- BAKER, J. F. *et al.* Obesity, Weight Loss, and Progression of Disability in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care and Research*, v. 70, n. 12, p. 1740–1747, 1 dez. 2018.
- BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological reviews*, v. 233, n. 1, p. 233–255, jan. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20193003/>>. Acesso em: 1 nov. 2022.
- BIRNBAUM, H. *et al.* Societal cost of rheumatoid arthritis patients in the US. <https://doi.org/10.1185/03007990903422307>, v. 26, n. 1, p. 77–90, jan. 2009. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1185/03007990903422307>>. Acesso em: 2 nov. 2022.
- BUSTAMANTE, M. F. *et al.* Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the

pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 19, n. 1, 31 maio 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5452638/>. Acesso em: 1 nov. 2022.

CANI, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, v. 56, n. 7, p. 1761–1772, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456850/>.

CAO, H. *et al.* Baseline adiponectin and leptin levels in predicting an increased risk of disease activity in rheumatoid arthritis: A meta-analysis and systematic review. *Autoimmunity*, v. 49, n. 8, p. 547–553, 16 nov. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27690205/>. Acesso em: 30 jun. 2021.

CARRIÓN, M. *et al.* The adipokine network in rheumatic joint diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. [S.l.]: MDPI AG. Disponível em: </pmc/articles/PMC6747092/>. Acesso em: 30 jun. 2021. , 1 set. 2019

CASCÃO, R. *et al.* Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews*, v. 9, n. 8, p. 531–535, 2010.

CHEN, K. *et al.* Metformin inhibits the proliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through IGF-IR/PI3K/AKT/m-TOR pathway. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, v. 115, 1 jul. 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31028998/>. Acesso em: 19 jun. 2022.

CHEN, Z. *et al.* Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/>. Acesso em: 30 jun. 2021. , 1 jan. 2019

COELHO, F. M. *et al.* The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis and Rheumatism*, 2008.

COLL, A. P. *et al.* GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance. *Nature*, v. 578, n. 7795, p. 444–448, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31875646/>.

CORRÊA, J. D. *et al.* Arthritis-induced alveolar bone loss is associated with changes in the composition of oral microbiota. *Anaerobe*, v. 39, p. 91–96, jun. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996416300208>.

DAYER, J. M.; BRESNIHAN, B. Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, v. 46, n. 3, p. 574–578, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11920390/>. Acesso em: 2 nov. 2022.

DE LA ROSA, I ARIAS *et al.* Defective glucose and lipid metabolism in rheumatoid arthritis is determined by chronic inflammation in metabolic tissues. *Journal of Internal Medicine*, v. 284, n. 1, p. 61–77, 2018.

DE LA ROSA, IVÁN ARIAS *et al.* Molecular Changes in the Adipose Tissue Induced by Rheumatoid Arthritis: Effects of Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs.

*Frontiers in Immunology*, v. 12, 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8549628/>.

DEANE, K. D.; HOLERS, V. M. Rheumatoid Arthritis Pathogenesis, Prediction, and Prevention: An Emerging Paradigm Shift. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, v. 73, n. 2, p. 181–193, fev. 2021.

DESPRÉS, J. P. Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation*, v. 126, n. 10, p. 1301–1313, 4 set. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22949540/>. Acesso em: 2 nov. 2022.

DINICOLANTONIO, J. J. *et al.* Fructose-induced inflammation and increased cortisol: A new mechanism for how sugar induces visceral adiposity. *Progress in Cardiovascular Diseases*, v. 61, n. 1, p. 3–9, 1 maio 2018.

DISSICK, A. *et al.* Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Journal of periodontology*, v. 81, n. 2, p. 223–230, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20151800/>.

DROLET, R. *et al.* Fat Depot-specific Impact of Visceral Obesity on Adipocyte Adiponectin Release in Women. *Obesity*, v. 17, n. 3, p. 424–430, 1 mar. 2009. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/oby.2008.555>. Acesso em: 2 nov. 2022.

ENGLAND, B. R. *et al.* Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: Mechanisms and implications. *BMJ (Online)*, v. 361, 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC6889899/>. Acesso em: 29 jun. 2021.

FAN, K.-J. *et al.* Metformin inhibits inflammation and bone destruction in collagen-induced arthritis in rats. *Annals of Translational Medicine*, v. 8, n. 23, p. 1565, 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7791269/>.

FARISOĞULLARI, B. *et al.* The influence of obesity on biological DMARD treatment response in psoriatic arthritis: Hur-bio real life results. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 79, n. SUPPL 1, p. 1679–1680, 2020. Disponível em: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L633305213&from=export>.

