

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Efeitos dos inibidores de fosfodiesterases, roflumilast e tadalafil,
sobre as alterações fisio-metabólicas e biomarcadores do estresse
glico-oxidativo em modelo de obesidade e resistência à insulina**

Juliana Oriel de Oliveira

Araraquara-SP

2021

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**



**Efeitos dos inibidores de fosfodiesterases, roflumilast e tadalafil,
sobre as alterações fisio-metabólicas e biomarcadores do estresse
glico-oxidativo em modelo de obesidade e resistência à insulina**

Juliana Oriel de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de
Fármacos e Medicamentos, para obtenção do
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Araraquara

2021

O49e Oliveira, Juliana Oriel de.
Efeitos dos inibidores de fosfodiesterases, roflumilast e tadalafil, sobre as alterações físió-metabólicas e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em modelo de obesidade e resistência à insulina / Juliana Oriel de Oliveira. – Araraquara: [S.n.], 2021.
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Amanda Martins Baviera.

1. Inibidores de fosfodiesterases. 2. Resistência à insulina. 3. Obesidade. 4. Estresse glico-oxidativo. I. Baviera, Amanda Martins, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos dos inibidores de fosfodiesterases, roflumilast e tadalafil, sobre as alterações fisio-metabólicas e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em modelo de obesidade e resistência à insulina

AUTORA: JULIANA ORIEL DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: AMANDA MARTINS BAVIERA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. AMANDA MARTINS BAVIERA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

Profa. Dra. SILVIA DE PAULA GOMES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto

Profa. Dra. RENATA PIRES DE ASSIS (Participação Virtual)
Instituto de Ciências da Saúde / Universidade Paulista - UNIP - Araraquara

Araraquara, 25 de junho de 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me guiou até aqui e me dá forças para seguir por bons caminhos.

Aos meus pais, Aparecido e Dirce, que sempre me incentivaram a estudar e a seguir os meus sonhos, dando todo o suporte que poderiam oferecer. Sem o apoio deles esse trabalho não seria realizado.

À Lari e Nando, eu agradeço, pois mesmo tão distante, nunca deixaram de estar perto, me incentivando a seguir pelo caminho que acredito. Ao meu companheiro ao longo desses anos de mestrado, Fabiano, que sabe de cada alegria e cada problema que tive, que me ergueu de cada queda e não me deixou desistir.

Ao meu amigo Marco (desde o dia 1 de UNESP), eu agradeço por ter me feito companhia em muitos momentos difíceis. Às minhas amigas Fabiane, Mariana, Natália e Priscila, cujo apoio e carinho foram essenciais para que eu conseguisse concluir meu trabalho também.

À Professora Dra. Amanda Martins Baviera, pela oportunidade de realizar esse projeto de pesquisa, por sempre ter me incentivado a seguir na carreira acadêmica e por ter me orientado desde a iniciação científica, ainda na graduação.

Ao Professor Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, por todo o apoio e contribuição aos meus experimentos, pela visão de um pesquisador com muita vivência de bancada e experiência.

Ao Professor Dr. Marlus Chorilli, do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), pela colaboração na elaboração do veículo para incorporação dos fármacos.

Ao Professor Dr. Fernando Rogério Pavan, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP), por gentilmente permitir a utilização do equipamento espectrofluorímetro.

Aos meus companheiros de biotério, Anderson, Camila, Bruno e Tassiana. Foram muitos biotérios, levas de camundongos, eutanásias, curvas, e bancadas juntos. Sozinha eu não teria conseguido. Agradeço muito também à Ingrid, Tayra, Maiara,

Renata, Mariana e Tainá por todos os ensinamentos. Nossos cafés no meio da manhã e da tarde (e o dia inteiro também, às vezes) e nossas conversas sempre deixavam o ambiente mais harmonioso e o trabalho mais leve.

À Rachel Temperani, pela dedicação em fazer o sistema lipídico nanoestruturado para veiculação dos fármacos utilizados.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

EPIÍGRAFE

“Quais são as lições a serem aprendidas desta jornada da mente (através do universo)?
Que os humanos são mestres emocionalmente frágeis, perenes e ingênuos,
irremediavelmente ignorantes, de um ponto insignificante no cosmos.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

A hiperglicemia crônica decorrente da resistência insulínica resulta em aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais em conjunto contribuem para o estabelecimento do estresse glico-oxidativo. Atualmente, tem-se estudado os efeitos dos medicamentos da classe de inibidores de fosfodiesterases (iPDE) dos nucleotídeos cíclicos sobre a obesidade e suas complicações. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos do roflumilast (RFM, iPDE4) e do tadalafil (TDL, iPDE5) sobre as alterações fisiometabólicas e biomarcadores do estresse glico-oxidativo, com ênfase nos seguintes tecidos: plasma, fígado e rins, em camundongos sob sistema-modelo *in vivo* de obesidade. Camundongos machos C57BL/6/JUnib foram divididos em 7 grupos experimentais: P (alimentados com dieta padrão, P), HL (alimentados com dieta hiperlipídica, HL), HL-SLN (dieta HL e receberam veículo, sistema lipídico nanoestruturado), HL-RFM0,5 (dieta HL e tratados com 0,5 mg/kg de RFM), HL-RFM1,0 (dieta HL e tratados com 1,0 mg/kg de RFM), HL-TDL1,0 (dieta HL e tratados com 1,0 mg/kg de TDL) e HL-TDL2,0 (dieta HL e tratados com 2,0 mg/kg de TDL). O experimento teve duração de 16 semanas, sendo que na 9ª semana os tratamentos começaram a ser administrados diariamente para os respectivos grupos. Na 14ª semana foi realizado o teste de tolerância à glicose por via oral e na 15ª semana os animais passaram pelo teste de tolerância à insulina. Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados e o sangue coletado via punção cardíaca; foram retirados e pesados os tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal, tecido adiposo marrom, coração, músculo esquelético *gastrocnemius*, fígado e rins. Animais HL e HL-SLN apresentaram elevado ganho de peso corporal, maiores massas de tecidos adiposos brancos, resistência insulínica e intolerância à glicose; também apresentaram níveis elevados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em plasma, fígado e rins, níveis elevados de AGEs fluorescentes em plasma e rins, bem como diminuição nas atividades das enzimas antioxidantes paraoxonase 1 (PON 1) (plasma), catalase (CAT) (fígado) e glutathione peroxidase (GSH-Px) (fígado e rins). Em relação aos tratamentos de animais em dieta HL com os iPDEs, os tratamentos com roflumilast (0,5 e 1,0 mg/kg) promoveram diminuição no peso corporal, os quais alcançaram valores semelhantes aos animais P. Os tratamentos com tadalafil (1,0 e 2,0 mg/kg) também promoveram diminuição no peso corporal. Os menores valores de peso corporal de animais tratados com roflumilast ou tadalafil podem ser uma consequência das menores massas de tecidos adiposos brancos, as quais foram menores que aquelas encontradas em animais HL. Os animais tratados com ambas as doses dos inibidores de PDE apresentaram melhorias na tolerância à glicose e maior sensibilidade à insulina, em comparação aos animais HL. Animais tratados com roflumilast ou tadalafil também apresentaram diminuição nos níveis de AGEs (plasma e rins) e nos níveis de TBARS (plasma, fígado e rins). Houve um aumento na atividade de PON 1 nos animais tratados com roflumilast ou tadalafil. Animais HL-RFM1,0 apresentaram aumento na atividade de CAT no fígado, enquanto animais HL-TDL2,0 apresentaram aumento na atividade de CAT nos rins. Pode-se concluir que roflumilast e tadalafil atenuaram o ganho de peso corporal, exerceram efeitos benéficos na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina, e diminuíram os níveis de marcadores de danos glico-oxidativos em fígado e rins de animais alimentados com dieta HL.

Palavras-chave: inibidores de fosfodiesterases, resistência à insulina, obesidade, estresse glico-oxidativo.

ABSTRACT

Chronic hyperglycemia that emerges from insulin resistance results in higher generation of reactive oxygen species (ROS) and advanced glycation end products (AGEs), which contribute to the establishment of the glycoxidative stress. Recently, it has gained attention the effects of drugs belonging to the class of the inhibitors of phosphodiesterases (iPDE) on obesity and its complications. The objective of this study was to evaluate the effects of roflumilast (RFM, iPDE4) and tadalafil (TDL, iPDE5) on physiometabolic changes and the glycoxidative stress biomarkers with emphasis in the following tissues: plasma, liver and kidneys, of mice under an *in vivo* model system of obesity. Male C57BL/6/JUnib mice were divided into 7 experimental groups: P (fed a standard diet, P), HL (fed a high-fat diet, HFD), HL-SLN (fed a HFD and received nanostructured lipid system by gavage), HL-RFM0.5 (fed a HFD and treated with 0.5 mg/kg RFM), HL-RFM1.0 (fed a HFD and treated with 1.0 mg/kg RFM), HL-TDL1.0 (fed a HFD and treated with 1.0 mg/kg tadalafil) and HL-TDL2.0 (fed a HFD and treated with 2.0 mg/kg TDL). The experiment was performed throughout 16 weeks, in the 9th week the daily treatments were started. At the 14th week, the oral glucose tolerance test (OGTT) was performed; at the 15th week, the insulin tolerance test (ITT) was performed. After 16 weeks, the animals were euthanized and blood samples were collected by cardiac puncture; epididymal and retroperitoneal white adipose tissues, interscapular brown adipose tissue, heart, *gastrocnemius* skeletal muscle, liver and kidneys were removed and weighted. HL and HL-SLN mice had increases in the body weight gain and in the weights of white adipose tissues; they also had insulin resistance, glucose intolerance, increased levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the plasma, liver and kidneys, increased plasma and renal levels of fluorescent AGEs, decreased activities of paraoxonase 1 (PON 1) (plasma), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) (liver and kidneys). Regarding the treatments with the iPDEs, mice from HL-RFM0.5 and HL-RFM1.0 groups had low body weight gain values, which were similar from those of P group. The treatments with both doses of TDL also decreased the body weight gain in mice fed a HFD. The low mean values of body weight of mice treated with RFM or TDL could be explained by the analysis of the white adipose tissue weights, which were lower than those of HL group. Mice treated with both doses of RFM and TDL had improvements in the glucose tolerance and insulin sensitivity, when compared with mice from HL group. Mice treated with both doses of RFM and TDL also had decreased levels of AGEs (plasma and kidneys) and of TBARS (plasma, liver and kidneys). It was observed an important increase in the activity of PON 1 in mice treated with RFM and TDL in comparison with the HL mice. The HL-RFM1.0 mice had an increase in the CAT activity in the liver, while HL-TDL2.0 mice had an increase in the CAT activity in the kidneys. From these findings, it can be concluded that roflumilast and tadalafil attenuated the body weight gain, exerted beneficial effects on glucose metabolism by improving the glucose tolerance and insulin sensitivity, and decreased markers of glycoxidative damage in liver and kidneys of animals fed a HFD.

Keywords: phosphodiesterase inhibitors, insulin resistance, obesity, glycoxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais organelas envolvidas na geração de ERO intracelular e localização das enzimas antioxidantes	22
Figura 2. Reações de formação de ERO e ação das enzimas antioxidantes CAT e SOD.....	22
Figura 3. Via de sinalização do AMPc.....	28
Figura 4. Via de sinalização do GMPc	29
Figura 5. Estrutura química do roflumilast.....	30
Figura 6. Estrutura química do tadalafil	31
Figura 7. Delineamento experimental do piloto realizado para escolha do sistema lipídico nanoestruturado mais adequado para veiculação dos inibidores de fosfodiesterase.....	36
Figura 8. Delineamento do experimento definitivo para avaliação dos efeitos do tratamento por 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg) em animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas.....	38
Figura 9. Curva de calibração de 1,1,3,3-TMP ($\mu\text{mol/L}$) e leituras realizadas em (A) espectrofluorímetro e (B) espectrofotômetro	43
Figura 10. Curva de calibração de albumina ($\mu\text{g/mL}$)	46
Figura 11. Ingestão alimentar (g/dia) de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	50
Figura 12. Evolução de peso corporal (g) de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	52

Figura 13. Massas dos (A) tecidos adiposos brancos epididimal e (B) retroperitoneal e (C) do tecido adiposo marrom interescapular, corrigidas por milímetro de tíbia de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	54
Figura 14. Teste de tolerância à glicose oral de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	57
Figura 15. Teste de tolerância à insulina de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	58
Figura 16. Níveis de (A) AGEs fluorescentes, (B) TBARS e (C) atividade de PON 1 em plasma de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	61
Figura 17. Níveis de (A) AGEs fluorescentes e (B) TBARS no fígado de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	62
Figura 18. Atividade das enzimas antioxidantes (A) catalase, (B) glutational peroxidase, e (C) superóxido dismutase no fígado de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	63
Figura 19. Níveis de (A) AGEs fluorescentes e (B) TBARS nos rins de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	65
Figura 20. Atividade das enzimas antioxidantes (A) catalase, (B) glutational peroxidase, e (C) superóxido dismutase nos rins de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg)	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Famílias de fosfodiesterase, seus respectivos substratos e os principais tecidos de expressão das PDE	27
Tabela 2. Composição da dieta padrão (P) e da dieta hiperlipídica (HL)	35
Tabela 3. Tamanhos das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta para os sistemas lipídicos nanoestruturados	47
Tabela 4. Peso corporal (g) e Δ peso corporal (g) dos animais alimentados com dieta P ou HL e tratados com água, SLN-G ou SLN-C.	48
Tabela 5. Massas de fígado, rins, coração e músculos <i>gastrocnemius</i> (mg/mm de tíbia) de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 e 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 e 2,0 mg/kg).....	54
Tabela 6. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com roflumilast (0,5 e 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 e 2,0 mg/kg).....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

1,1,3,3-TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
ALT	Alanina aminotransferase
Akt	Proteína quinase B
ASC	Área sob a curva
ATP	Adenosina trifosfato
AMPc	Adenosina 3,5-monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
CAT	Catalase
CEL	N-(carboxietil) lisina
CML	N-(carboximetil) lisina
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doenças cardiovasculares
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DRC	Doença renal crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ERC	Espécies reativas carbonílicas
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GC	Guanilato ciclase
GLP-1	Peptídeo-1 semelhante ao glucagon
GMPc	Guanosina 3,5-monofosfato cíclico
GOLD	Dímero de lisina derivado de glioxal
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade

HED	Dose equivalente para humanos
HNE	4-hidroxi-trans-2-nonenal
IPD	Índice de polidispersão
IR	Receptor de insulina
IRS1	Substrato do receptor de insulina tipo 1
ITT	Teste de tolerância à insulina
km	fator de correção para o cálculo de HED
MDA	Malondialdeído
MOLD	Dímero de lisina derivado de metilglioxal
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NO	Óxido nítrico
Nox	NADPH oxidases
NBT	<i>Nitroblue tetrazolium</i>
NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NRF 2	Fator nuclear eritróide 2
ONU	Organização das Nações Unidas
PDE	Fosfodiesterase
PGC1-α gama	Co-ativador-1-alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc ou proteína quinase A
PKG	Proteína quinase G
PON 1	Paraoxonase 1
PPARγ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
RAGE	Receptor de AGEs
RE	Retículo endoplasmático
RFM	Roflumilast
SIRT 1	Sirtuína 1

SLN	Sistema lipídico nanoestruturado
SOD	Superóxido dismutase
T2DM	Diabetes mellitus tipo 2
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDL	Tadalafil
TGF-β	Fator de crescimento transformador- β
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TTGO	Teste de tolerância à glicose oral
UCP1	Proteína desacopladora 1

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1. Obesidade e resistência à insulina.....	20
2.2. Estresse oxidativo	21
2.3. Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)	23
2.4. Fígado	24
2.5. Rins	25
2.6. Fosfodiesterases.....	26
2.6.1. Inibidores de fosfodiesterases	29
2.7. Reposicionamento de fármacos	31
2.8. Nanopartículas	32
3. OBJETIVO GERAL	33
3.1. Objetivos específicos	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Equipamentos	34
4.2. Desenho experimental.....	34
4.2.2.1 Caracterização do sistema lipídico nanoestruturado	40
4.3. Teste de tolerância à glicose oral (TTGO) e teste de tolerância à insulina (ITT)	40
4.4. Finalização do experimento	41

4.5. Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídeos e das disfunções hepática e renal	41
4.6. Biomarcadores de peroxidação lipídica: determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	42
4.7. Atividade da enzima paraoxonase (PON 1) no plasma.....	43
4.8. Biomarcadores de glicação avançada: estimativa dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no plasma, fígado e rins	44
4.9. Atividades das enzimas antioxidantes em fígado e rins	44
4.9.2 Atividade da catalase	45
4.9.3 Atividade da glutathione peroxidase.....	45
4.9.4 Atividade da superóxido dismutase.....	45
4.10. Dosagem de proteínas totais em plasma e sobrenadantes de fígado e rins	46
4.11. Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1.1. Caracterização do veículo.....	47
5.1.2. Comparativo de peso corporal ao longo das 14 semanas de experimento	47
5.2. Experimento definitivo	48
5.2.1. Ingestão alimentar e energética	48
5.2.2. Evolução de peso corporal	50
5.2.3. Massas de tecidos	52
5.2.4. Parâmetros bioquímicos plasmáticos	55
5.2.5. Teste de tolerância à glicose oral.....	56
5.2.6. Teste de sensibilidade à insulina	57
5.2.7. Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e ao potencial antioxidante no plasma	58
5.2.8. Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante no fígado.....	61

5.2.9. Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante nos rins.....	64
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO.....	75
8. REFERÊNCIAS	76
9. ANEXO 1: Protocolo CEUA/FCF/CAR: 24/2017	89

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma constante preocupação para os sistemas de saúde em todo o mundo. Nesse sentido, em 2015, a Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu as 17 Metas de Desenvolvimento Sustentável (SDG, *Sustainable Development Goals*). Entre as pautas de saúde, há uma discussão sobre a obesidade e alguns objetivos foram estabelecidos, até 2030: não haver aumento no número de crianças com sobrepeso, diminuir o consumo de sódio da população, conter o aumento no número de casos de diabetes e obesidade, entre outros (*United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Sustainable Development*, 2015).

Além de ser uma doença não transmissível, a obesidade, quando não controlada, pode aumentar o risco para a ocorrência de outros tipos de doenças não transmissíveis, responsáveis por um grande número de mortes e internações, incluindo as doenças cardiovasculares (DCV) e o diabetes mellitus do tipo 2 (T2DM). O tratamento e o acompanhamento dessas doenças crônicas geram gastos exorbitantes para os sistemas de saúde em todo o mundo (*World Obesity*, 2020).

Para o ano de 2025, estima-se que existirão aproximadamente 700 milhões de indivíduos obesos no mundo (Abeso, 2018). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, os casos de obesidade cresceram 67,8% no período entre 2006 e 2018 (Ministério da Saúde, 2019).

Diversos fatores contribuem para explicar o aumento na prevalência da obesidade. Causas genéticas existem, entretanto estas são mais relevantes quando associadas com mudanças no estilo de vida que favorecem o aumento de peso corporal. Hábitos importantes a se considerar são o aumento da ingestão calórica, com aumento no consumo de carboidratos de alto índice glicêmico e de gorduras saturadas, e a diminuição no gasto energético, já que a sociedade moderna tem adquirido hábitos cada vez mais sedentários (González-Muniesa *et al.*, 2017).

Convencionalmente, o tratamento de obesidade tem como um dos principais objetivos a diminuição do peso corporal, visando o controle dos sintomas e a reversão desse quadro, além do tratamento de comorbidades e complicações existentes (Blüher, 2015). Por ser a obesidade uma doença crônica multifatorial, a qual leva as mais variadas disfunções metabólicas, com a sua evolução poderiam ser também utilizadas outras estratégias terapêuticas. Atualmente, diversos estudos estão sendo realizados no sentido de compreender os efeitos dos fármacos pertencentes à classe

dos inibidores de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos sobre as alterações observadas na obesidade e nas comorbidades relacionadas, tais como a síndrome metabólica e o T2DM (Waddleton *et al.*, 2008; Kuno *et al.*, 2011; Vollert *et al.*, 2012; Santi *et al.*, 2015; Möllman *et al.*, 2016).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Obesidade e resistência à insulina

A obesidade é definida como o aumento desproporcional de peso corporal devido ao desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético, culminando no aumento da deposição de gorduras nos tecidos adiposos (Montanari *et al.*, 2017). O estabelecimento de resistência à insulina na obesidade advém de diversos fatores: (i) quadro de inflamação crônica de baixo grau, que se inicia nos tecidos adiposos e fígado, ocorrendo elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias e de importantes mediadores da inflamação que inibem componentes da sinalização insulínica, incluindo o receptor de insulina (IR) e o substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), bem como inibem a síntese de triacilgliceróis e o armazenamento de lipídeos via inibição de PPAR γ (receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama, *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) e estimulam a lipólise, levando a um aumento nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres que causam lipotoxicidade, também prejudicial à sinalização da insulina; (ii) disfunção mitocondrial, decorrente da sobrecarga de trabalho da mitocôndria, causando diminuição de sua função e, conseqüentemente, acúmulo de ácidos graxos livres e glicose devido à prejuízos na oxidação destes nutrientes; (iii) hiperinsulinemia, que apesar de ser consequência da resistência à insulina, também pode via *feedback* negativo inibir a via de sinalização insulínica (Ye, 2013).

Outro processo importante que pode resultar em resistência à insulina durante a obesidade é o estresse de retículo endoplasmático (RE), devido ao acúmulo de lipídeos nas células hepáticas e ao aumento da síntese secretória de proteínas, especialmente devido à alta demanda biossintética de insulina pelo pâncreas (Özcan *et al.*, 2004; Nissar e Tasduq, 2015). O estresse do RE pode inibir a ação da insulina por causar diminuição na fosforilação dos resíduos de tirosina em IRS-1 após a estimulação pela ligação da insulina (Özcan *et al.*, 2004; Nissar e Tasduq, 2015).

2.2. Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas nos mais diversos processos celulares. A espécie reativa mais abundante e relevante nos processos redox é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Sies e Jones, 2020). O H_2O_2 é produto de reações de uma grande variedade de enzimas, sendo produzido principalmente pela ação de NADPH oxidases (Nox), bem como na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, no retículo endoplasmático e nos peroxissomos. O ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) é a segunda ERO de maior relevância e também pode ser gerado pelas Nox e pela cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (Sies e Jones, 2020; Rives *et al.*, 2020) (Figura 1).

A ERO mais reativa é o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), gerado a partir do H_2O_2 nas reações de Fenton e Haber-Weiss, conforme descrito na Figura 2. O $\cdot\text{OH}$ é um oxidante inespecífico, pode desencadear a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e esteróis, resultando na formação do radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$), processo denominado peroxidação lipídica (Figura 2). Os produtos gerados são conhecidos como espécies reativas carbonílicas (ERC) e incluem malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE) (Sies e Jones, 2020).

Em condições de homeostase redox, há uma série de mecanismos que impedem as ERO de danificarem as biomoléculas, com ênfase na atividade de enzimas antioxidantes. As principais enzimas antioxidantes são catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). A SOD catalisa a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , o qual é convertido a água (H_2O) e oxigênio (O_2) por ação da SOD (Figura 2) ou da GSH-Px (Rives *et al.*, 2020).

Outra importante classe de enzimas com atividade antioxidante são as paraoxonases (PON) (Furlong *et al.*, 2016). Existem três isoformas de PON, denominadas de PON 1 a 3. A PON 1 circula na corrente sanguínea ligada à lipoproteína de alta densidade (HDL, *high density lipoprotein*) e pode hidrolisar lactonas, tiolactonas, aril-ésteres e organofosfatos. A PON 1 é fundamental na prevenção da aterosclerose, pois impede que a lipoproteína de baixa densidade (LDL, *low density lipoprotein*) seja oxidada. Já a PON 2 localiza-se nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático de tecidos que incluem fígado, cérebro, rins, coração, pâncreas e intestino, bem como nas células endoteliais e células de músculo liso da aorta. Assim como a PON 1, a PON 3 pode ser encontrada associada à HDL, mas

também está localizada nos pulmões, fígado, pâncreas, intestino e olhos (Kotur-Stevuljević *et al.*, 2020; Priyanka *et al.*, 2019; Wysocka e Zwolak, 2021).

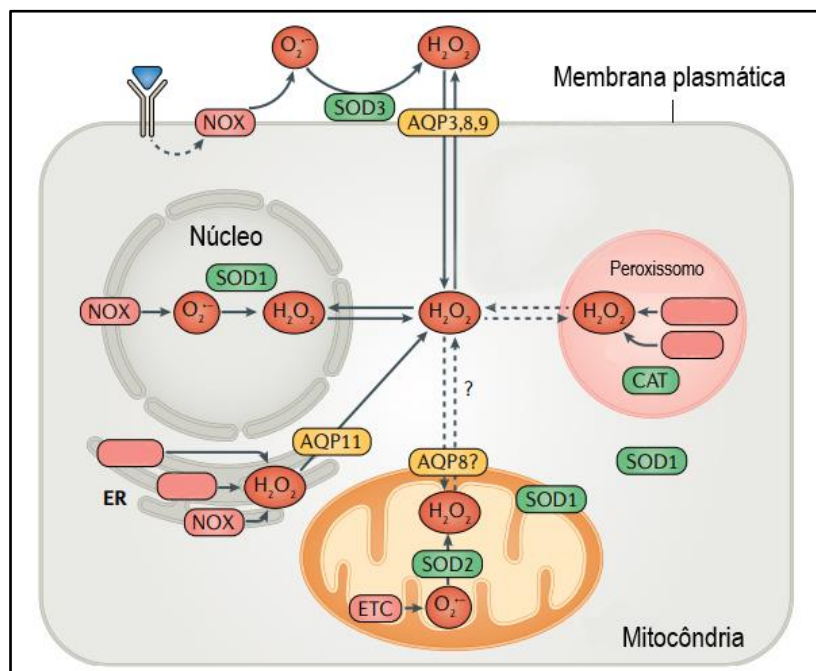


Figura 1. Principais organelas envolvidas na geração de ERO intracelular e localização das enzimas antioxidantes. AQP: canais de aquaporina / peroxiporinas; CAT: catalase; ER: retículo endoplasmático, (*endoplasmic reticulum*); ETC: cadeia transportadora de elétrons (*electron transport chain*); Nox: NADPH oxidases; SOD: superóxido dismutase. **Fonte:** adaptado de Sies e Jones, 2020.

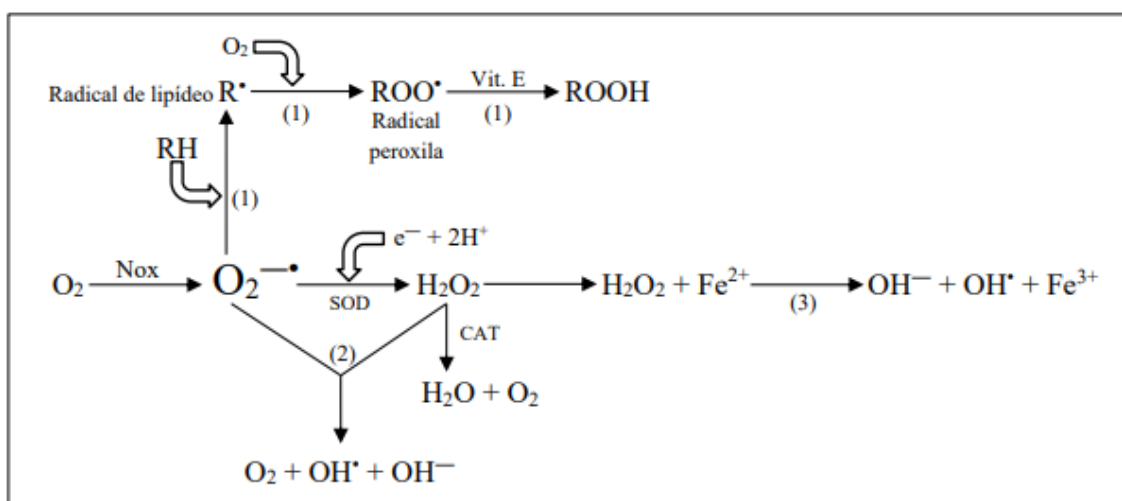


Figura 2. Reações de formação de ERO e ação das enzimas antioxidantes CAT e SOD. (1) Lipoperoxidação; (2) reação de Haber-Weiss; (3) reação de Fenton; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; Nox: NADPH oxidase neutrofílica. **Fonte:** Romão, 2016.

O estresse oxidativo é estabelecido quando as defesas antioxidantes do organismo não são suficientes para neutralizar a formação excessiva das ERO. A oxidação de biomoléculas, como proteínas e lipídeos, pode levar a perda de sua função. O excesso de ERO pode, por exemplo, danificar o DNA, causando mutagênese e câncer (Sies e Jones, 2020).

O estresse oxidativo também contribui para a gênese da resistência à insulina, já que as ERO culminam na ativação da enzima c-Jun N-terminal quinase (JNK), que inibe a cascata de sinalização insulínica por estimular a fosforilação de IRS-1 em serina (fosforilação inibitória) (Onyango, 2020).

2.3. Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)

A associação entre os elevados níveis glicêmicos e condições de estresse glico-oxidativo por longos períodos é extremamente prejudicial, pois leva à produção de substâncias nocivas às atividades celulares (Giacco e Brownlee, 2010). Tais substâncias são denominadas produtos finais de glicação avançada (AGEs, *advanced glycation end products*).

A glicação de proteínas ocorre quando grupos carbonilas de monossacarídeos condensam-se com grupos amino primário de proteínas, gerando bases de Schiff, que se rearranjam em produtos de Amadori (reação de Maillard) (Bierhaus *et al.*, 1998). Os produtos de Amadori podem ser convertidos em dicarbonilas altamente reativas: glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona. Estas dicarbonilas, após reagirem com determinados resíduos de aminoácidos em proteínas, levam à formação de diversos AGEs, sendo os mais conhecidos N-carboximetil lisina (CML), N-carboxietil lisina (CEL), dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD) e metilglioxal (MOLD), arg-pirimidina, pirralina, pentosidina e vesperlisinas (Nowotny *et al.*, 2015).

Vale destacar que não somente os produtos de Amadori são responsáveis pela formação de AGEs, mas também a clivagem de compostos dicarbonílicos advindos da auto-oxidação de monossacarídeos (glicose, frutose, ribose, gliceraldeído) e produtos da degradação de aminoácidos e lipídeos. As espécies reativas carbonílicas provenientes da lipoperoxidação também podem levar à formação de AGEs (Ott *et al.*, 2014).

A formação de ligações cruzadas entre proteínas é uma das principais características atribuídas aos AGEs. Um grande número de modificações promovidas

por AGEs ocorre também em proteínas intracelulares, bem como em proteínas de matriz extracelular (Kasper e Funk, 2001). Tais modificações prejudicam as estruturas das proteínas bem como sua funcionalidade, contribuindo para a perda de função das biomoléculas e precedendo o estabelecimento das complicações diabéticas (Abbas *et al.*, 2016).

2.4. Fígado

No fígado, é comum observar um acúmulo de gordura em decorrência da obesidade, o qual está amplamente relacionado ao desenvolvimento de resistência à insulina. Esta resistência, por sua vez, juntamente com a hiperinsulinemia, retroalimenta o acúmulo de gorduras no tecido hepático (Tilg *et al.*, 2016; Sanders e Griffin, 2016). A ingestão energética excessiva pode levar ao acúmulo de lipídeos no fígado via outros mecanismos; se for estabelecida resistência à insulina nos músculos, o armazenamento de energia pós-prandial, que seria na forma de glicogênio muscular, passa a ser na forma de lipídios no tecido hepático (Tilg *et al.*, 2016). Quando há excesso de carboidratos, especialmente, ocorre no fígado o processo de lipogênese *de novo*, o qual utiliza produtos da via glicolítica e da descarboxilação do piruvato para a síntese de ácidos graxos. Este processo pode ser aumentado em casos de hiperinsulinemia, já que a insulina estimula a lipogênese (Sanders e Griffin, 2016). Uma dieta rica em lipídios pode também causar acúmulo de triacilgliceróis no fígado (Oakes *et al.*, 1997). O depósito de triacilgliceróis no fígado pode ser resultado da ação de intermediários tóxicos gerados pelo metabolismo de lipídios, tal como o diacilglicerol (DAG) (Tilg *et al.*, 2016). Os DAG por sua vez também sabidamente promovem prejuízos à sinalização insulínica, especialmente via ativação da proteína quinase C ϵ (Samuel *et al.*, 2004; Gassaway *et al.*, 2018; Birkenfeld e Shulman, 2014).

A resistência à ação da insulina é prejudicial não apenas aos tecidos tradicionalmente sensíveis a este hormônio, como músculo esquelético, fígado, pâncreas e tecido adiposo. Há uma liberação compensatória de insulina na corrente sanguínea (hiperinsulinemia) para atender às ações da insulina necessárias nesses órgãos alvo. No entanto, em alguns tecidos, a elevação dos níveis de insulina resulta em ativação excessiva de vias de sinalização de fatores de crescimento dependentes de insulina, podendo causar, por exemplo, hipertrofia e fibrose (Whaley-Connell e Sowers, 2018).

2.5. Rins

Os rins são extremamente dependentes da atividade mitocondrial, já que suas funções no organismo são de alta demanda energética: promovem a filtração do plasma, realizam reabsorção de nutrientes, regulam o balanço de eletrólitos e fluidos, mantêm a homeostase ácido-base e regulam a pressão arterial (Bhargava e Schnellmann, 2017). Quando há resistência à insulina, como na obesidade e no T2DM, ocorre acúmulo de glicose e ácidos graxos, há um desbalanço entre a quantidade de ERO geradas via oxidação dessas moléculas e as defesas antioxidantes na mitocôndria, causando queda na produção de ATP (adenosina trifosfato) e aumento de apoptose (Bhargava e Schnellmann, 2017).

Conforme descrito anteriormente, a obesidade contribui para a ocorrência de lipotoxicidade e gera um quadro de inflamação crônica, com liberação de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, os AGEs se ligam aos RAGE nos rins, desencadeando vias de processos inflamatórios pela ativação do fator de transcrição NFκB (*nuclear factor kappa B*). A combinação entre ambiente pró-oxidativo e inflamação causa danos à estrutura renal, culminando na progressiva e contínua perda de sua função (Inácio *et al.*, 2020)

Um tipo de alteração histológica que pode ocorrer na obesidade é a glomerulomegalia, que consiste no aumento anormal do glomérulo renal, e pode evoluir para glomeruloesclerose (Hughson *et al.*, 2011). Este aumento de volume do glomérulo está relacionado com um aumento da velocidade de filtração glomerular devido à sobrecarga de moléculas a serem excretadas pelos rins em consequência da resistência insulínica (Tomino *et al.*, 2011). Se não tratada, esse tipo de injúria renal pode evoluir para a doença renal crônica (DRC) ou, no caso do DM, para nefropatia diabética. Esta é caracterizada por albuminúria, acúmulo extracelular de proteínas de matriz extracelular e hipertrofia tubular epitelial e glomerular. Ao contrário da elevada velocidade de filtração glomerular observada nos estágios iniciais de desenvolvimento da doença, na fase crônica ocorre o contrário, diminuição da velocidade de filtração glomerular (Bhargava e Schnellmann, 2017).

2.6. Fosfodiesterases

As fosfodiesterases (PDE) constituem uma classe de enzimas que hidrolisam os nucleotídeos cíclicos do tipo adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc), gerando os produtos não cíclicos 5'-AMP e 5'-GMP, respectivamente. Ambos AMPc e GMPc são segundos mensageiros envolvidos na regulação de diversos processos metabólicos (Seifert *et al.*, 2015). A inibição de PDE leva ao aumento nas concentrações intracelulares de AMPc e GMPc, prolongando os efeitos biológicos desencadeados por esses segundos mensageiros.

A classe de PDE é subdividida em 11 famílias, distribuídas pelos diferentes tipos celulares do organismo (Maurice *et al.*, 2014). Cada subfamília é composta por diferentes isoformas (Tabela 1), que apresentam propriedades catalíticas únicas, bem como diferente localização intracelular: cada isoforma de PDE ocupa um compartimento celular específico. As diferentes famílias de PDE também apresentam especificidades distintas aos substratos AMPc e/ou GMPc (Francis *et al.*, 2011, Baillie *et al.*, 2019).

Tabela 1. Famílias de fosfodiesterases, seus respectivos substratos e os principais tecidos de expressão das PDE.

Fosfodiesterase / Genes	Substratos	Principais tecidos
PDE 1 A, B C	Ca ²⁺ /calmodulina AMPc e GMPc	Coração, neurônios centrais e periféricos, pulmão, músculo liso, células linfoides e mieloides
PDE 2 A	AMPc e GMPc	Cérebro, coração, fígado, pulmão, córtex da adrenal, endotélio e plaquetas
PDE 3 A, B	AMPc e GMPc	Coração, pulmão, fígado, tecidos adiposos, células-beta pancreáticas, endotélio, epitélio, plaquetas
PDE 4 A, B, C, D	AMPc	Células do sistema cardiovascular, nervoso, imune e inflamatório, fígado, pulmão e rins, músculo liso, células endoteliais
PDE 5 A	GMPc	Pulmão, cérebro, plaquetas, rins, músculo vascular liso, endotélio, tecidos gastrointestinais, pênis
PDE 6 A, B, C	GMPc	Fotoreceptores e glândula pineal
PDE 7 A, B	AMPc	Baço, cérebro, pulmões, rins, músculo esquelético, pâncreas, coração, células mieloides e linfoides
PDE 8 A, B	AMPc	Testículos, tireoide, fígado, músculo esquelético, coração, rins, ovários, cérebro, linfócitos T
PDE 9 A	GMPc	Baço, cérebro, células intestinais, rins, fígado, pulmões.
PDE 10 A	AMPc e GMPc	Cérebro e testículos
PDE 11 A	AMPc e GMPc	Músculo esquelético, rins, fígado, próstata, testículos e glândulas salivares e pituitária.

Fonte: Boswell-Smith *et al.*, 2006; Keravis e Lugnier, 2012; Maurice *et al.*, 2014; Epstein *et al.*, 2021.

PDE 4 hidrolisa especificamente AMPc (Figura 3) e está presente em diversos tipos celulares. O uso de inibidores de PDE 4 pode ser benéfico para o tratamento de doenças multifatoriais, incluindo a obesidade, pois o aumento na concentração de AMPc afeta uma variedade de processos metabólicos: em macrófagos, células dendríticas e células T-regulatórias, ocorre inibição da inflamação; há um aumento da lipólise em tecido adiposo branco e aumento de termogênese em tecido adiposo marrom; no fígado ocorre diminuição na deposição de lipídeos; no pâncreas ocorre um aumento na produção e secreção de insulina (Wu e Rajagopalan, 2016).