FERRAZ-AMARO, I. *et al.* Impaired beta cell function is present in nondiabetic rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Research and Therapy*, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2013. Disponível em: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4149>.

FIGUS, F. A. *et al.* Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities. *Autoimmunity Reviews*, v. 20, n. 4, p. 102776, 1 abr. 2021.

FISCHER, B. D. *et al.* Animal models of rheumatoid pain: Experimental systems and insights. *Arthritis Research and Therapy*, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-017-1361-6>.

FOLEY, K. P. *et al.* Inflammation promotes adipocyte lipolysis via IRE1 kinase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 296, p. 100440, jan. 2021. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925821002131>>.

FORETZ, M. *et al.* Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *The Journal of clinical investigation*, v. 120, n. 7, p. 2355–2369, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20577053/>>.

GHARIB, M. *et al.* Efficacy and Safety of Metformin Use in Rheumatoid Arthritis: A Randomized Controlled Study. *Frontiers in pharmacology*, v. 12, 22 set. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34630103/>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. *et al.* Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, n. 1, p. 17034, 21 dez. 2017.

HAMAGUCHI, K. *et al.* Analysis of adipose tissues and stromal vascular cells in a murine arthritis model. *Metabolism: clinical and experimental*, v. 61, n. 12, p. 1687–1695, dez. 2012.

HAN, W. *et al.* Infrapatellar fat pad in the knee: is local fat good or bad for knee osteoarthritis? *Arthritis Research & Therapy*, v. 16, n. 4, p. R145, 2014. Disponível em: <<http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4607>>.

HANNEMANN, N.; APPARAILLY, F.; COURTIES, G. Synovial macrophages: from ordinary eaters to extraordinary multitaskers. *Trends in immunology*, v. 42, n. 5, p. 368–371, 1 maio 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33832864/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine*, v. 352, n. 16, p. 1685–1695, 21 abr. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15843671/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

HE, L. Metformin and Systemic Metabolism. *Trends in pharmacological sciences*, v. 41, n. 11, p. 868, 2020. Disponível em: <</pmc/articles/PMC7572679/>>.

HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *The New England journal of medicine*, v. 376, n. 3, p. 254–266, 19 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28099824/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

HRUBY, A.; HU, F. B. *The Epidemiology of Obesity: A Big Picture*. *PharmacoEconomics*. [S.l.]: Springer International Publishing. Disponível em: <</pmc/articles/PMC4859313/>>. Acesso em: 30 jun. 2021. , 4 dez. 2015

HU, Y. *et al.* Combination Usage of AdipoCount and Image-Pro Plus/ImageJ Software for Quantification of Adipocyte Sizes. *Frontiers in endocrinology*, v. 12, 4 ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34421815/>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

ITEM, F.; KONRAD, D. Visceral fat and metabolic inflammation: The portal theory

revisited. *Obesity Reviews*, v. 13, n. SUPPL.2, p. 30–39, dez. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23107257/>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

JEPPESEN, J. *et al.* Effect of metformin on postprandial lipemia in patients with fairly to poorly controlled NIDDM. *Diabetes care*, v. 17, n. 10, p. 1093–1099, 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7821127/>>.

JHUN, J.-Y. *et al.* Obesity aggravates the joint inflammation in a collagen-induced arthritis model through deviation to Th17 differentiation. *Experimental & molecular medicine*, v. 44, n. 7, p. 424–431, jul. 2012a.

JHUN, J.-Y. *et al.* Obesity aggravates the joint inflammation in a collagen-induced arthritis model through deviation to Th17 differentiation. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 44, n. 7, p. 424, 2012b. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.3858/emm.2012.44.7.047>>.

JUNG, S. M. *et al.* Cytokine-Mediated Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Immunology Research*, v. 2014, p. 1–15, 2014.

KARISE, I. *et al.* Metformin enhances mitochondrial biogenesis and thermogenesis in brown adipocytes of mice. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, v. 111, p. 1156–1165, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30841429/>>.

KATTOOR, A. J. *et al.* Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*, v. 19, n. 11, p. 42, 18 nov. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11883-017-0678-6>>.

KIM, E.-K. *et al.* Metformin ameliorates experimental-obesity-associated autoimmune arthritis by inducing FGF21 expression and brown adipocyte differentiation. *Experimental & molecular medicine*, v. 50, n. 1, p. e432, jan. 2018.