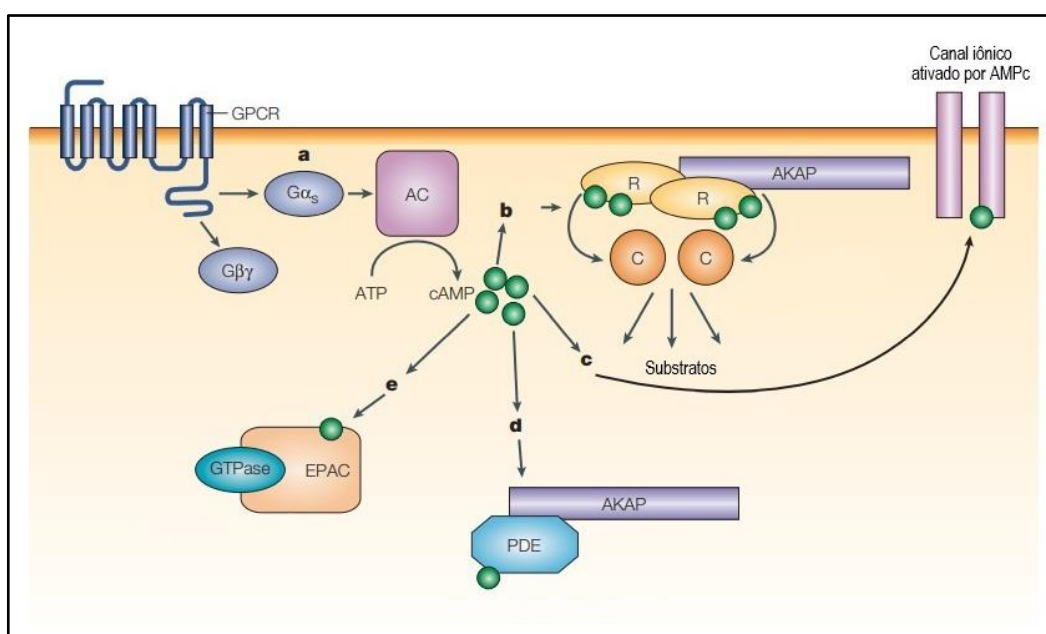


Figura 3. Via de sinalização do AMPc. **a:** a subunidade $G\alpha_s$ da proteína G ativa a enzima adenilato ciclase (AC), a qual converte ATP a AMPc; **b:** o AMPc se liga às subunidades regulatórias (R) da proteína quinase A (PKA), liberando as subunidades catalíticas (C) da enzima; **c:** ativação de canais iônicos por AMPc; **d:** fosfodiesterases (PDE, *phosphodiesterase*); **e:** EPAC (*exchange protein activated by cAMP*). AKAP: *A-kinase anchoring protein*. **Fonte:** adaptado de Wong e Scott, 2004.

PDE 5 hidrolisa GMPc, e está presente em quantidades expressivas no tecido vascular liso, células endoteliais, rins, entre outros tecidos (Boswell-Smith *et al.*, 2006; Keravis e Lugnier, 2012; Maurice *et al.*, 2014).

O GMPc é produzido a partir do GTP pela enzima guanilato ciclase (GC), que se apresenta em duas formas: transmembrana e citoplasmática (GCs). A GC, por sua vez, pode ser ativada por óxido nítrico (NO). O principal componente celular ativado por GMPc é a proteína quinase G (PKG), que propaga a sinalização da via NO-GMPc por fosforilar resíduos de serina ou treonina de uma série de efetores intracelulares

(Pfeifer, 2013; Klinger e Kadowitz, 2017) (Figura 4). No músculo liso, por exemplo, a ativação desta via nas células endoteliais leva ao relaxamento da musculatura.

Essa via de sinalização é particularmente prejudicada quando, na obesidade, há hiperglicemia e geração exacerbada de ERO e AGEs. É, portanto, estabelecida a disfunção endotelial, que se caracteriza pelo prejuízo da ação das enzimas eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e sGC (guanilato ciclase citoplasmática), culminando na diminuição da produção de óxido nítrico e GMPc, respectivamente. (Pfeifer *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2021).

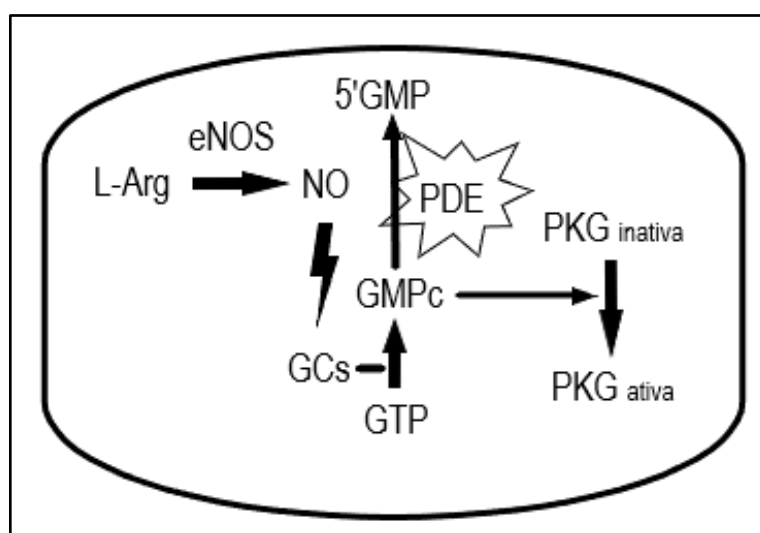


Figura 4. Via de sinalização do GMPc. L-Arg: L-Arginina; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; NO: óxido nítrico; GCs: guanilato ciclase citoplasmática; GTP: guanosina trifosfato; GMPc: guanosina monofosfato cíclico; 5'GMP: guanosina monofosfato (forma não cíclica); PDE: fosfodiesterase; PKG: proteína quinase G. **Fonte:** autoria própria, 2021.

2.6.1. Inibidores de fosfodiesterases

Em revisão de Wahlang *et al* (2018), é possível encontrar diversos estudos acerca dos efeitos que o aumento da concentração de AMPc provoca no fígado, tecido chave no processo de regulação do metabolismo energético. As vias sinalizatórias desencadeadas por AMPc podem levar à diminuição na produção e no acúmulo de lipídeos no fígado. Isto foi observado em estudo de Zhang *et al* (2015), que demonstraram que o resveratrol promoveu melhora em quadro de esteatose hepática, por inibir PDE 4.

Um inibidor de PDE 4 comumente utilizado é o roflumilast, prescrito para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e asma (Lin *et al.*, 2016). Estudo de Wouters *et al* (2012) demonstrou que roflumilast possui efeitos benéficos sobre a homeostase de glicose, diminuindo os níveis de hemoglobina glicada e a glicemia de jejum em pacientes diabéticos.

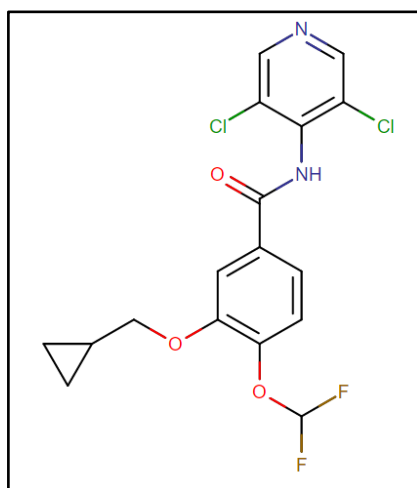


Figura 5. Estrutura química do roflumilast. **Fonte:** Drugbank, 2021.

Os inibidores de PDE 5 são menos estudados acerca de seus efeitos sobre desordens metabólicas em comparação aos inibidores de PDE 4. Um grupo de pesquisa médica da Vanderbilt University Medical Center vem conduzindo um estudo clínico desde 2016 para verificar os efeitos do tratamento por 12 semanas com tadalafil (20 mg) em indivíduos obesos, avaliando principalmente os efeitos deste inibidor de PDE 5 no gasto energético, na sensibilidade e secreção de insulina e sobre o risco cardiometabólico; o estudo tinha previsão de término para 2020, porém foi suspenso devido à pandemia de COVID-19. Mas já é um indicativo da importância que o estudo com inibidores de fosfodiesterase vem ganhando. (U.S. National Library of Medicine, ClinicalTrials.gov, NCT02819440).

O tadalafil é um inibidor de PDE 5, utilizado para o tratamento de disfunção erétil via promoção de relaxamento da musculatura lisa através do aumento dos níveis de GMPc e óxido nítrico (Schwartz *et al.*, 2013). Também tem sido indicado para os tratamentos de hipertensão arterial pulmonar e hiperplasia prostática benigna (Maurice *et al*, 2014).

2.8. Nanopartículas

Visto que roflumilast é insolúvel em água (0.52-0.56 mg/L a 22°C, experimental, Drugbank, 2021) e que tadalafil também é praticamente insolúvel em água (220 mg/L a 25°C, teórica, Drugbank, 2021), estes fármacos podem ter sua veiculação facilitada via utilização de sistemas lipídicos nanoestruturados (SLN). Em relação ao tadalafil, estudos já foram realizados com o objetivo de melhorar sua solubilidade e, conseqüentemente, a biodisponibilidade, através do uso de dispersões sólidas (Choi *et al.*, 2017), sistema de *delivery* auto-nanoemulsionante (El-Badry *et al.*, 2014), entre outros.

As nanopartículas têm sido cada vez mais utilizadas conforme o desenvolvimento farmacotécnico avança, seja na indústria de cosméticos, vacinas, medicamentos quimioterápicos, entre muitas outras aplicações. Nanopartículas variam de 10 a 1000 nm e, por estar na escala nanométrica, conferem características aos fármacos encapsulados, como: aumento da biodisponibilidade, liberação controlada, solubilização e liberação próxima ao local de ação (Singh e Lillard, 2009).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos tratamentos de camundongos em sistema-modelo *in vivo* de obesidade e resistência à insulina com roflumilast (inibidor de PDE 4) ou tadalafil (inibidor de PDE 5), veiculados em sistema lipídico nanoestruturado (SLN), sobre as alterações fisiometabólicas e biomarcadores do estresse glico-oxidativo, com ênfase nos seguintes tecidos: plasma, fígado e rins.

3.1. Objetivos específicos

Em camundongos submetidos ao sistema-modelo *in vivo* de obesidade e resistência à insulina (oferta de dieta hiperlipídica por 16 semanas), avaliar os efeitos do tratamento por 8 semanas com roflumilast (inibidor de PDE 4) ou com tadalafil (inibidor de PDE 5), veiculados em sistema lipídico nanoestruturado (SLN), monitorando:

- Evolução de peso corporal e da ingestão alimentar;
- Massas dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal, bem como do tecido adiposo marrom interescapular;
- Massas de coração, fígado, rins e músculo esquelético *gastrocnemius*;
- Tolerância à glicose oral e sensibilidade à insulina;
- Níveis de marcadores bioquímicos plasmáticos: colesterol total, colesterol-HDL, triacilgliceróis, albumina, alanina aminotransferase (ALT) e ácido úrico;
- Níveis de biomarcadores de lipoperoxidação (TBARS) em plasma, fígado e rins;
- Níveis de biomarcadores de glicação avançada (AGEs fluorescentes) em plasma, fígado e rins;
- Atividade da enzima antioxidante PON 1 no plasma;
- Atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px em fígado e rins.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados nesse estudo foram: espectrofotômetro PowerWave XS2, BioTek®; espectrofluorímetro Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek®; glicosímetro Abbott Freestyle Optium®.

4.2. Desenho experimental

4.2.1. Experimento piloto: definição do sistema lipídico nanoestruturado mais adequado à incorporação de roflumilast ou tadalafil

O desenvolvimento dos veículos para incorporação de roflumilast ou tadalafil foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Marlus Chorilli, do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFAr. Foram avaliados dois sistemas lipídicos nanoestruturados (SLN) produzidos conforme descrito por de Freitas *et al.* (2014).

O **SLN-C** foi constituído de 5% de colesterol como fase oleosa, 10% de uma mistura de tensoativo (Brij O20 + fosfatidilcolina de soja (2:1)) e 85% de tampão fosfato pH 7,4 como fase aquosa. O **SLN-G** continha a mesma composição aquosa e de tensoativos, porém, 5% de óleo de girassol como fase oleosa.

Para cada SLN, a mistura foi sonicada com um sonificador de haste (Q500 de QSonica®, Newtown, CT, EUA), com potência de 500 watts, em modo descontínuo, durante 25 minutos com um intervalo de 30 segundos a cada minuto, com banho de gelo durante todo o processo de sonicação. Posteriormente, cada SLN foi centrifugado a 11.180 g durante 15 minutos para eliminar partículas liberadas pela haste de titânio.

Para o estudo de avaliação do veículo e seus impactos *in vivo*, foram utilizados camundongos C57BL/6/JUnib (4 semanas de idade) provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) – UNICAMP, Campinas, SP. Eles permaneceram no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAr) da UNESP durante todo o experimento e foram mantidos em caixas de polipropileno

(3 animais por caixa), em condições de ciclo luz-escuro de 12 horas e temperatura de 23°C.

Quando atingiram o peso de 22 gramas, após período de adaptação de duas semanas recebendo ração comercial Labina (Presence®) e água *ad libitum*, os animais passaram a ser alimentados durante 14 semanas com dieta preparada padrão (P; 3,85 kcal/g, 4%) ou hiperlipídica (HL; 5,40 kcal/g, 35% de lipídeos) (Tabela 2), provenientes da Pragsoluções Biociências, Domeneghetti & Corrêa LTDA - Jaú/SP.

Tabela 2. Composição da dieta padrão (P) e da dieta hiperlipídica (HL).

Ingredientes	Dieta Padrão (P) (g/100g)	Dieta Hiperlipídica (HL) (g/100g)
Amido	42,75	14,95
Caseína	20	20
Dextrina	13,2	10
Sacarose	10	10
Óleo de soja	4	4
Banha	--	31
Celulose	5	5
Mix de minerais ⁽¹⁾	3,5	3,5
Mix de vitaminas ⁽²⁾	1	1
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Total	100	100

(1) Mix de minerais: cálcio, fósforo, potássio, magnésio, ferro, manganês, selênio, zinco, cromo, níquel, lítio, enxofre, cobre, iodo, molibdênio, silício, cloreto, fluoreto, boro, vanádio.

(2) Mix de vitaminas: ácido nicotínico, pantotenato de cálcio, piridoxina, tiamina, riboflavina, ácido fólico, vitamina K, D-biotina, vitamina B12, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, colina.

Após a sétima semana de oferta das dietas, os animais foram subdivididos nos grupos descritos abaixo. Os veículos foram administrados por via oral (gavagem), diariamente entre 8:00 e 9:00 horas, durante 7 semanas consecutivas. Ao longo das 14 semanas de experimento, peso corporal e ingestão alimentar foram monitorados duas vezes por semana.

Para o estudo de avaliação do veículo e seus impactos *in vivo*, foi conduzido um experimento com os seguintes grupos (6 animais/grupo):

1. PA: animais alimentados com dieta P que receberam água;
2. PSLN-G: animais alimentados com dieta P que receberam SLN-G;
3. PSLN-C: animais alimentados com dieta P que receberam SLN-C;
4. HLA: animais alimentados com dieta HL que receberam água;
5. HLSLN-G: animais alimentados com dieta HL que receberam SLN-G;
6. HLSLN-C: animais alimentados com dieta HL que receberam SLN-C.

Após 14 semanas ocorreu a eutanásia dos animais, que após 6 horas de jejum foram anestesiados com xilazina (16 mg/kg; Anasedan®) e quetamina (90 mg/kg; Dopalen®) para a realização da punção cardíaca e exsanguinação total.

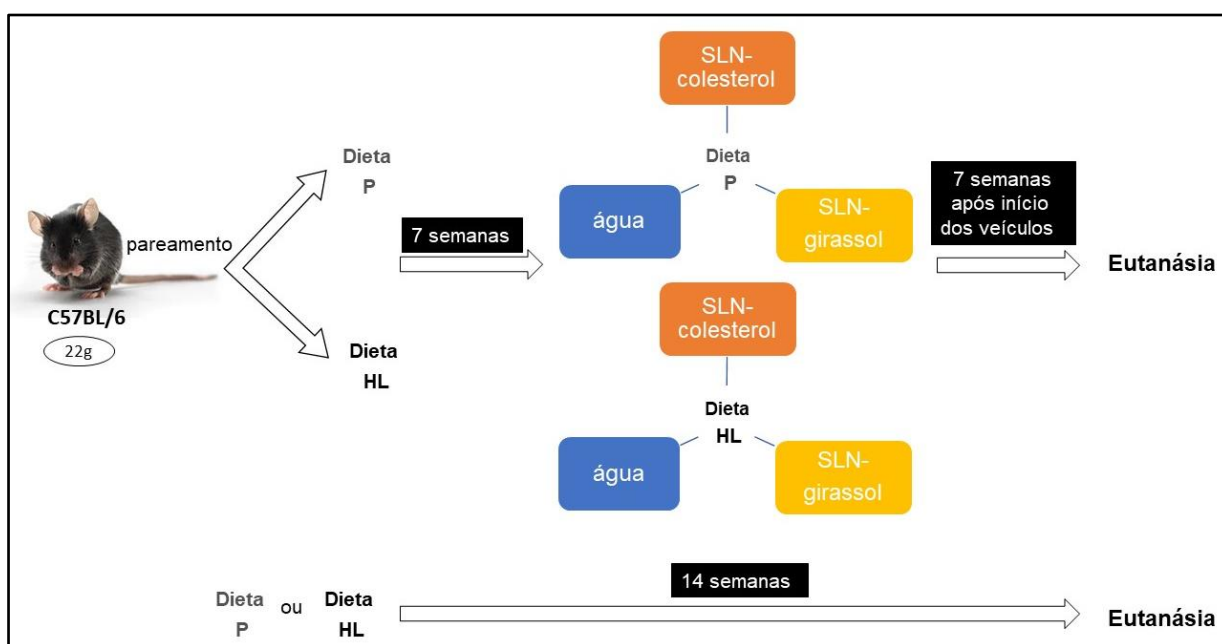


Figura 7. Delineamento experimental do piloto realizado para escolha do sistema lipídico nanoestruturado mais adequado para veiculação dos inibidores de fosfodiesterase. Dieta P: padrão; dieta HL: dieta hiperlipídica; SLN: sistema lipídico nanoestruturado. **Fonte:** autoria própria, 2021.

4.2.2. Experimento definitivo: efeitos de roflumilast e tadalafil sobre as alterações fisio-metabólicas e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em modelo de obesidade e resistência à insulina

Camundongos C57BL/6/JUnib (4 semanas de idade) foram provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) – UNICAMP, Campinas, SP e permaneceram no Biotério do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR) da UNESP durante o experimento.

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno (3 animais por caixa), em condições de ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura de 23°C. Quando atingiram o peso de 22 gramas, após período de adaptação de duas semanas, recebendo ração comercial Labina (Presence®) e água *ad libitum*, os animais passaram a ser alimentados durante 16 semanas com dieta preparada padrão (P; 3,85 kcal/g, 4% de lipídeos) ou hiperlipídica (HL; 5,40 kcal/g; 35% de lipídeos) (Tabela 2), provenientes da Pragsoluções Biociências, Domeneghetti & Corrêa LTDA - Jaú/SP.

Antes do início dos tratamentos, foi realizado um pareamento para composição dos grupos experimentais com base no peso corporal dos animais, de modo que os valores médios iniciais fossem semelhantes para todos os grupos. O pareamento é necessário para a comparação dos efeitos dos tratamentos sobre os animais, em relação aos grupos de animais controle sem tratamento, garantindo que os resultados observados sejam unicamente devido aos tratamentos administrados, sem possíveis vieses experimentais.

Após análise dos resultados do experimento piloto, o SLN escolhido foi o que utilizava como fase oleosa o óleo de girassol. Assim, tanto roflumilast quanto tadalafil foram incorporados em SLN-G, que passaremos a chamar apenas de SLN.

Após a oitava semana de ofertas das dietas, os animais em dieta hiperlipídica foram subdivididos nos grupos HL, HL-SLN, HL-RFM0,5, HL-RFM1,0, HL-TDL1,0 e HL-TDL2,0. Os tratamentos foram administrados por via oral (gavagem), diariamente entre 8:00 e 9:00 horas, durante 8 semanas consecutivas. Ao longo das 16 semanas de experimento, peso corporal e ingestão alimentar foram monitorados duas vezes por semana.

O experimento foi realizado com 7 grupos (15 animais/grupo):

1. Grupo P: animais alimentados com dieta P que receberam água;
2. Grupo HL: animais alimentados com dieta HL que receberam água;
3. Grupo HL-SLN: animais alimentados com dieta HL e tratados com SLN;
4. Grupo HL-RFM0,5: animais alimentados com dieta HL e tratados com 0,5 mg/kg de roflumilast;
5. Grupo HL-RFM1,0: animais alimentados com dieta HL e tratados com 1,0 mg/kg de roflumilast;
6. Grupo HL-TDL1,0: animais alimentados com dieta HL e tratados com 1,0 mg/kg de tadalafil;
7. Grupo HL-TDL2,0: animais alimentados com dieta HL e tratados com 2,0 mg/kg de tadalafil.

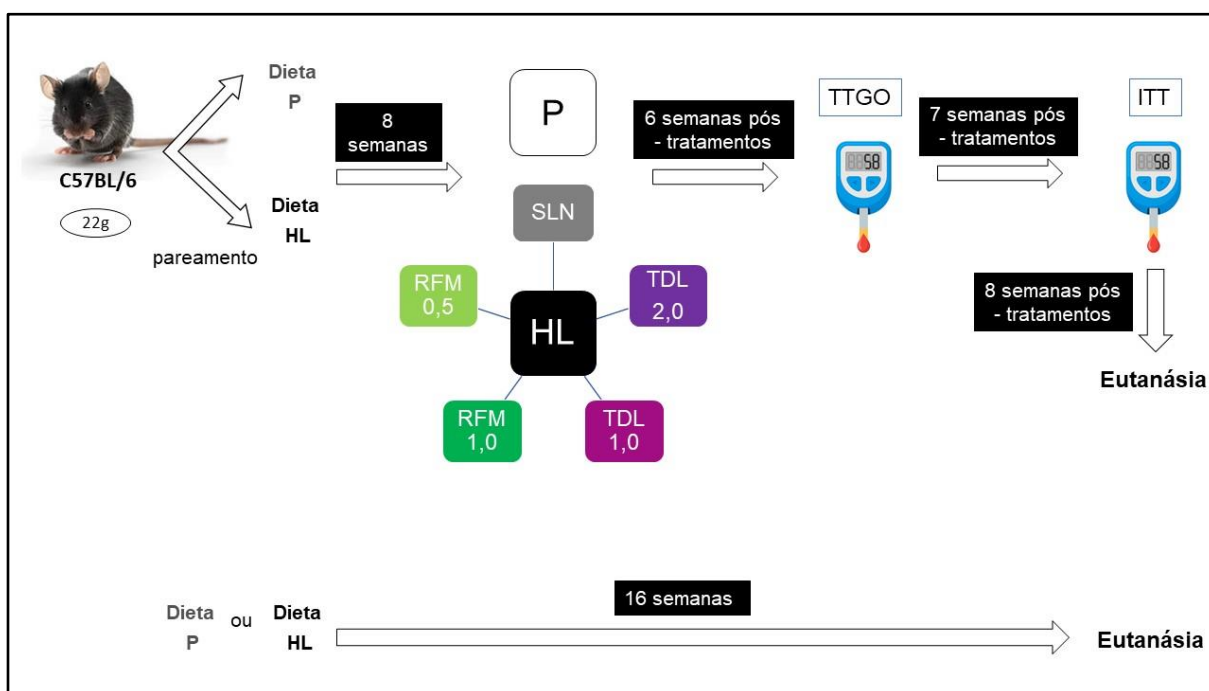


Figura 8. Delineamento do experimento definitivo para avaliação dos efeitos do tratamento por 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg) em animais alimentados com dieta hiperlipídica por 16 semanas. Dieta P: padrão; dieta HL: dieta hiperlipídica; SLN: sistema lipídico nanoestruturado; TTGO: teste de tolerância à glicose oral; ITT: Teste de tolerância à insulina; RFM0,5: roflumilast 0,5 mg/kg; RFM 1,0: roflumilast 1,0 mg/kg; TDL1,0: tadalafi 1,0 mg/kg; TDL2,0: tadalafi 2,0 mg/kg. **Fonte:** autoria própria, 2021.

Os inibidores de fosfodiesterases roflumilast (RFM; SML-1099; pureza $\geq 98\%$) e tadalafil (TDL; SML-1877; pureza $\geq 98\%$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Inc., (St. Louis, Missouri, United States). As doses de 0,5 e 1,0 mg/kg de roflumilast foram selecionadas com base no trabalho de Mollmann *et al.* (2017), que realizaram experimento com camundongos C57BL/6 alimentados com dieta hiperlipídica, por 12 semanas. Roflumilast era veiculado na dieta, na dose de 21 mg/kg de dieta; pelo consumo diário de ração dos animais, pôde-se calcular a massa de fármaco por peso de animal, o qual foi de aproximadamente 1,77 mg/kg. Levou-se em consideração também os estudos de Vollert *et al.* (2012), que administraram roflumilast por 28 dias a camundongos *db/db* e chegaram à conclusão que 3 mg/kg é a dose máxima com efeitos farmacológicos e sem efeitos adversos para tratamentos crônicos.

Como não há estudos com tadalafil em modelo de obesidade e resistência à insulina com camundongos, as doses de 1,0 e 2,0 mg/kg de tadalafil foram selecionadas através do cálculo de extrapolação de dose de animal para humano, baseado na área de superfície corporal (Nair e Jacob, 2016):

$$\text{HED (mg/kg)} = \text{dose animal (mg/kg)} \times \text{km animal} \div \text{km humano}$$

$$\text{km humano} = 37 ; \text{km camundongo} = 3$$

Foram utilizadas como referência as doses já utilizadas de tadalafil em humanos para garantir que não haveria toxicidade aos animais. Quando indicado para o tratamento de hiperplasia prostática benigna, a dose recomendada de tadalafil é de 5 mg. Através do cálculo de conversão de dose, para o camundongo esta dose é equivalente a 1,03 mg/kg. Foi avaliada também a dose de 2,0 mg/kg, equivalente a dose de 10 mg para humanos no tratamento de disfunção erétil (CIALIS® (tadalafil) Product Monograph - Eli Lilly Canada Inc.). Sabe-se que esta dose de tadalafil não é tóxica, pois Seimetz *et al.* (2015) administraram 10 mg/kg de tadalafil a camundongos C57BL/6 durante 6 meses em experimento no qual avaliaram o potencial preventivo do fármaco contra danos provenientes da exposição dos animais à fumaça.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Câmpus de Araraquara, Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 24/2017 (Anexo 1).

4.2.2.1 Caracterização do sistema lipídico nanoestruturado

Tamanho de partículas e índice de polidispersidade (Silva *et al.*, 2009)

O diâmetro das partículas foi determinado pela utilização de um equipamento *Dynamic Light Scattering* (DLS, espalhamento dinâmico de radiação laser) – Brookhaven. Com a temperatura a 20°C e comprimento de onda de 532 nm, o sistema lipídico nanoestruturado foi analisado ao longo de cinco minutos, foram realizadas 10 leituras do diâmetro das gotículas (n=3) e foi determinado o índice de polidispersidade (IPD).

Análise do potencial zeta (de Freitas *et al.*, 2014)

A análise do potencial zeta deve ser realizada 24 horas após o preparo das formulações. Após diluição das amostras em solução aquosa de cloreto de potássio (10 µL de amostra/ 1mL de cloreto de potássio), o potencial zeta foi determinado através de 3 leituras e o resultado foi expresso pelo cálculo da média e desvio padrão da média. Foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano NS – Malvern Instruments.

4.3. Teste de tolerância à glicose oral (TTGO) e teste de tolerância à insulina (ITT)

Após 14 semanas (6 semanas de tratamentos com roflumilast ou com tadalafil) foi realizado o TTGO. Os animais foram jejuados por 12 horas e o ensaio foi iniciado às 11 horas da manhã. A glicemia foi determinada antes (0 min) e depois (15, 30, 60, 90 e 120 min) da sobrecarga de glicose (1 g/kg, via oral) pelo uso de fitas reativas e glicosímetro (Abbott, Freestyle Optium®).

Na 15ª semana (7 semanas de tratamentos com roflumilast ou com tadalafil) foi realizado o ITT. Os animais ficaram sem ração por 2 horas e o ensaio também foi iniciado às 11 horas da manhã. A glicemia foi determinada antes (0 min) e depois (15, 30, 45 e 60 min) da administração de insulina (Novolin R® 0,45 UI/kg, intraperitoneal, i.p.) pelo uso de fitas reativas e glicosímetro (Abbott, Freestyle Optium®).

4.4. Finalização do experimento

Após 16 semanas (8 semanas de tratamentos com roflumilast ou com tadalafil) houve a finalização do experimento. Todos os animais foram previamente jejuados por 6 horas e às 11 horas deu-se início a essa etapa. Os animais foram anestesiados (xilazina, 16 mg/kg; quetamina 90 mg/kg) e em seguida, metade dos animais (de todos os grupos estudados) receberam insulina (3,8 UI/kg peso corporal, Novolin R®, via i.p.) para o estudo dos níveis de fosforilação de Akt (proteína quinase B), estimulada por insulina em tecidos adiposos brancos e músculos *gastrocnemius*. A outra metade dos animais, de todos os grupos estudados, recebeu salina (0,85%, via i.p.) para o estudo dos níveis de fosforilação basal de Akt. Após 10 minutos dos estímulos, foi realizada a eutanásia dos animais via punção cardíaca e exsanguinação total. Devido à pandemia de COVID-19, não foi possível realizar as análises referentes aos níveis de fosforilação de Akt em tecidos adiposos brancos e músculos *gastrocnemius*, no entanto, essas análises ainda serão realizadas e os resultados obtidos serão inseridos em futura publicação.

Amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas (2500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C) a fim de obter o plasma para posteriores análises bioquímicas. Foram retirados, pesados e imediatamente congelados (-80°C): tecido adiposo branco epididimal, tecido adiposo marrom interescapular, músculo *gastrocnemius*, fígado e rins. Foram apenas pesados: tecido adiposo branco retroperitoneal e coração.

4.5. Biomarcadores do metabolismo de carboidratos, lipídeos e das disfunções hepática e renal, determinados com o uso de kits comerciais (Labtest Diagnóstica S.A.)

- **Triacilgliceróis:** método enzimático de reações acopladas (Rifai e Warnick, 2006);
- **Colesterol total:** método da colesterol oxidase (Mroz, 2003);
- **Colesterol – HDL:** inibição seletiva com polioxietileno lauril éter (Rifai e Warnick, 2006);
- **Alanina aminotransferase (ALT):** monitoramento cinético acoplado a lactato desidrogenase (Wroblewski e Ladue, 1956);
- **Ácido úrico:** método da uricase (Trinder, 1969);
- **Albumina:** verde de bromocresol (Bartholomew e Delaney, 1966).

4.6. Biomarcadores de peroxidação lipídica: determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (*thiobarbituric acid reactive substances*) (Kohn e Liversedge, 1944)

4.6.1. Homogeneização dos tecidos

Os tecidos foram homogeneizados em tampão cloreto de potássio 1,15%, sempre em gelo, na proporção 1:4. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 r.p.m., por 10 minutos, a 4°C. Com o sobrenadante obtido, prosseguiu-se com a análise.

4.6.2. Determinação de TBARS em amostras de plasma e sobrenadantes de fígado e rins.

Para quantificação dos níveis de TBARS, as amostras passaram previamente por um procedimento para a retirada das proteínas. Adicionou-se hidróxido de sódio (1,5 M) e as amostras foram incubadas por 30 minutos a 60°C. Após o resfriamento em banho de gelo, foi adicionado ácido perclórico 10% e as amostras foram centrifugadas a 10000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.

Os níveis de TBARS foram determinados no sobrenadante obtido, após reação com ácido tiobarbitúrico (TBA, 10 mM solubilizado em solução de fosfato de potássio monobásico, 75 mM, pH 2,5). Os níveis de TBARS no fígado e nos rins foram determinados em espectrofotômetro à 535 nm. Já para amostras de plasma, a determinação foi realizada em espectrofluorímetro em comprimento de onda de excitação de 510 nm e comprimento de onda de emissão de 553 nm.

Abaixo, na Figura 9, podem-se observar as curvas de calibração de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (1,1,3,3-TMP), com leituras realizadas em espectrofluorímetro e espectrofotômetro.

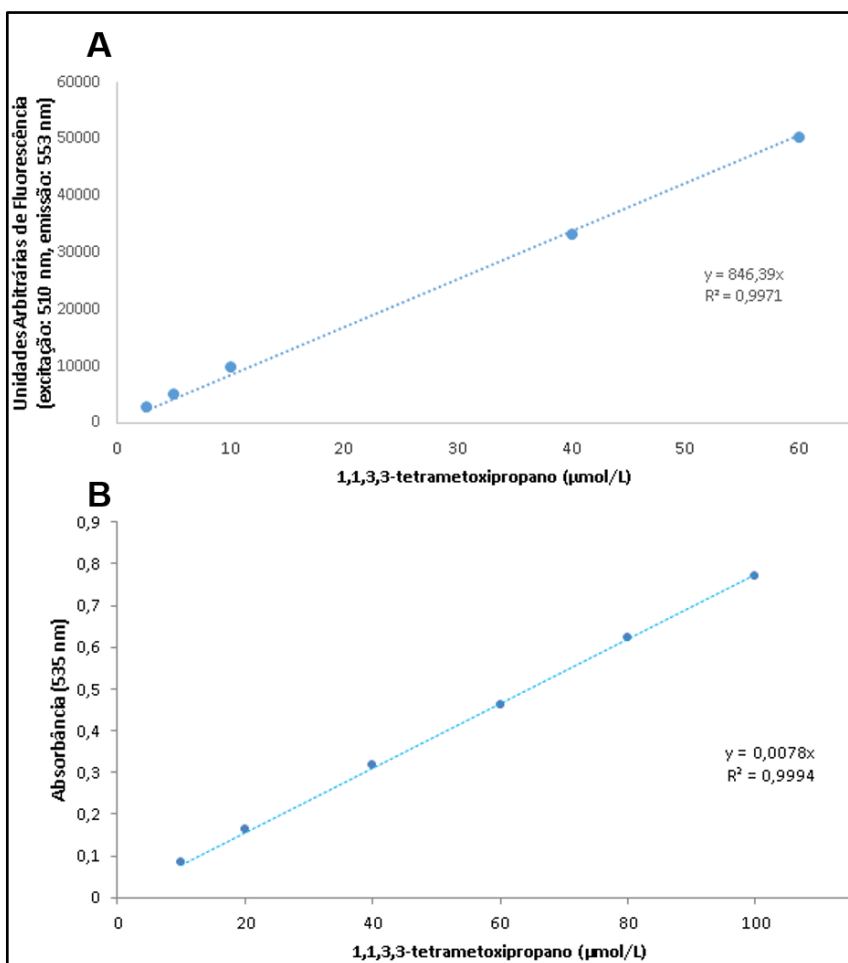


Figura 9. Curva de calibração de 1,1,3,3-TMP ($\mu\text{mol/L}$) e leituras realizadas em (A) espectrofluorímetro e (B) espectrofotômetro.

4.7. Atividade da enzima paraoxonase (PON 1) no plasma (Costa *et al.*, 1990; Assis *et al.*, 2017)

A atividade da enzima antioxidante PON 1 foi determinada pela adição do substrato paraoxon (1,2 mM) a amostras de plasma, em tampão Tris-HCl (15 mM, pH 8,5) contendo cloreto de cálcio (0,15 mM) e cloreto de sódio (0,3 M).

Quando a PON 1 hidrolisa o paraoxon, ocorre liberação do p-nitrofenol ($\epsilon=18.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, Richter *et al.*, 2008), cuja absorbância foi monitorada a cada 10 segundos, durante 5 minutos, a 37°C , em comprimento de onda de 405 nm. A atividade de PON 1 foi expressa em U/mg de colesterol-HDL (cada U = μmol de paraoxon hidrolisado/minuto).

4.8. Biomarcadores de glicação avançada: estimativa dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no plasma, fígado (Zilin *et al.*, 2001) e rins (Pokupec *et al.*, 2003)

Fígado e rins foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,4), sempre em gelo, na proporção 1:10. Para obtenção dos sobrenadantes de fígado, as amostras foram centrifugadas a 10.000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.

Ao plasma e sobrenadantes de fígado, foram acrescentados ácido tricloroacético (0,12 M), hidróxido de sódio (0,1 M) e clorofórmio (1,2 M em plasma e 2,4 M em fígado). Ao homogenato das amostras de rins, adicionou-se apenas hidróxido de sódio (0,1 M). As amostras de plasma e fígado foram homogeneizadas e mantidas em geladeira (8 a 10°C) por 30 minutos para separação das fases aquosa e clorofórmica.

Por último, as amostras de plasma, fígado e rins foram centrifugadas a 10.000 g, durante 10 minutos, sob temperatura de 10°C. A fase aquosa foi utilizada para determinação de AGEs fluorescentes, nos comprimentos de onda de excitação de 370 e de emissão de 440 nm. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.)/mg de proteína.

4.9. Atividades das enzimas antioxidantes em fígado e rins

4.9.1 Preparo dos tecidos

Fígado e rins foram pesados (100 mg de tecido para 1 mL de tampão) e homogeneizados em tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,4). Para as análises, utilizou-se o sobrenadante obtido após centrifugação do homogenato a 10.000 r.p.m. por 10 minutos, a 4°C.

4.9.2 Atividade da catalase (Beers e Sizer, 1952)

As amostras foram adicionadas à placa de 96 poços contendo tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) e H₂O₂ (10 mM). A atividade da CAT foi monitorada pelo consumo de H₂O₂ a 230 nm e os resultados foram expressos em μ mol de H₂O₂ consumido/min/mg de proteína.

4.9.3 Atividade da glutathiona peroxidase (Rush e Sandiford, 2003)

A reação ocorreu em tampão Tris-HCl + EDTA (52,94 mM, pH 7,6). A cinética foi disparada quando H₂O₂ (1,95 mM) foi adicionado à reação. A GSH-Px presente na amostra oxida a GSH (1,5 mM), a qual é convertida de volta à forma reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase (1,8 U/mL), às custas da oxidação do NADPH (3 mM,). A cinética foi monitorada a 340 nm e os resultados foram expressos em μ mol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

4.9.4 Atividade da superóxido dismutase (Beauchamp e Fridovich, 1971)

A reação foi conduzida em placa de 96 poços, em meio contendo tampão fosfato de sódio e potássio (53 mM, pH 7,8), EDTA (10 mM) e xantina (5 mM). Após a adição de xantina oxidase ao meio reacional, a cinética foi iniciada.

A xantina é convertida a hipoxantina, com geração de O₂^{•-}, que reduz o NBT (10mM, *nitroblue tetrazolium*) à formazana. A SOD neutraliza o O₂^{•-} e, portanto, inibe a redução do NBT. A redução do NBT foi monitorada em espectrofotômetro a 550 nm, durante 3 minutos, em intervalos de 10 segundos, a 37°C.

Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do NBT em 50%. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

4.10. Dosagem de proteínas totais em plasma e sobrenadantes de fígado e rins (Lowry *et al.*, 1951)

Adicionou-se às amostras cobre em meio alcalino (2% de carbonato de sódio em solução de hidróxido de sódio 0,1 N com 0,5% de sulfato de cobre em solução de tartarato de sódio e potássio 5%). Após 15 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado o reagente Folin-Ciocalteu (mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico), que sofre redução quando reage com proteínas na presença de cobre (II), produzindo um cromóforo azul. Este produto é determinado em espectrofotômetro a 660 nm.

Na Figura 10 pode-se observar a curva de calibração, que utilizou como padrão a albumina sérica bovina para os cálculos da concentração de proteína nas amostras, em µg/mL.

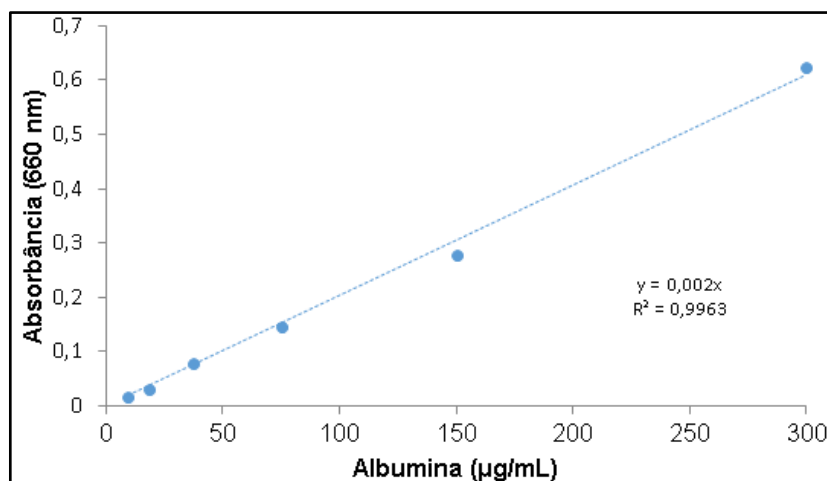


Figura 10. Curva de calibração de albumina (µg/mL).