KIM, E. K. *et al.* Metformin ameliorates experimental-obesity-associated autoimmune arthritis by inducing FGF21 expression and brown adipocyte differentiation. *Experimental and Molecular Medicine*, v. 50, n. 1, p. e432–e432, 26 jan. 2018.

KIM, E. K. *et al.* Metformin Prevents Fatty Liver and Improves Balance of White/Brown Adipose in an Obesity Mouse Model by Inducing FGF21. *Mediators of inflammation*, v. 2016, p. 5813030, 2016.

KIM, E. K. *et al.* Metformin rescues rapamycin-induced mitochondrial dysfunction and attenuates rheumatoid arthritis with metabolic syndrome. *Arthritis research & therapy*, v. 22, n. 1, p. 77, abr. 2020.

KONDO, N.; KURODA, T.; KOBAYASHI, D. Cytokine Networks in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 20, p. 10922, 10 out. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/20/10922>>.

KRATZ, M. *et al.* Metabolic Dysfunction Drives a Mechanistically Distinct Proinflammatory Phenotype in Adipose Tissue Macrophages. *Cell Metabolism*, v. 20,

n. 4, p. 614–625, out. 2014.

LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nature Reviews Endocrinology* 2015 12:1, v. 12, n. 1, p. 15–28, 10 nov. 2015. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrendo.2015.189>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

LAMOIA, T. E.; SHULMAN, G. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. *Endocrine Reviews*, v. 42, n. 1, p. 77, 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7846086/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3946086/)>.

LIN, X.; LI, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, 6 set. 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC8450866/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39450866/)>. Acesso em: 2 nov. 2022.

LIN, Y. J.; ANZAGHE, M.; SCHÜLKE, S. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells*, v. 9, n. 4, 3 abr. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7226834/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37226834/)>. Acesso em: 1 nov. 2022.

LU, B. *et al.* Being overweight or obese and risk of developing rheumatoid arthritis among women: a prospective cohort study. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 73, n. 11, p. 1914–1922, nov. 2014.

LUBBERTS, E.; KOENDERS, M.; VAN DEN BERG, W. B. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis research & therapy*, v. 7, n. 1, p. 29–37, fev. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15642151/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

LUBBERTS, E.; VAN DEN BERG, W. B. Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Collagen-Induced Arthritis. [S.l: s.n.], 2003. p. 194–202. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-0171-8\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-0171-8_11)>.

LV, Z.; GUO, Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. *Frontiers in Endocrinology*, v. 11, p. 191, 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7212476/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37212476/)>.

MA, T. C. *et al.* Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, v. 411, n. 2, p. 98–103, jan. 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394006011517>>.

MACCHI, V. *et al.* The infrapatellar fat pad and the synovial membrane: an anatomic-functional unit. *Journal of Anatomy*, v. 233, n. 2, p. 146–154, 14 ago. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/joa.12820>>.

MAKRYGIANNAKIS, D. *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 67, n. 10, p. 1488–1492, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18413445/>>.

MALHI, H.; GORES, G. J. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*, v. 134, n. 6, p. 1641–1654, 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18471544/>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

MALMSTRÖM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nature reviews. Immunology*, v. 17, n. 1, p. 60–75, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27916980/>>.

MARCHAND, N. *et al.* Long-term Weight Changes and Risk of Rheumatoid Arthritis among Women in a Prospective Cohort: A Marginal Structural Model Approach. *Arthritis and Rheumatology*, v. 72, n. SUPPL 10, p. 2006–2008, 2020. Disponível em: <<https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L634231828&from=export>>.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, 8 dez. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22150039/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

MICHALEK, R. D. *et al.* Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 186, n. 6, p. 3299–3303, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21317389/>>.

MONTAGNA, G. LA *et al.* Insulin resistance is an independent risk factor for atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Diabetes and Vascular Disease Research*, v. 4, n. 2, p. 130–135, 24 jun. 2007. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.3132/dvdr.2007.031>>.

NEUMANN, E. *et al.* Adipokines and Autoimmunity in Inflammatory Arthritis. *Cells*, v. 10, n. 2, p. 1–15, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33499006/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

NISHI, H.; HIGASHIHARA, T.; INAGI, R. Lipotoxicity in Kidney, Heart, and Skeletal Muscle Dysfunction. *Nutrients*, v. 11, n. 7, p. 1664, 20 jul. 2019.

NOVAIS, E. N. *et al.* Body Mass Index Affects Proximal Femoral but Not Acetabular Morphology in Adolescents Without Hip Pathology. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, v. 100, n. 1, p. 66–74, jan. 2018.