4.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados por variância One-Way (ANOVA) seguido pelo teste Newman-Keuls ($p < 0,05$). Foi utilizado o programa GraphPad Prism® 6.01.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento piloto: definição do sistema lipídico nanoestruturado mais adequado à incorporação de roflumilast ou tadalafil

5.1.1. Caracterização do veículo

Podem-se observar, através da análise da tabela 3, as características físico-químicas da formulação do sistema lipídico nanoestruturado vazio e do sistema lipídico nanoestruturado com RFM0,5, RFM1,0, TDL1,0 e TDL 2,0 incorporados à formulação.

Tabela 3. Tamanhos das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta para os sistemas lipídicos nanoestruturados.

Formulação	Tamanho das Partículas (nm)	Índice de Polidispersão (IPD)	Potencial Zeta (mV)
SLN	22,26 ± 0,3002	0,258 ± 0,010	- 2,68 ± 0,551
RFM0,5	20,94 ± 1,240	0,240 ± 0,019	- 3,08 ± 0,307
RFM1,0	21,19 ± 0,2376	0,252 ± 0,002	- 2,95 ± 0,512
TDL1,0	20,31 ± 1,177	0,226 ± 0,016	- 2,94 ± 0,347
TDL2,0	21,49 ± 0,1721	0,212 ± 0,005	- 2,59 ± 0,303

Valores expressos como média ± desvio-padrão da média.

5.1.2. Comparativo de peso corporal ao longo das 14 semanas de experimento

Através da análise da Tabela 4, pode-se observar que, no início do experimento, todos os grupos apresentavam os mesmos valores médios de peso corporal. Antes do início da administração dos veículos, isto é, da primeira até a sétima semana, o ganho de peso corporal dos animais pertencentes aos grupos P ou HL era homogêneo. Entretanto, da oitava até a décima quarta semana de experimento, os

animais dos grupos PSLN-C e HL-SLN-C (isto é, animais em dieta P ou HL que receberam SLN a base de colesterol) não ganharam mais peso corporal.

Tabela 4. Peso corporal (g) e Δ peso corporal (g) dos animais alimentados com dieta P ou HL e tratados com água, SLN-G ou SLN-C.

Grupos	Peso corporal (g)			Δ peso corporal (g)		
	Início dietas	Início veículos	Peso Final	Δ (início dietas) - (início veículos)	Δ (início veículos) - (peso final)	Δ peso total
Semana	1	7	14	-	-	-
PA	20,8	26,2	29,1	5,4	2,9	8,4
PSLN-G	20,3	25,8	27,2	5,5	1,3	6,8
PSLN-C	20,1	27,0	27,0	6,9	0,0	6,9
HLA	20,3	27,4	30,1	7,2	2,7	9,9
HL-SLN-G	20,4	28,6	29,8	8,2	1,2	9,4
HL-SLN-C	20,1	28,0	28,2	7,9	0,2	8,1

Valores expressos como a média dos grupos. PA: animais alimentados com dieta P que receberam água; HLA: animais alimentados com dieta HL que receberam água; SLN-G: sistema lipídico nanoestruturado que contém girassol como fase oleosa e SLN-C: sistema lipídico nanoestruturado que contém colesterol como fase oleosa.

Através dos resultados obtidos neste experimento piloto, pode-se observar que o SLN que continha girassol como fase oleosa apresentou as melhores características de um bom veículo, já que não interferiu no ganho de peso corporal, sendo este um importante parâmetro a ser avaliado no experimento definitivo.

5.2. Experimento definitivo

5.2.1. Ingestão alimentar e energética

Nas Figuras 11A e 11B, pode-se observar que os animais alimentados com dieta HL apresentaram os menores valores médios de ingestão alimentar, ao longo das 16 semanas de experimento. Entretanto, devido a maior quantidade de calorias na composição da dieta hiperlipídica, HL (5,40 kcal/g) em comparação à dieta normolipídica, P (3,85 kcal/g), os animais dos grupos HL e HL-SLN apresentaram

maior ingestão energética, em relação aos animais do grupo P (Figuras 11C e 11D). As médias de ingestão energética dos grupos HL e HL-SLN foram 4% e 7% superiores, respectivamente, à ingestão energética do grupo P.

Na Figura 11, podem ser observados os efeitos benéficos dos tratamentos com roflumilast ou tadalafil na ingestão alimentar de animais mantidos em dieta HL. O tratamento com roflumilast na dose de 0,5 mg/kg diminuiu a ingestão energética em 3,5% e 6,3% em relação aos valores encontrados em animais dos grupos HL e HL-SLN, respectivamente. Já o tratamento com roflumilast na dose de 1,0 mg/kg diminuiu a ingestão energética em 4,7% e 7,4% em relação aos valores encontrados em animais dos grupos HL e HL-SLN, respectivamente (Figura 11C).

O tratamento com tadalafil na dose de 2,0 mg/kg diminuiu em 5,1% a ingestão energética dos animais alimentados com dieta HL, em comparação aos animais do grupo HL-SLN (Figura 11D).

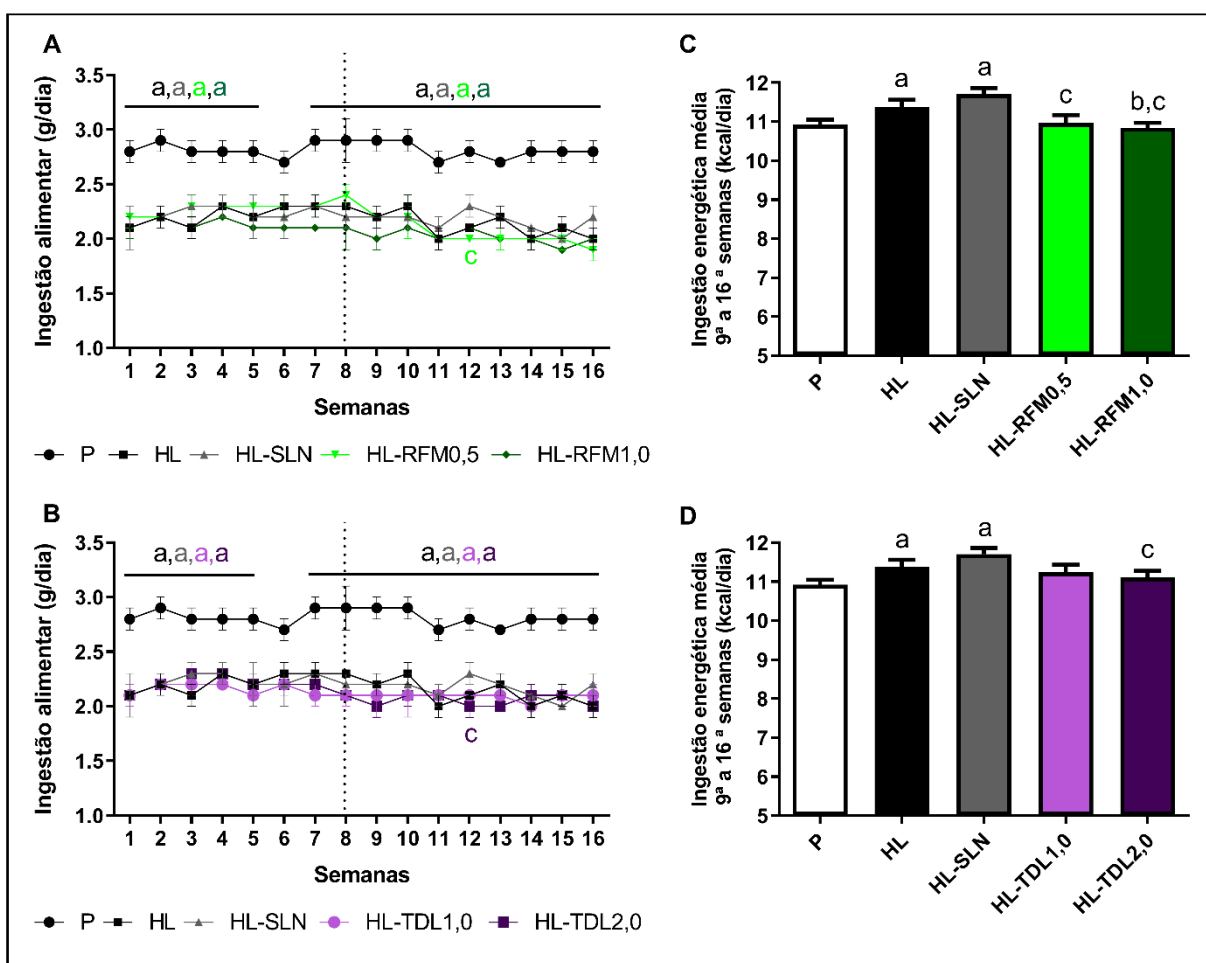


Figura 11. Ingestão alimentar (g/dia) de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg), sendo (A) referente aos grupos RFM0,5 e RFM1,0 e (B) referente aos grupos TDL1,0 e TDL2,0. Ingestão energética (kcal/dia) no período entre a 9ª e a 16ª semanas, sendo (C) referente aos grupos RFM0,5 e RFM1,0 e (D) referente aos grupos TDL1,0 e TDL2,0. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a: diferenças com P; b: diferenças com HL; c: diferenças com HL-SLN ($p < 0,05$).

5.2.2. Evolução de peso corporal

Nas Figuras 12A e 12B, pode-se acompanhar a evolução do peso corporal dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 16 semanas de experimento. Até a oitava semana (as linhas tracejadas indicam os inícios dos tratamentos com roflumilast ou tadalafil), os grupos de animais alimentados com dieta HL não apresentavam diferenças entre si em relação ao peso corporal. A partir da sexta semana, as médias de peso corporal dos grupos que estavam recebendo apenas dieta HL já eram significativamente superiores à média de peso corporal dos animais do grupo P. Após a oitava semana de experimento, com o início dos tratamentos, a

média de peso corporal do grupo HL continuou aumentando, de modo que este foi o grupo com maior ganho de peso corporal desde o início do experimento. Através da análise dos gráficos C ou D da Figura 12, pode-se comparar a área sob a curva (ASC) da evolução de peso corporal dos animais de todos os grupos, e podemos observar que a magnitude de ganho de peso corporal dos animais do grupo HL foi 15% maior que a magnitude de ganho de peso corporal dos animais do grupo P, após a oitava semana de experimento.

Animais do grupo HL-SLN também apresentaram um elevado ganho de peso corporal, sendo observado um aumento de 14% na ASC do grupo HL-SLN em relação ao grupo P. Mesmo após o início da administração do veículo aos animais em dieta HL, a evolução de peso corporal dos animais deste grupo manteve-se parecida com aquela dos animais do grupo HL, o que pode ser observado tanto pelos gráficos de ganho de peso corporal por semana (Figuras 12A e 12B) quanto pelos gráficos de ASC do peso corporal (Figuras 12C e 12D).

Em relação aos grupos de animais alimentados com dieta HL e tratados com os inibidores de PDEs, os resultados demonstraram o potencial desses fármacos na diminuição do ganho de peso corporal.

Os melhores efeitos relacionados à promoção de diminuição no ganho de peso corporal foram observados com o fármaco roflumilast. Ao final do experimento, tanto animais HL-RFM0,5 quanto animais HL-RFM1,0 apresentaram valores de peso corporal semelhantes àqueles de animais do grupo P, indicando uma importante diminuição no ganho de peso corporal de animais tratados com roflumilast, em relação aos animais do grupo HL. Comparando as ASC da evolução de peso corporal (Figura 12C), observa-se que da 8^a a 16^a semanas de experimento, os animais HL-RFM0,5 e HL-RFM1,0 apresentaram diminuição no peso corporal de 10% e 8%, respectivamente, em relação aos animais dos grupos HL e HL-SLN.

Na Figura 12D, pode-se observar que os valores de ASC da evolução de peso corporal dos animais tratados com tadalafil (HL-TDL1,0 e HL-TDL2,0) foram semelhantes entre si. Além disso, os animais em dieta HL e tratados com tadalafil, nas duas doses, apresentaram a mesma porcentagem de diminuição de peso corporal em relação aos grupos HL (7%) e HL-SLN (4%), após o início dos tratamentos.

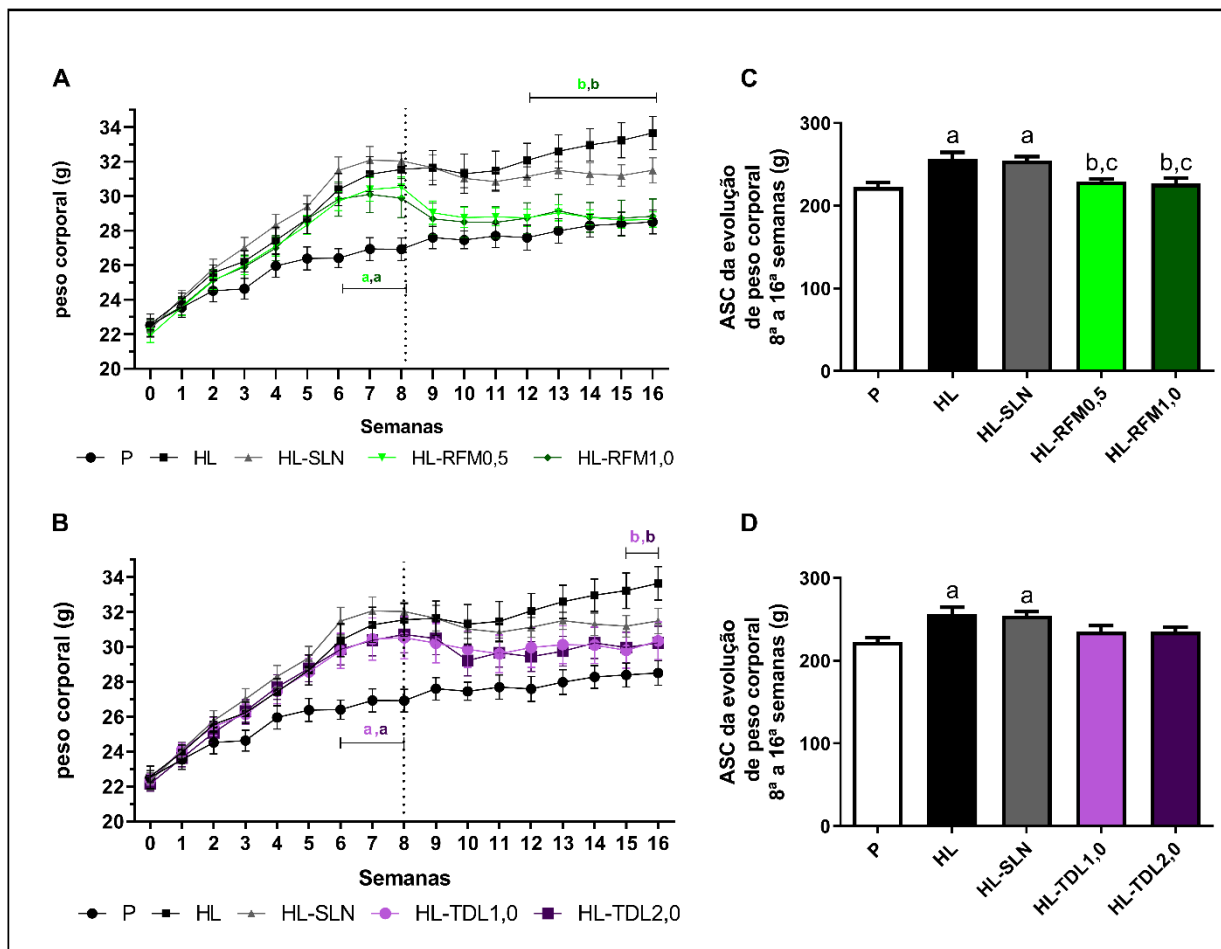


Figura 12. Evolução de peso corporal (g) de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg), sendo (A) referente aos grupos RFM0,5 e RFM1,0 e (B) referente aos grupos TDL 1,0 e TDL2,0. Área sob a curva (ASC) da evolução de peso corporal da 8ª a 16ª semanas, sendo (C) referente aos grupos RFM0,5 e RFM1,0 e (D) referente aos grupos TDL 1,0 e TDL2,0. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a: diferenças com P; b: diferenças com HL; c: diferenças com HL-SLN ($p < 0,05$).

5.2.3. Massas de tecidos

Nas Figuras 13A e 13B, pode-se observar que animais do grupo HL apresentaram aumentos nas massas de tecido adiposo branco epididimal (eTAB) e tecido adiposo branco retroperitoneal (rpTAB), de 171% e 212% de respectivamente, em relação aos valores encontrados em animais do grupo P. Animais do grupo HL-SLN também apresentaram aumento de 84% nas massas de eTAB em relação aos animais do grupo P.

Corroborando os benefícios encontrados relacionados à diminuição no ganho de peso corporal, os tratamentos de animais em dieta HL com os inibidores de PDEs foram eficazes na promoção de diminuição nas massas dos tecidos adiposos.

Foram observadas diminuições de 35% e 37% nas massas de eTAB dos animais dos grupos HL-RFM0,5 e HL-RFM1,0, respectivamente, em relação às massas dos animais do grupo HL. Também foram observadas diminuições de 34% e 46% nas massas de eTAB de animais dos grupos HL-TDL1,0 e HL-TDL2,0, respectivamente, em relação às massas de animais do grupo HL.

Quanto ao rpTAB, os animais tratados com RFM0,5 e RFM1,0 apresentaram diminuições de 45% e 39% nas massas desse tecido, respectivamente, em relação aos animais HL. Os animais tratados com TDL1,0 e TDL2,0 apresentaram diminuições de 39% e 44% nas massas de rpTAB, respectivamente, em relação aos animais HL.

Em relação ao tecido adiposo marrom interescapular (iTAM), apesar de não haver diferença estatística entre os grupos, pode-se observar que há uma tendência de animais do grupo HL possuírem maiores massas de iTAM, em relação aos animais do grupo P. Já animais dos grupos HL-SLN, HL-RFM0,5, HL-RFM1,0, HL-TDL1,0 e HL-TDL2,0 apresentaram os mesmos valores médios de massas de iTAM que aqueles do grupo P (Figura 13C).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais em relação às massas de fígado, rins, coração e músculos esqueléticos *gastrocnemius* (Tabela 5).

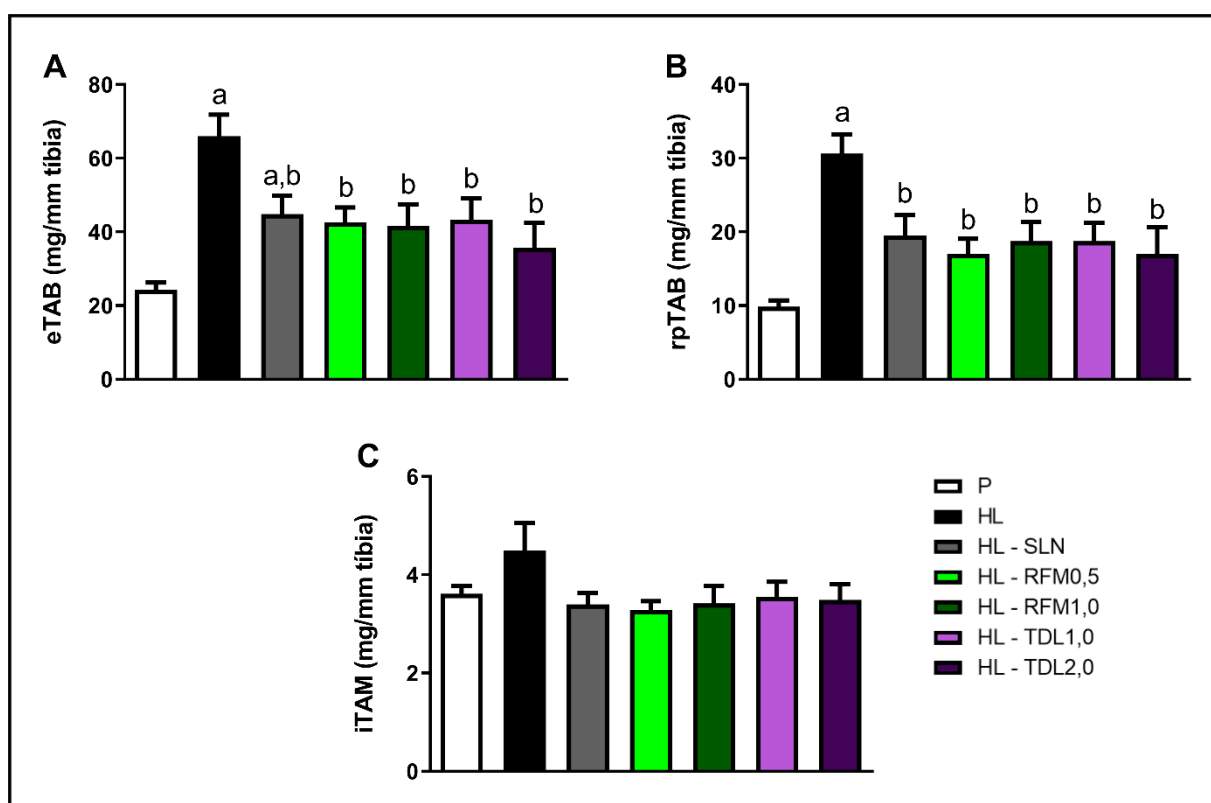


Figura 13. Massas dos (A) tecidos adiposos brancos epididimal e (B) retroperitoneal e (C) do tecido adiposo marrom interescapular, corrigidas por milímetro de tibia, de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a: diferenças com P; b: diferenças com HL ($p < 0,05$).