O'NEIL, L. J.; KAPLAN, M. J. Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: Breaking Immune Tolerance and Fueling Disease. *Trends in Molecular Medicine*, v. 25, n. 3, p. 215–227, 2019.

OLIVEIRA, MARINA C. *et al.* Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity*, 2013.

OLIVEIRA, MARINA C *et al.* Tumor Necrosis Factor, but Not Neutrophils, Alters the Metabolic Profile in Acute Experimental Arthritis. *PloS one*, v. 11, n. 1, p. e0146403, 2016.

OLIVEIRA, MARINA CHAVES *et al.* Two opposite extremes of adiposity similarly reduce inflammatory response of antigen-induced acute joint inflammation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, v. 33, p. 132–140, jan. 2017.

OTERO, M. *et al.* Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 65, n. 9, p. 1198, 2006. Disponível em: </pmc/articles/PMC1798289/>.

PEREIRA, S. S. *et al.* Differences in adipose tissue inflammation and oxidative status in C57BL/6 and ApoE<sup>-/-</sup> mice fed high fat diet. *Animal Science Journal*, v. 83, n. 7, p. 549–555, jul. 2012.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiological Reviews*, v. 98, n. 4, p. 2133–2223, 1 out. 2018. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00063.2017>. Acesso em: 2 nov. 2022.

PI, H. *et al.* Abnormal Glucose Metabolism in Rheumatoid Arthritis. *BioMed Research International*, v. 2017, 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5424188/>.

QIN, B. *et al.* Body mass index and the risk of rheumatoid arthritis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Arthritis research & therapy*, v. 17, n. 1, p. 86, mar. 2015.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M. *et al.* Experimental Arthritis Triggers Periodontal Disease in Mice: Involvement of TNF- $\alpha$  and the Oral Microbiota. *The Journal of Immunology*, v. 187, n. 7, p. 3821–3830, 1 out. 2011. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1101195>.

RAMALHO, L. *et al.* Metabolic disturbances due to a high-fat diet in a non-insulin-resistant animal model. *Nutrition & diabetes*, v. 7, n. 3, 13 mar. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28287629/>. Acesso em: 2 nov. 2022.

RISTIĆ, G. G. *et al.* Impact of disease activity on impaired glucose metabolism in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 23, n. 1, p. 95, 2021.

RODRÍGUEZ-CORREA, E. *et al.* Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutrition & Diabetes*, v. 10, n. 1, p. 24, 2 dez. 2020.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. What We Talk About When We Talk About Fat. *Cell*, v. 156, n. 1–2, p. 20–44, jan. 2014.

SACHS, D. *et al.* Cooperative role of tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 162, n. 1, p. 72–83, jan. 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.2010.00895.x>.

SAGHAFI-ASL, M. *et al.* Association of endotoxaemia with serum free fatty acids in metabolically healthy and unhealthy abdominally obese individuals: a case-control study in northwest of Iran. *BMJ open*, v. 7, n. 5, 1 maio 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28487462/>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SANDERS, F. W. B.; GRIFFIN, J. L. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews*, v. 91, n. 2, p. 452–468, 1 maio 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/brv.12178>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SCHERER, H. U.; HÄUPL, T.; BURMESTER, G. R. The etiology of rheumatoid arthritis. *Journal of autoimmunity*, v. 110, 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31980337/>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

SHAHIN, D. *et al.* Insulin resistance in early untreated rheumatoid arthritis patients. *Clinical Biochemistry*, v. 43, n. 7–8, p. 661–665, maio 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000991201000055X>>.

SHIN, N. R. *et al.* An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, v. 63, n. 5, p. 727–735, 1 maio 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23804561/>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

SMOLEN, J. S. *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 76, n. 6, p. 960–977, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28264816/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SMOLEN, J. S. *et al.* Rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Disease Primers* 2018 4:1, v. 4, n. 1, p. 1–23, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrdp20181>>.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. *Rheumatoid arthritis. The Lancet*. [S.l.]: Lancet Publishing Group. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673616301738/fulltext>>. Acesso em: 13 jun. 2021. , 22 out. 2016

SOKKA, T.; ABELSON, B.; PINCUS, T. Mortality in rheumatoid arthritis: 2008 update. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 26, n. 5 Suppl 51, p. S35-61, 1 set. 2008. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/19026144>>. Acesso em: 1 nov. 2022.

SON, K. M. *et al.* Association of body composition with disease activity and disability in rheumatoid arthritis. *The Korean Journal of Internal Medicine*, v. 36, n. 1, p. 214, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/347820641/>>.

SOUZA, D. G. *et al.* Increased Mortality and Inflammation in Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-14 Transgenic Mice after Ischemia and Reperfusion Injury. *The American Journal of Pathology*, v. 160, n. 5, p. 1755, 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11850862/>>.

SPADARO, P. A. *et al.* A refined high carbohydrate diet is associated with changes in the serotonin pathway and visceral obesity. *Genetics research*, v. 97, 28 dez. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26707058/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SPARKS, J. A. Rheumatoid Arthritis. *Annals of internal medicine*, v. 170, n. 1, p. ITC1–ITC15, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30596879/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

STIGLER, F. L.; LUSTIG, R. H.; MA, J. I. Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity. *The New England journal of medicine*, v. 376, n. 15, p. 1491, 13 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28402779>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

STREHL, C. *et al.* Defining conditions where long-term glucocorticoid treatment has an acceptably low level of harm to facilitate implementation of existing recommendations: Viewpoints from an EULAR task force. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 75, n. 6, p. 952–957, 2016. Disponível em: <<https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L609057708&from=export>>.

SURENDAR, J. *et al.* Adiponectin limits ifn- $\gamma$  and il-17 producing cd4 t cells in obesity by restraining cell intrinsic glycolysis. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. OCT, p. 2555, 2019. Disponível em: <</pmc/articles/PMC6828851/>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

TRIGGLE, C. R. *et al.* Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases? *Metabolism*, v. 133, p. 155223, ago. 2022.

TU, J. *et al.* Two Main Cellular Components in Rheumatoid Arthritis: Communication Between T Cells and Fibroblast-Like Synoviocytes in the Joint Synovium. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 1 jul. 2022. Disponível em: <</pmc/articles/PMC9284267/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

VAN SON, J. *et al.* Plasma Imidazole Propionate Is Positively Correlated with Blood Pressure in Overweight and Obese Humans. *Nutrients*, v. 13, n. 8, ago. 2021.

VASAMSETTI, S. B. *et al.* Metformin inhibits monocyte-to-macrophage differentiation via AMPK-mediated inhibition of STAT3 activation: potential role in atherosclerosis. *Diabetes*, v. 64, n. 6, p. 2028–2041, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25552600/>>.

VERRI, W. A. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, n. 1, p. 116–138, out. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725806000544>>.

WALSMITH, J.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *International journal of cardiology*, v. 85, n. 1, p. 89–99, set. 2002.

WANG, C. *et al.* Metformin suppresses lipid accumulation in skeletal muscle by promoting fatty acid oxidation. *Clinical laboratory*, v. 60, n. 6, p. 887–896, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25016691/>>.

WANG, K. *et al.* Serum levels of interleukin-17 and adiponectin are associated with infrapatellar fat pad volume and signal intensity alteration in patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 18, n. 1, p. 193, 26 dez. 2016.

Disponível em: <<http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-016-1088-9>>.

WANG, R.; GREEN, D. R. Metabolic reprogramming and metabolic dependency in T cells. *Immunological reviews*, v. 249, n. 1, p. 14–26, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22889212/>>.

WANG, Y. W. *et al.* Metformin: a review of its potential indications. *Drug design, development and therapy*, v. 11, p. 2421–2429, 22 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28860713/>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

YASUDA, T. Cartilage destruction by matrix degradation products. *Modern rheumatology*, v. 16, n. 4, p. 197–205, ago. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16906368/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

YEREVANIAN, A.; SOUKAS, A. A. Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Weight Loss. *Current obesity reports*, v. 8, n. 2, p. 156–164, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30874963/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

ZHU, L. *et al.* The correlation between the Th17/Treg cell balance and bone health. *Immunity and Ageing*, v. 17, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2020. Disponível em: <<https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12979-020-00202-z>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

ZORENA, K. *et al.* Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 10, 2 maio 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32443588/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

## ANEXO I – Comissão de Ética no Uso de Animais



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Influência da obesidade na resposta inflamatória e alterações metabólicas na artrite crônica", protocolo do CEUA: 288/2017 sob a responsabilidade de Adaliene Versiani Matos Ferreira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/08/2022.

Vigência da Autorização	23/10/2022 a 22/10/2024
Prorrogação de Vigência da Autorização	23/10/2022 a 22/10/2024
Finalidade	Pesquisa
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	16
Peso/Idade	22g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	16
Peso/Idade	22g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	16
Peso/Idade	22g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	16
Peso/Idade	22g / 6(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
<b>*Espécie/linhagem</b>	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	16