Tabela 5. Massas de fígado, rins, coração e músculos *gastrocnemius* (mg/mm de tibia) de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com roflumilast (0,5 e 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 e 2,0 mg/kg).

Grupos	Fígado (mg/mm tibia)	Rins (mg/mm tibia)	Coração (mg/mm tibia)	Músculos <i>gastrocnemius</i> (mg/mm tibia)
P	59,9 $\pm$ 2,2	7,6 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,3	8,5 $\pm$ 0,2
HL	61,0 $\pm$ 2,2	8,3 $\pm$ 0,4	6,9 $\pm$ 0,2	8,5 $\pm$ 0,2
HL-SLN	59,6 $\pm$ 2,1	7,7 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,2	8,4 $\pm$ 0,2
RFM0,5	55,9 $\pm$ 2,1	7,3 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 0,2
RFM1,0	53,8 $\pm$ 1,6	8,0 $\pm$ 0,4	6,8 $\pm$ 0,2	8,4 $\pm$ 0,1
TDL1,0	59,3 $\pm$ 2,5	7,9 $\pm$ 0,3	7,0 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 0,1
TDL2,0	59,4 $\pm$ 2,2	8,1 $\pm$ 0,3	7,1 $\pm$ 0,2	8,4 $\pm$ 0,2

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

5.2.4. Parâmetros bioquímicos plasmáticos

Os níveis plasmáticos de colesterol total e colesterol-HDL foram maiores nos animais do grupo HL, em 66 e 48%, respectivamente, em relação aos valores encontrados em animais do grupo P. Os tratamentos com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil na dose de 1,0 mg/kg não foram capazes de reduzir os níveis de colesterol total ou de colesterol-HDL de animais em dieta HL, cujos valores foram semelhantes àqueles de animais HL. Por outro lado, os níveis de colesterol total nos animais tratados com tadalafil na dose de 2,0 mg/kg foram menores em relação aos níveis de colesterol do grupo HL (Tabela 6). Em relação aos níveis de triacilgliceróis no plasma, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados (Tabela 6).

Não foram observadas diferenças nos níveis plasmáticos de albumina entre os grupos experimentais analisados. Também não houve alterações nos níveis plasmáticos de ácido úrico entre os grupos estudados (Tabela 6).

Em relação aos níveis de ALT, os animais dos grupos HL e TDL1,0 mg/kg apresentaram níveis plasmáticos elevados em relação aos animais do grupo alimentado com dieta padrão (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros bioquímicos plasmáticos de animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com roflumilast (0,5 e 1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 e 2,0 mg/kg).

Grupos	Colesterol total (mg/dL)	Colesterol-HDL (mg/dL)	Triacilglicerol (mg/dL)	Albumina (g/dL)	Ácido úrico (mg/dL)	ALT (U/l)
P	89,4 ± 3,8	80,0 ± 8,0	48,0 ± 4,6	2,1 ± 0,0	0,5 ± 0,1	17,2 ± 1,8
HL	148,7 ± 6,1 a	118,4 ± 5,1 a	44,0 ± 5,5	2,2 ± 0,0	0,6 ± 0,1	24,4 ± 2,3 a
HL-SLN	132,0 ± 5,5 a	115,0 ± 4,8 a	41,6 ± 6,1	2,2 ± 0,0	0,5 ± 0,1	22,6 ± 2,8
RFM0,5	133,8 ± 4,1 a	119,8 ± 2,9 a	33,8 ± 1,6	2,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1	20,9 ± 2,1
RFM1,0	140 ± 7,3 a	117,6 ± 3,5 a	37,5 ± 3,3	2,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	19,4 ± 1,9
TDL1,0	135,7 ± 3,3 a	120,3 ± 2,4 a	43,1 ± 3,5	2,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	22,8 ± 1,6 a
TDL2,0	118,8 ± 5,7 a,b	107,1 ± 4,9 a	37,2 ± 2,8	2,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	19,5 ± 1,5

Valores expressos como média ± erro padrão da média. a, diferenças com P; b, diferenças com HL; (p<0,05).

5.2.5. Teste de tolerância à glicose oral

Os animais do grupo HL apresentaram valores de glicemia de jejum maiores (45%) em relação os valores em animais do grupo P (Figura 14C). O valor da ASC da glicemia no TTGO, nos animais HL, foi 54% maior em relação aos valores de ASC da glicemia no TTGO dos animais P (Figura 14D).

Após o desafio com glicose, os animais dos grupos HL e HL-SLN apresentaram os maiores valores de pico glicêmico (tempo de 15 minutos) (Figuras 14A e 14B) e obtiveram valores semelhantes de ASC da glicemia no TTGO. A glicemia de jejum dos animais HL-SLN foi 47% maior que aquela observada nos animais P (Figura 14C) e a ASC da glicemia no TTGO foi 61% maior em comparação ao grupo P (Figura 14D).

Os valores médios de glicemia de jejum (12 horas) de animais em dieta HL e tratados com roflumilast e tadalafil não foram estatisticamente diferentes dos valores de glicemia de jejum dos animais do grupo HL (Figura 14C), indicando que o tratamento com os inibidores de PDE não foram capazes de melhorar a glicemia de jejum nos animais alimentados com dieta HL.

Após a sobrecarga de glicose, os animais em dieta HL e tratados com roflumilast não apresentaram melhorias significativas no perfil glicêmico, isto é, não houve diminuição nos valores de glicemia no intervalo de tempo entre 15 e 90 minutos, em relação aos animais HL e HL-SLN. Apenas aos 120 minutos pós-sobrecarga de glicose, os animais HL-RFM0,5 e HL-RFM1,0 apresentaram uma diminuição significativa na glicemia, em relação aos valores encontrados nos animais dos grupos HL e HL-SLN (Figura 14A).

Em relação aos tratamentos de animais em dieta HL com tadalafil, os animais que receberam 1,0 mg/kg apresentaram valores de glicemia semelhantes aos grupos HL e HL-SLN ao longo de praticamente toda a curva glicêmica, e só apresentaram menores valores médios de glicemia após 120 minutos da sobrecarga de glicose (Figura 14B). Os animais tratados com 2,0 mg/kg de tadalafil apresentaram o melhor perfil glicêmico. Aos 15 minutos, os animais HL-TDL2,0 já apresentavam redução da glicemia em relação aos animais do grupo HL, diferença que se repetiu também aos 60 e 120 minutos de TTGO (Figura 14B).

Na Figura 14D, pela observação da área sob a curva, pode-se concluir que os animais tratados com RFM 1,0 mg/kg e TDL 1,0 e 2,0 mg/kg apresentaram importante

melhora na tolerância à glicose em relação aos animais alimentados com dieta HL e não tratados com inibidores de PDE.

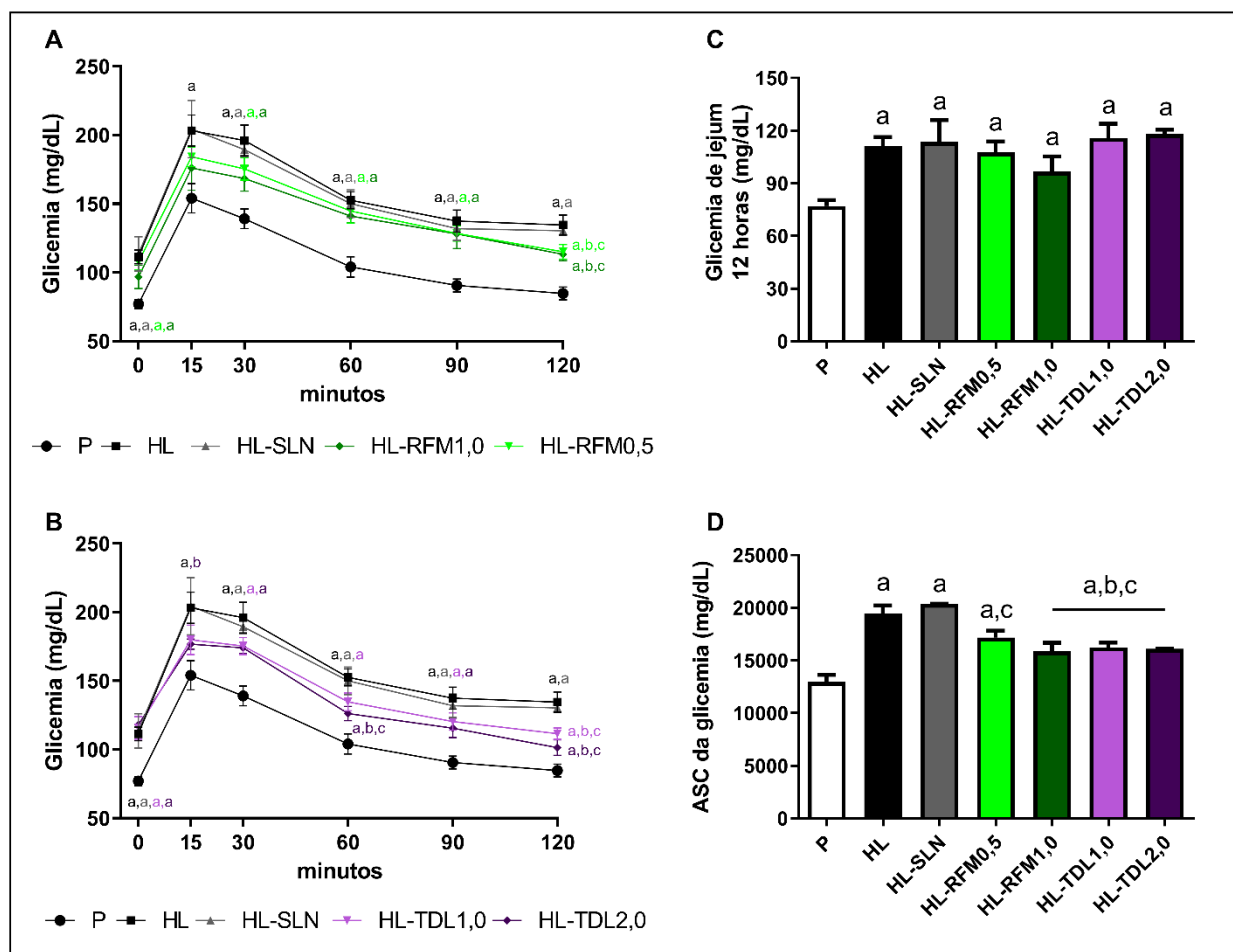


Figura 14. Teste de tolerância à glicose oral de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg), sendo (A) referente aos grupos HL-RFM0,5 e HL-RFM1,0 e (B) referente aos grupos HL-TDL1,0 e HL-TDL2,0. (C) Glicemia após 12 horas de jejum. (D) Áreas sob a curva (ASC) da glicemia no TTGO. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a: diferenças com P; b: diferenças com HL; c: diferenças com HL-SLN ($p < 0,05$).

5.2.6. Teste de sensibilidade à insulina

. Após o desafio com insulina, animais HL e HL-SLN apresentaram elevados valores de ASC da glicemia no ITT, os quais foram 46% e 29% maiores, respectivamente, em comparação ao valor de ASC da glicemia no ITT do grupo P (Figura 15C).

Os animais em dieta HL e tratados com roflumilast e tadalafil apresentaram diminuição nos valores de glicemia até os 60 minutos pós-desafio com insulina

(Figuras 15A e 15B), portanto, obtiveram menores valores de ASC da glicemia no ITT em relação aos animais do grupo HL. Em comparação com o grupo HL, os valores de ASC da glicemia no ITT dos animais tratados com roflumilast e tadalafil foram significativamente menores, em 22% (HL-RFM0,5), 29% (HL-RFM1,0), 22% (HL-TDL1,0) e 27% (HL-TDL2,0) (Figura 15C), indicando que o tratamento com inibidores de PDE melhora a sensibilidade à insulina em animais alimentados com dieta HL.

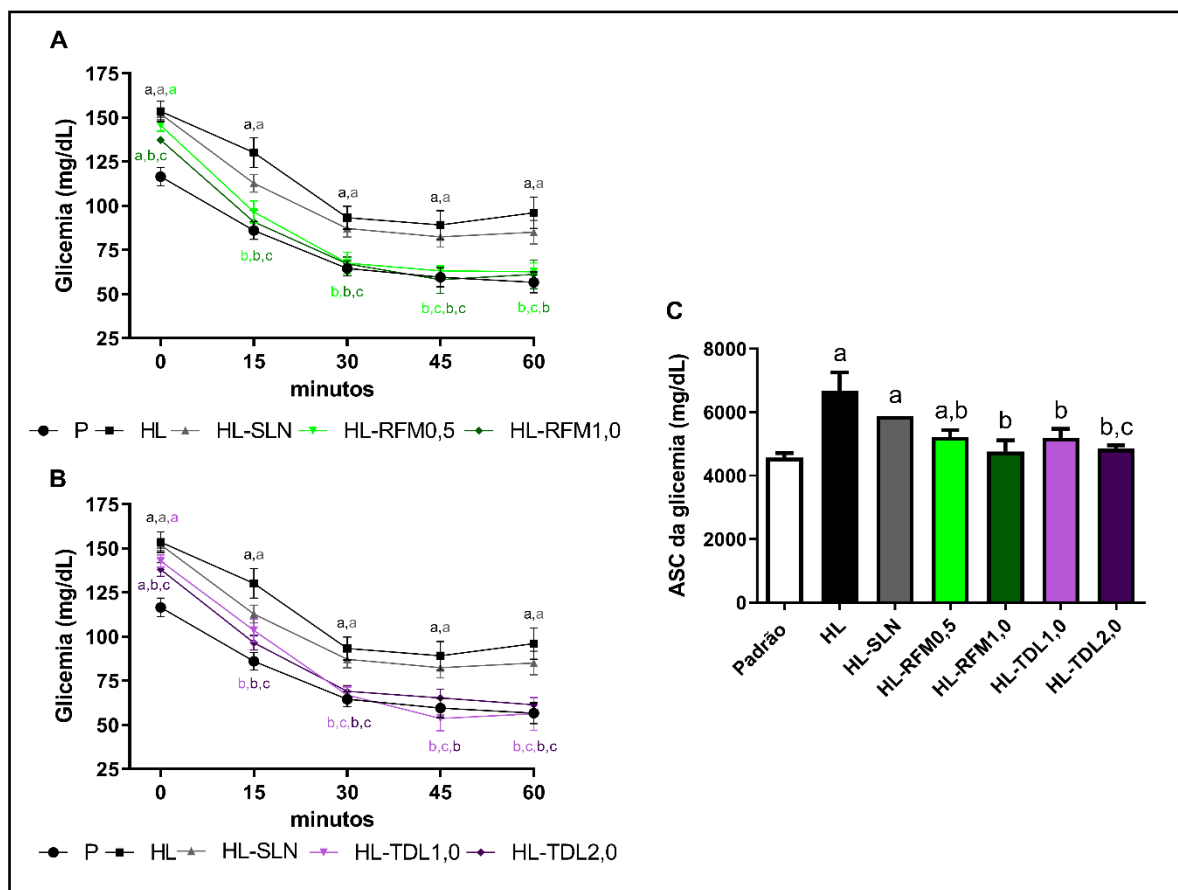


Figura 15. Teste de tolerância à insulina de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg), sendo (A) referente aos grupos HL-RFM0,5 e HL-RFM1,0 e (B) referente aos grupos HL-TDL 1,0 e HL-TDL2,0. (C) Áreas sob a curva (ASC) da glicemia no ITT. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a: diferenças com P; b: diferenças com HL; c: diferenças com HL-SLN ($p < 0,05$).

5.2.7. Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e ao potencial antioxidante no plasma

Na Figura 16A estão apresentados os resultados relacionados aos níveis plasmáticos de AGEs fluorescentes. Animais HL apresentaram um aumento de 69%

nos níveis de AGEs em relação aos animais P. Já os animais HL-SLN apresentaram níveis reduzidos de AGEs (40%) em relação aos animais HL. Todos os animais em dieta HL tratados com inibidores de PDE apresentaram diminuições nos níveis plasmáticos de AGEs, em comparação aos animais HL não tratados; as diminuições foram de 45% (HL-RFM0,5), 39% (HL-RFM1,0), 37% (HL-TDL1,0) e 34% (HL-TDL2,0). Porém, não pode descartada a possibilidade deste efeito ser atribuído ao veículo utilizado, considerando que a magnitude de resposta encontrada nos grupos de animais tratados com roflumilast ou tadalafil foi muito semelhante àquela observada no grupo de animais tratados somente com veículo (HL-SLN).

Animais do grupo HL apresentaram um aumento de 81% nos níveis plasmáticos de TBARS, em comparação aos valores encontrados em animais do grupo P (Figura 16B). Animais do grupo HL-SLN apresentaram uma discreta diminuição nos níveis de TBARS no plasma (21%) em relação aos valores observados no grupo HL (Figura 16B).

Os tratamentos de animais em dieta HL com os inibidores de PDE diminuíram os níveis plasmáticos de TBARS.

Animais em dieta HL e tratados com roflumilast apresentaram diminuições de 34% (RFM0,5) e 36% (RFM1,0) nos níveis de TBARS no plasma, em relação aos animais HL não tratados (Figura 16B).

Já o tratamento de animais em dieta HL com tadalafil promoveu diminuições de 34% (TDL1,0) e 38% (TDL2,0) nos níveis de TBARS no plasma, em comparação aos valores encontrados em animais HL, e diminuições de 16% (TDL1,0) e 21% (TDL2,0) em relação ao grupo HL-SLN.

Na Figura 16C pode-se observar que os animais dos grupos HL e HL-SLN apresentaram, no plasma, diminuições na atividade da enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON 1), de 13% e 14%, respectivamente, em relação aos valores encontrados em animais P.

Animais alimentados com dieta HL e tratados com 0,5 mg/kg de roflumilast apresentaram atividade de PON 1 semelhante àquela observada em animais dos grupos HL e HL-SLN. Já o tratamento com 1,0 mg/kg de roflumilast foi capaz de promover aumentos na atividade de PON 1, de 34% e 35%, em relação aos valores de atividade da enzima observados em animais dos grupos HL e HL-SLN, respectivamente (Figura 16C).

Animais alimentados com dieta HL e tratados com 1,0 mg/kg de tadalafil apresentaram aumentos na atividade de PON 1 de 34% e 35%, em relação aos animais HL e HL-SLN, respectivamente. O tratamento de animais em dieta HL com 2,0 mg/kg de tadalafil também foi capaz de aumentar a atividade de PON 1, em 38% e 39%, respectivamente, em comparação aos valores observados nos grupos HL e HL-SLN (Figura 16C).

Vale a pena destacar que os animais dos grupos HL-RFM1,0, HL-TDL1,0 e HL-TDL2,0 apresentaram as maiores atividades de PON 1, sendo inclusive maiores que a atividade da enzima em animais controles, isto é, aqueles alimentados com dieta P, em 17%, 16% e 20%, respectivamente (Figura 16C).

Este resultado evidencia o potencial benéfico dos inibidores de PDE em preservar ou até mesmo induzir a atividade de PON 1 em animais alimentados com dieta HL, o que surge como uma interessante estratégia para mitigar o estresse oxidativo observado em condições de disfunções metabólicas.

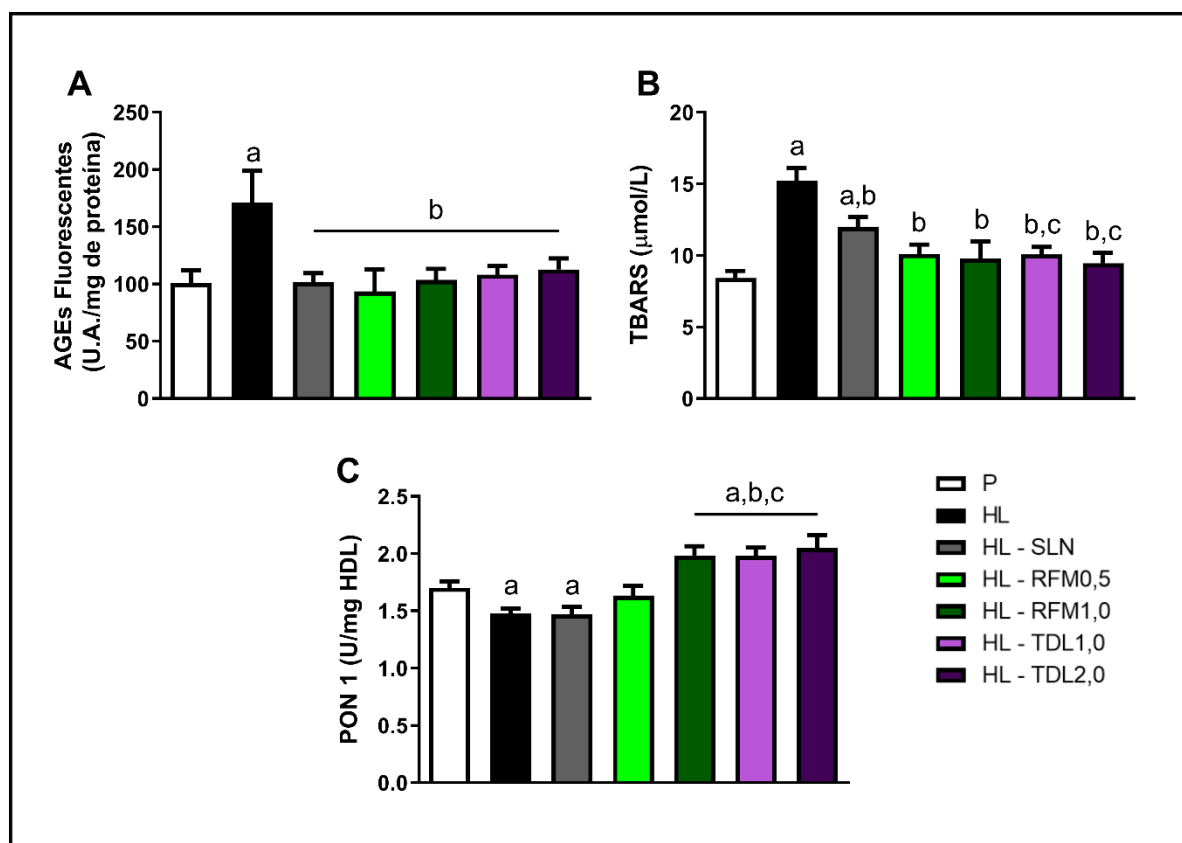


Figura 16. Níveis de (A) AGEs fluorescentes, (B) TBARS e (C) atividade de PON 1 em plasma de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafila (1,0 ou 2,0 mg/kg). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a: diferenças com P; b: diferenças com HL; c: diferenças com HL-SLN ($p < 0,05$).

5.2.8. Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante no fígado

De acordo com resultados apresentados na Figura 17, pode-se observar que o estresse glico-oxidativo foi estabelecido no fígado dos animais alimentados com dieta HL.

Os animais dos grupos HL e HL-SLN apresentaram níveis de AGEs fluorescentes maiores (65%) em relação aos valores encontrados em fígado de animais do grupo P. Não foram observadas diferenças nos níveis de AGEs fluorescentes no fígado de animais tratados com roflumilast ou tadalafila, em relação aos valores encontrados em animais dos grupos HL e HL-SLN (Figura 17A).

Quanto aos níveis de TBARS no fígado, animais dos grupos HL e HL-SLN apresentaram aumentos de 25% e 23%, respectivamente, em relação aos valores de TBARS encontrados em fígado de animais P (Figura 17B).

Os tratamentos com os inibidores de PDEs foram capazes de diminuir os níveis hepáticos de TBARS. Animais HL-RFM0,5 apresentaram diminuição nos níveis hepáticos de TBARS de 22% e 21%, respectivamente, em relação aos valores encontrados em animais HL e HL-SLN. Já os animais HL-RFM1,0 apresentaram redução de 32% nos níveis hepáticos de TBARS, em relação aos valores encontrados em animais HL e HL-SLN (Figura 17B).

Animais HL-TDL1,0 apresentaram diminuições nos níveis de TBARS de 30% e 29%, respectivamente, em relação aos valores em animais HL e HL-SLN. Já os animais HL-TDL2,0 apresentaram diminuição de 23% nos níveis hepáticos de TBARS, em comparação aos valores observados em fígado de animais HL e HL-SLN (Figura 17B).

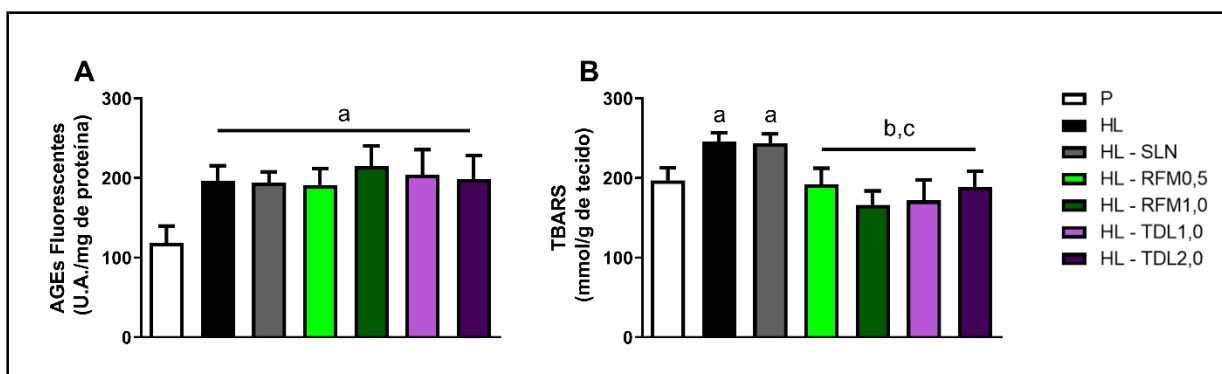


Figura 17. Níveis de (A) AGEs fluorescentes e (B) TBARS no fígado de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com HL-SLN ($p < 0,05$).

Na Figura 18 são apresentados os resultados relacionados aos valores das atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px no fígado.

Houve diminuição na atividade da CAT no fígado de animais HL e HL-SLN, de 12% e 11%, respectivamente, em relação aos valores encontrados em fígado de animais P. O único tratamento capaz de promover um aumento na atividade da CAT foi aquele conduzido com roflumilast, na dose de 1,0 mg/kg: animais HL-RFM1,0 apresentaram aumentos na atividade de CAT no fígado, de 14% e 13%, em relação aos valores encontrados em fígado de animais HL e HL-SLN, respectivamente. Os demais tratamentos (roflumilast 0,5 mg/kg; tadalafil nas duas doses) não foram

capazes de aumentar a atividade hepática de CAT, em relação aos valores encontrados em fígado de animais HL ou HL-SLN (Figura 18A).

Em relação à atividade de GSH-Px no fígado, os animais dos grupos HL e HL-SLN apresentaram diminuições na atividade da enzima, de 18% e 20%, respectivamente, em relação aos valores encontrados em fígado de animais P. Os animais alimentados com dieta HL e tratados com roflumilast ou tadalafil não apresentaram valores de atividade hepática de GSH-Px diferentes daqueles encontrados em fígado de animais HL ou HL-SLN (Figura 18B).

Os tratamentos com roflumilast ou tadalafil não alteraram a atividade de SOD no fígado, uma vez que não houve diferença entre os animais dos grupos experimentais analisados (Figura 18C).

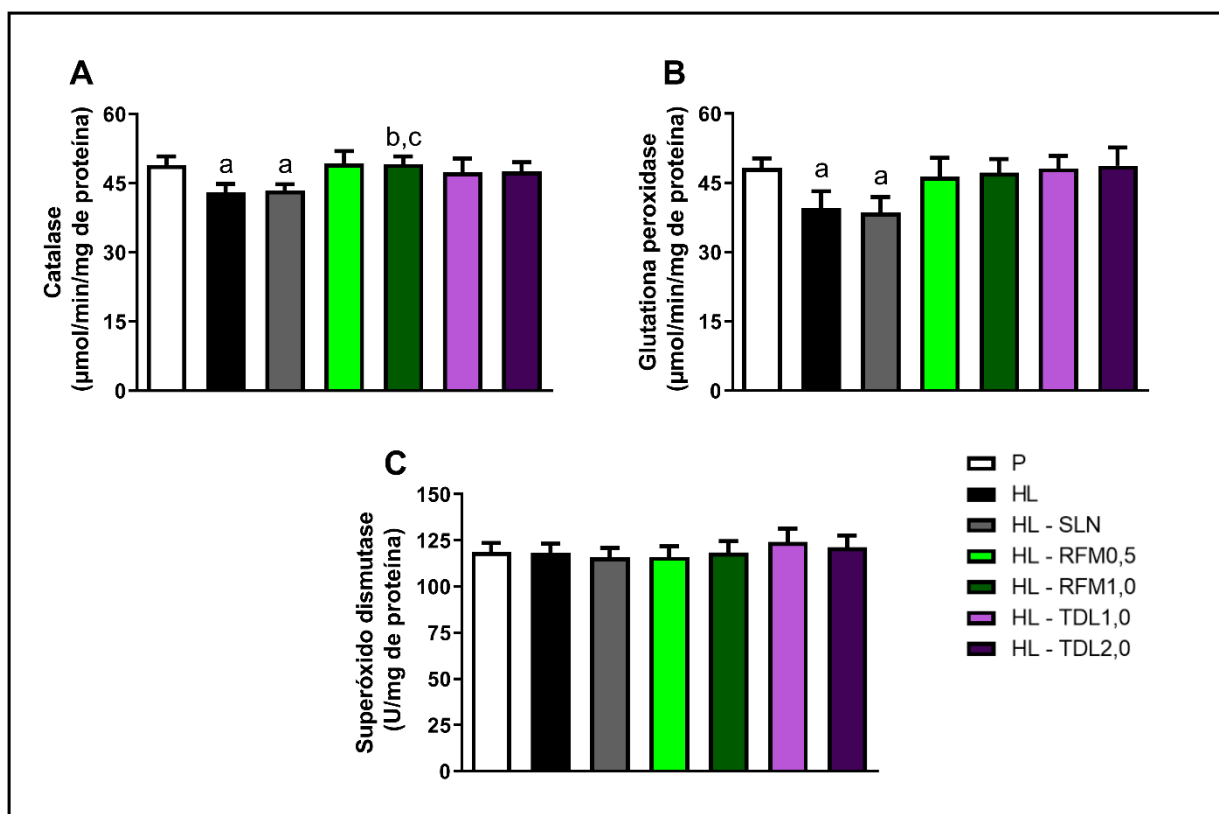


Figura 18. Atividade das enzimas antioxidantes (A) catalase, (B) glutathione peroxidase, e (C) superóxido dismutase no fígado de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a: diferenças com P; b: diferenças com HL; c: diferenças com HL-SLN. ($p < 0,05$).

5.2.9. Biomarcadores relacionados ao estresse glico-oxidativo e potencial antioxidante nos rins

Tal como observado no fígado, houve a instalação de um quadro de estresse glico-oxidativo em rins de animais alimentados com dieta HL (Figura 19).

Animais dos grupos HL e HL-SLN apresentaram aumentos de 38% e 37% nos níveis renais de AGEs fluorescentes, em relação aos valores encontrados em rins de animais do grupo P (Figura 19A).

Os animais alimentados com dieta HL e tratados com roflumilast ou tadalafil apresentaram níveis renais de AGEs semelhantes aos valores encontrados em rins de animais do grupo P. Os níveis de AGEs fluorescentes em rins de animais do grupo HL-RFM1,0 foram 26% menores em relação aos valores encontrados nos animais dos grupos HL e HL-SLN. Já os níveis de AGEs fluorescentes em rins de animais HL-TDL1,0 foram menores em relação aos valores encontrados nos animais HL (22%) e HL-SLN (21%). Por fim, animais HL-TDL2,0 apresentaram diminuição de 20% e 19% nos níveis renais de AGEs fluorescentes em relação aos valores observados em animais HL e HL-SLN, respectivamente (Figura 19A).

Na Figura 18B, podemos observar os níveis de TBARS nos rins. Os animais em dieta HL apresentaram um aumento de 18% nos níveis renais de TBARS, em relação aos valores encontrados em animais P. Já os níveis de TBARS em rins de animais HL-SLN foram 21% maiores em relação aos níveis deste marcador em rins de animais do grupo P (Figura 19B).

Os tratamentos com roflumilast (1,0 mg/kg) ou tadalafil (1,0 e 2,0 mg/kg) foram capazes de prevenir o processo de lipoperoxidação nos rins de animais alimentados com dieta HL, já que os níveis de TBARS foram inferiores àqueles observados nos rins de animais HL e HL-SLN, respectivamente e semelhantes aos valores encontrados em animais P. Foram observadas diminuições nos níveis de TBARS em rins de animais tratados com inibidores de PDE, de 24% e 26% (HL-RFM1,0), 22% e 24% (HL-TDL1,0) e 33% e 34% (HL-TDL2,0), respectivamente, em relação aos valores encontrados em animais HL e HL-SLN (Figura 19B).

Um resultado notável foi o tratamento com tadalafil na dose de 2,0 mg/kg, o qual promoveu diminuição nos níveis renais de TBARS de 21%, em relação aos valores encontrados em rins de animais alimentados com dieta padrão (Figura 19B).

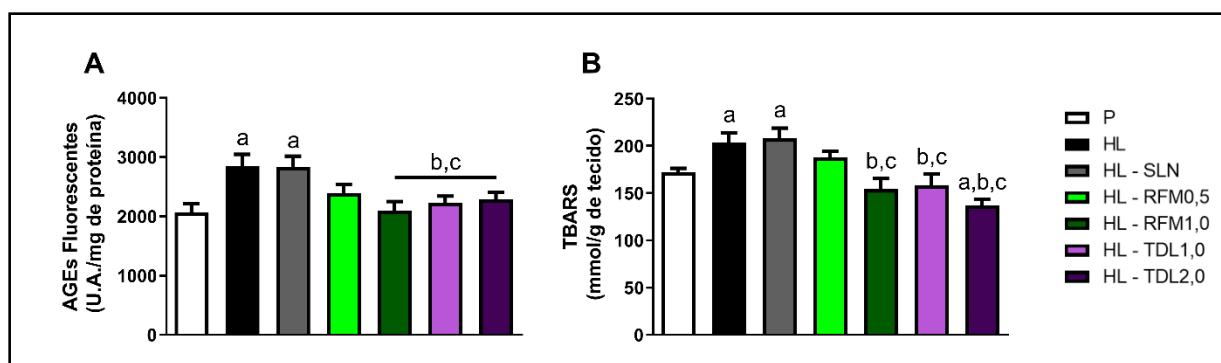


Figura 19. Níveis de (A) AGEs fluorescentes e (B) TBARS nos rins de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a, diferenças com P; b, diferenças com HL; c, diferenças com HL-SLN ($p < 0,05$).

As atividades das enzimas antioxidantes nos rins estão apresentadas na Figura 20. Quanto à atividade de CAT nos rins, os animais dos grupos HL e HL-SLN apresentaram valores semelhantes aos encontrados em rins de animais do grupo P. Os tratamentos com inibidores de PDE, especialmente roflumilast (0,5 e 1,0 mg/kg) e tadalafil (1,0 mg/kg) não promoveram alterações na atividade da CAT nos rins, em relação aos valores encontrados nos grupos HL e HL-SLN. Pode-se observar que apenas o tratamento com 2,0 mg/kg de tadalafil promoveu um aumento na atividade renal de CAT, o que foi 22% e 24% maior, respectivamente, em relação aos valores observados em animais HL e HL-SLN (Figura 20A).

Foram observadas diminuições significativas na atividade de GSH-Px nos rins dos animais HL (26%) e HL-SLN (24%), em relação aos valores encontrados em rins de animais do grupo P. Os tratamentos de animais em dieta HL com roflumilast ou tadalafil não foram capazes de prevenir a queda na atividade de GSH-Px nos rins (Figura 20B)

A atividade renal de SOD nos rins dos animais tratados com roflumilast ou tadalafil não apresentou diferença quando comparada com animais dos grupos HL ou HL-SLN (Figura 20C).

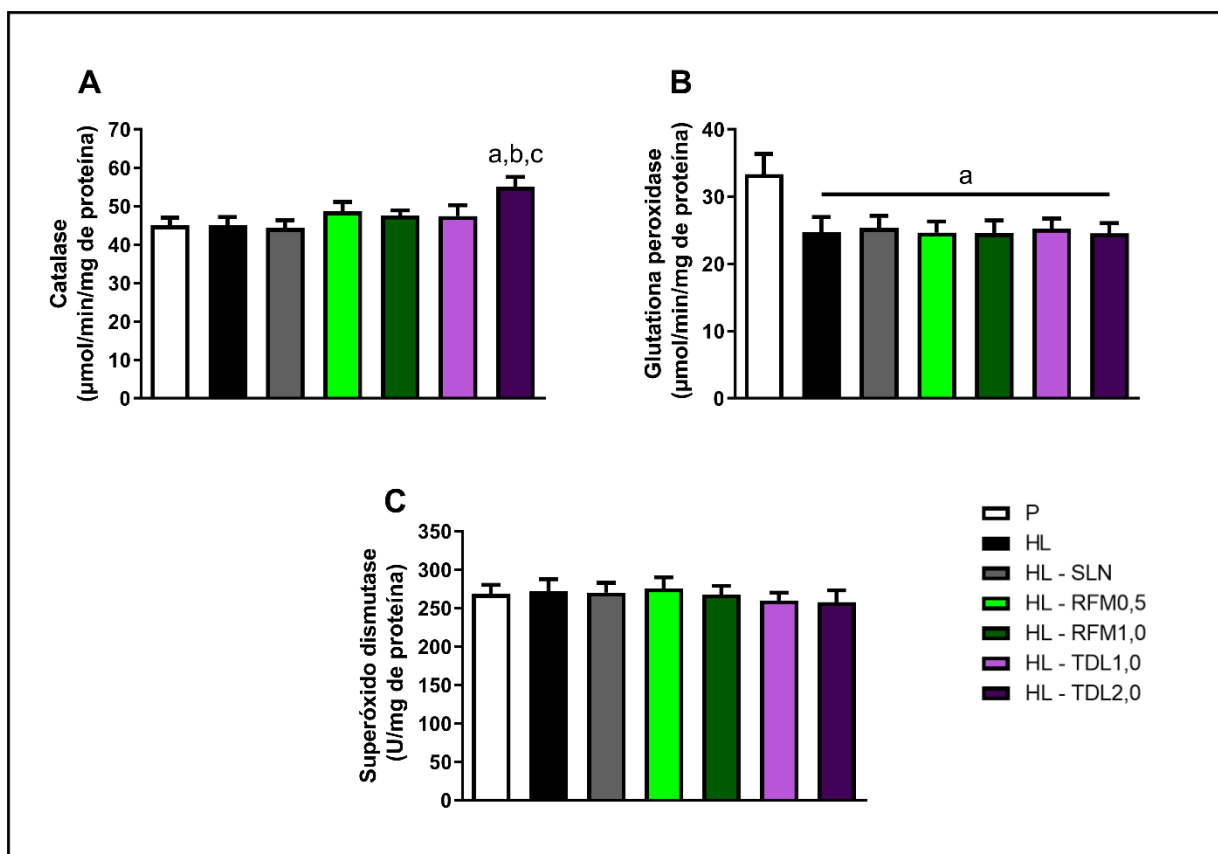


Figura 20. Atividade das enzimas antioxidantes (A) catalase, (B) glutathione peroxidase, e (C) superóxido dismutase nos rins de animais alimentados com dieta HL e tratados durante 8 semanas com roflumilast (0,5 ou 1,0 mg/kg) ou com tadalafil (1,0 ou 2,0 mg/kg). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. a: diferenças com P; b: diferenças com HL; c: diferenças com HL-SLN ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O sistema lipídico nanoestruturado foi muito bem formulado, apresentando um tamanho excelente, por volta de 20 nm, mesmo com os fármacos encapsulados. A escala nano permite que a partícula seja captada por uma variedade de células, melhorando a extensão da absorção do fármaco.

Quanto menor o valor do índice de polidispersão, mais homogêneo é o sistema. Como demonstrado na Tabela 3, os valores de IPD determinados foram baixos. O potencial zeta também é um indicativo de estabilidade da solução, quanto maior o potencial zeta, mais as partículas se repelem por causa da carga em suas superfícies. Apesar de valores baixos não serem desejáveis, e do veículo sozinho e veículo + fármacos possuírem baixos valores de potencial zeta, os SLN foram estáveis e não sofreram agregação.

Antes da realização do experimento definitivo, foi conduzido um experimento piloto para a escolha do melhor sistema para a veiculação dos fármacos roflumilast e tadalafil. Esse experimento piloto foi conduzido no sentido de verificar se os veículos *per se* teriam algum impacto no ganho de peso corporal dos animais mantidos em dieta HL. Assim, após sete semanas de administração do sistema lipídico nanoestruturado (SLN) que continha colesterol como fase lipídica, os animais deixaram de ganhar peso, tanto os animais alimentados com dieta padrão, quanto os animais alimentados com dieta hiperlipídica. Já os animais que receberam o SLN que continha óleo de girassol como fase oleosa continuaram ganhando peso corporal normalmente, sejam animais em dieta HL ou em dieta P, tal como os animais nas mesmas dietas e que receberam água por via oral. Deste modo, o veículo de escolha para a administração dos fármacos roflumilast e tadalafil foi o SLN que continha óleo de girassol (SLN-G) na fase oleosa.

Em relação ao experimento definitivo, pela análise da Figura 13, é possível observar que os animais em dieta HL e que receberam o veículo SLN ganharam menos massa de tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal, em relação aos animais HL, após 16 semanas de experimento. Apesar de os animais tratados com roflumilast e tadalafil terem apresentado massas de tecidos adiposos brancos semelhantes aos animais do grupo veículo, é importante destacar que o SLN, quando administrado aos animais sem carrear os fármacos, não promoveu melhorias em diversos parâmetros. Assim, podemos atribuir como efeitos benéficos e exclusivos ao

roflumilast ou ao tadalafil: (i) melhorias na tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (Figuras 14 e 15), (ii) aumento na atividade da enzima antioxidante PON 1 (Figura 16C), (iii) diminuição nos níveis de TBARS no fígado (Figura 17B) e nos níveis de AGEs fluorescentes e TBARS nos rins (Figura 19). No entanto, com os resultados obtidos, fica evidente a necessidade de uma investigação mais detalhada em relação aos possíveis efeitos do SLN, especialmente sobre a absorção de lipídeos em animais alimentados com dieta HL.

Os resultados do experimento definitivo indicam o potencial dos inibidores de fosfodiesterases em atenuar o ganho de peso corporal e melhorar a sensibilidade à insulina em animais submetidos ao sistema-modelo *in vivo* de obesidade, e reforçam os recentes achados da literatura relacionados aos estudos pré-clínicos e clínicos indicando as ações benéficas desta classe de fármacos no tratamento de complicações da síndrome metabólica (Hill *et al.*, 2009; Mátyás *et al.*, 2017; Maneschi *et al.*, 2016; Inácio *et al.*, 2020).

De acordo com os nossos resultados, o inibidor de PDE 4 roflumilast, tanto na dose de 0,5 mg/kg quanto na dose de 1,0 mg/kg, diminuiu significativamente o ganho de peso corporal dos animais alimentados com dieta hiperlipídica. Ao final das 16 semanas de experimento e 8 semanas de tratamento, os valores médios de peso corporal dos animais em dieta HL e tratados com roflumilast eram semelhantes à média de peso corporal dos animais alimentados com dieta P (Figura 12A).

Corroborando esses achados, as massas dos tecidos adiposos brancos epididimal e retroperitoneal, bem como a massa do tecido adiposo marrom interescapular dos animais em dieta HL e tratados com roflumilast foram menores em relação às massas desses tecidos de animais HL não tratados (Figura 13). Estudo de Mollmann *et al.* (2017) demonstrou que camundongos tratados com roflumilast apresentaram perda de peso corporal devido a um aumento no gasto energético. A hipótese é que a diminuição do ganho de peso corporal ocorre como consequência de um estímulo à biogênese mitocondrial, culminando no aumento da capacidade respiratória do tecido adiposo, já que os autores demonstraram que há um aumento na expressão de PGC-1 α no fígado após a inibição de PDE 4 e, portanto, este aumento poderia ocorrer também no tecido adiposo. Outro mecanismo pelo qual o roflumilast pode promover uma diminuição de peso corporal é através de sua ação no tecido adiposo marrom. Kraynik *et al.* (2013) utilizaram adipócitos marrons primários e observaram que PDE 4 é um dos principais componentes reguladores do processo

de lipólise neste tecido. A inibição de PDE 4 aumenta a concentração de AMPc e estimula PKA (proteína quinase dependente de AMPc ou proteína quinase A), que por sua vez estimula a mobilização dos estoques de triacilgliceróis e aumenta a expressão de UCP 1 (proteína desacopadora 1, *uncoupled protein 1*), aumentando a geração de calor.

Adicionalmente, quando PDE 4 é inibida nos adipócitos, há um aumento da concentração de AMPc e maior estimulação de enzima AMPK (proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina, *AMP-activated protein kinase*), o qual sabidamente é um efetor que estimula a lipólise. Este é outro mecanismo pelo qual o roflumilast pode promover a perda de peso corporal, já que PDE 4 é uma das isoformas de PDE presente nos adipócitos (Zilanowska e Ziolkowska, 2020).

O tratamento com o inibidor de PDE 5 tadalafil também atenuou o aumento do peso corporal de animais em dieta HL, porém de maneira mais discreta em relação ao efeito do roflumilast (Figura 12B). Segundo estudo de Zhang *et al.* (2010), onde foram utilizadas culturas de células de pré-adipócitos 3T3-L1, o inibidor de PDE 5 sildenafil estimula a adipogênese via ativação de PKG (proteína quinase dependente de GMPc), consequentemente aumentando a expressão de PPAR γ , ácido graxo sintase e adiponectina, estimulando, portanto, a síntese de ácidos graxos e o aumento na deposição de triacilgliceróis. Esse pode ser um dos motivos pelos quais os animais em dieta HL e tratados com tadalafil não perderam tanto peso corporal quanto os grupos tratados com roflumilast. A inibição de PDE 5 também estimula a termogênese, via aumento na expressão de UCP 1 e PGC1- α , portanto também há um estímulo ao gasto de energia, o que justificaria o menor ganho de peso corporal observado em animais HL tratados com tadalafil (Mitschke *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2013).

Os tratamentos de animais em dieta HL com os inibidores de fosfodiesterases produziram melhorias na tolerância à glicose, em relação aos animais em dieta HL e não tratados. Pode-se notar este efeito especialmente quando analisamos a área sob a curva da glicemia no TTGO de animais tratados com roflumilast na dose de 1,0 mg/kg e tratados com tadalafil em ambas as doses, de 1,0 e 2,0 mg/kg (Figura 14D). Analisando os resultados do teste de tolerância à insulina, podemos observar que tanto roflumilast quanto tadalafil produziram melhorias significativas na sensibilidade à insulina em animais alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 15).

Mollmann *et al.* (2017) relataram uma melhoria importante no controle do metabolismo de glicose em camundongos C57BL/6 alimentados com dieta

hiperlipídica por 12 semanas e tratados com roflumilast (21 mg/kg de dieta, durante 12 semanas). Como citado na introdução, o estudo de Wouters *et al.* (2012) demonstrou os efeitos benéficos de roflumilast sobre a homeostase de glicose. Observou-se neste estudo que pacientes com diabetes mellitus tipo 2 recém diagnosticado (com ou sem DPOC) apresentavam diminuição nos níveis de hemoglobina glicada e nos níveis plasmáticos de glicose no jejum após o tratamento com roflumilast por 12 semanas. Segundo os autores, esse efeito estaria ligado ao aumento de GLP-1 (peptídeo-1 semelhante ao glucagon, *glucagon-like peptide 1*), um hormônio insulínico, cujos níveis seriam aumentados pelo aumento na concentração de AMPc promovido pelo roflumilast (Wouters *et al.*, 2012).

Além de estimular a lipólise, a ativação de AMPK subsequente à inibição de PDE 4 também pode promover uma melhora no metabolismo de glicose. A AMPK regula as vias intracelulares que fornecem energia, conforme as necessidades da célula. Se há um desbalanço oxidativo, por exemplo, a AMPK ativa as vias que promovem um aumento na transferência de energia para o ATP, incluindo o estímulo à captação de glicose e à oxidação de ácidos graxos (Lugnier *et al.*, 2020).

Em relação à inibição de PDE 5 e o controle do metabolismo de glicose, Ho *et al.* (2014) demonstraram, em estudo com pacientes obesos, que o tratamento com tadalafil, na dose de 20 mg por 3 meses, resultou em melhorias na sensibilidade insulínica e na função das células beta pancreáticas. Os efeitos benéficos promovidos pelo tadalafil poderiam ser atribuídos também à melhoria na função endotelial. No estado de resistência à insulina, ocorre diminuição na produção de óxido nítrico no endotélio vascular. A administração de um inibidor de PDE 5 pode ter revertido este processo, mitigando assim os prejuízos à função endotelial, que incluem vasoconstrição e resistência vascular periférica (Mandosi *et al.*, 2015).

Quanto à análise dos biomarcadores plasmáticos relacionados aos danos glicoxidativos, os animais mantidos em dieta HL e tratados com roflumilast ou com tadalafil, em ambas as doses, apresentaram níveis de TBARS inferiores aos níveis desses marcadores em animais pertencentes ao grupo HL (Figura 16B). Podemos inferir que os tratamentos com os inibidores de fosfodiesterases foram capazes de diminuir a peroxidação lipídica no plasma, bem como a formação de espécies reativas de oxigênio. Sendo assim, as ERO não estavam em excesso para atacarem os lipídeos e formarem MDA, HNE e α -oxoaldeídos, por exemplo.

Os níveis de AGEs fluorescentes no plasma dos animais mantidos em dieta HL e tratados com roflumilast e tadalafil também foram inferiores em relação aos níveis de AGEs encontrados em animais HL. Entretanto, os níveis deste marcador nos animais do grupo veículo foram semelhantes aos dos animais tratados com inibidores de fosfodiesterases. Assim, não é possível atribuir esse efeito benéfico de combate ao estresse glicativo somente aos fármacos roflumilast e tadalafil (Figura 16A).

Os animais em dieta HL e tratados com roflumilast ou tadalafil apresentaram um importante aumento na atividade da enzima antioxidante paraoxonase 1 (PON 1), em relação aos demais grupos de animais não tratados. Os tratamentos com roflumilast na dose de 1,0 mg/kg ou com tadalafil nas doses de 1,0 e 2,0 mg/kg elevaram a atividade de PON 1 até mesmo em relação ao grupo de animais alimentados com dieta padrão (Figura 16C). Esses resultados também são corroborados por Inácio *et al.* (2020), que encontraram uma diminuição na atividade de PON 1 em animais alimentados com dieta hiperlipídica, e o tratamento com um inibidor não seletivo de fosfodiesterases, a pentoxifilina, foi capaz de elevar a atividade da enzima. Segundo o estudo, esse aumento na atividade de PON 1 pode ter ocorrido devido à diminuição nos níveis plasmáticos de AGEs e de espécies reativas de oxigênio, já que a enzima é vulnerável a processos de glicação e oxidação (Chistiakov *et al.*, 2017; Kotur-Stevuljević *et al.*, 2020).

Em relação aos biomarcadores relacionados aos danos glico-oxidativos no fígado, não foram observadas diferenças em relação aos níveis de AGEs fluorescentes nos animais pertencentes aos grupos alimentados com dieta hiperlipídica (Figura 17A). Entretanto, os níveis de TBARS foram inferiores nos animais alimentados com dieta HL e tratados com roflumilast ou com tadalafil, em ambas as doses, em comparação aos animais alimentados com dieta HL e não tratados. Este resultado demonstra que os inibidores de fosfodiesterases possuem potencial protetor quanto aos danos causados pela peroxidação lipídica também em tecido hepático (Figura 17B).

Nos rins, os animais alimentados com dieta HL e tratados com roflumilast ou com tadalafil também apresentaram menores níveis de AGEs fluorescentes em relação aos animais dos grupos alimentados com dieta hiperlipídica e não tratados (Figura 19A). Este resultado poderia explicar os menores níveis de TBARS nos rins dos animais tratados (com exceção da dose de RFM0,5 mg/kg) em relação aos níveis renais de TBARS de animais HL (Figura 19B), visto que as vias metabólicas e

sinalizatórias dos AGEs e de formação de ERO se retroalimentam: quando os AGEs se ligam aos receptores RAGE, ativam NF- κ B, desencadeando a produção de ERO, os quais promovem diversos danos, incluindo a peroxidação lipídica (Ott *et al.*, 2014).

Corroborando estes achados, um estudo recente de nosso laboratório realizado por Inácio *et al.* (2020), utilizando sistema-modelo *in vivo* de obesidade e resistência à insulina com camundongos alimentados com dieta HL, o tratamento com 50 mg/kg de pentoxifilina (inibidor não seletivo de fosfodiesterases) também demonstrou o potencial de um inibidor de PDE em diminuir a formação de AGEs. O tratamento com pentoxifilina promoveu citoproteção renal, pois preveniu o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e nos marcadores de lesão glico-oxidativa AGEs e TBARS. Paralelamente, após o tratamento com pentoxifilina, houve melhoria na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina; portanto os autores atribuem essa prevenção no aumento dos níveis de AGEs à melhoria no controle glicêmico dos animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com pentoxifilina (Inácio *et al.*, 2020).

Conforme demonstrado por Harcourt *et al.* (2011), em estudo utilizando camundongos C57BL/6, a diminuição dos níveis de AGE nos rins previne que danos iniciais evoluam para estágios mais graves de doenças renais, os quais podem ser causados pelo estado de obesidade não controlado.

Em trabalho publicado por El-Mahdy *et al.* (2016), os autores utilizaram como tratamento a associação 10 mg/kg de telmisartana (antagonista do receptor AT1 de angiotensina e agonista seletivo de PPAR γ) e 3 mg/kg de sildenafil, para ratos com diabetes mellitus tipo 1, durante 8 semanas. A combinação telmisartana + sildenafil promoveu melhorias significativas em diversos parâmetros relacionados à nefropatia diabética e diminuiu os níveis renais de AGEs. Esta diminuição nos níveis de AGEs, no entanto, não foi elucidada pelos autores.

Além da prevenção na formação de AGEs nos rins, outros estudos propõem diferentes mecanismos pelos quais os inibidores de PDE promovem melhorias no tecido renal.

Tomita *et al.* (2020) submeteram os animais a uma dieta rica em sódio (sistema-modelo *in vivo* de hipertensão) e observaram que o tratamento com tadalafil nas doses de 1 e 10 mg/kg, por 8 semanas, diminuiu a proteinúria por proteger as estruturas glomerulares, já que o tratamento com tadalafil também preveniu a glomeruloesclerose nos rins desses animais. Os mecanismos pelos quais o tadalafil protege contra a fibrose nos rins ainda não foram completamente elucidados, mas

estudos já relataram que a enzima PDE 5 é expressa durante o processo de formação de podócitos renais. Os podócitos, a membrana basal e o endotélio glomerular formam a barreira de filtração glomerular.

Nio *et al.* (2020) realizaram testes *in vitro* com um novo inibidor de fosfodiesterase 4, o composto A (*N*-[Amino(dimethylamino)methylidene]-4-(3*aS*,9*bR*)-8-ethoxy-7-methoxy-1,3,3*a*,9*b*-tetrahydrofuro[3,4-*c*]isoquinolin-5-yl]benzamide), utilizando culturas de células mesangiais humanas, podócitos humanos e células epiteliais de rins de ratos. Como resultado, houve um aumento significativo nos níveis de AMPc nestes tipos celulares, o que contribuiu para a diminuição na expressão de genes pró-fibróticos. Esses resultados confirmaram o que os autores observaram nos experimentos *in vivo*, com uma linhagem de camundongos desenvolvida pelo próprio grupo, e que possui as seguintes características: hipertensão, hiperglicemia, hipertrofia cardíaca e falência renal. O tratamento destes animais com o composto A diminuiu significativamente a expressão de genes pró-fibróticos. Entretanto, a diminuição na expressão de um gene não necessariamente implica na diminuição na síntese da proteína, portanto os autores alertam que mais estudos precisam ser realizados acerca das ações do composto A (Nio *et al.*, 2020). Segundo Schinner *et al.* (2015) e Nio *et al.* (2020), o aumento dos níveis de AMPc leva a ativação de CREB (proteína de ligação responsiva ao AMPc, *cAMP response element-binding protein*), o qual inibe a transcrição de genes pró-fibróticos mediada por TGF- β (fator de crescimento transformador- β , *transforming growth factor- β*). As ERO também contribuem de maneira significativa para a progressão da doença renal, já que, em excesso, promovem deslocamento dos podócitos renais e até apoptose (Nio *et al.*, 2020)

Não foram analisados em nosso trabalho os níveis renais de AMPc, entretanto, pelos resultados obtidos, é possível observar que a administração de roflumilast a animais alimentados com dieta hiperlipídica foi capaz de diminuir os níveis de biomarcadores associados aos danos glico-oxidativos nos rins (Figura 19) o que poderia prevenir o surgimento de um processo pró-fibrótico neste tecido.

Roflumilast, atuando via inibição de PDE 4, tem uma importante ação anti-inflamatória (Hatzelmann & Schudt, 2001; Park *et al.*, 2016). Barreiro *et al.* (2018) investigaram os efeitos do tratamento de roflumilast-n-óxido, metabólito ativo do roflumilast, em culturas de células musculares de indivíduos saudáveis e de pacientes com DPOC, obtidas através de biópsia da porção vasto-lateral do músculo

quadríceps; tanto nas células de indivíduos saudáveis quanto nas células de pacientes com DPOC, houve aumento na ativação de NRF 2 (fator nuclear eritróide 2, *nuclear factor erythroid 2*) um fator de transcrição que estimula a expressão de enzimas antioxidantes que agem eliminando as ERO.

Ao considerarmos o estudo de Duranti *et al.* (2016), onde foram avaliados os efeitos de 1 μ M de tadalafil sobre miotubos C2C12, essa diminuição nos níveis de EROs também pode estar ligada a um estímulo na via de NRF 2, devido ao aumento de GMPc, o que também poderia explicar nossos achados relacionados à diminuição de TBARS em animais tratados com tadalafil. Em estudo com camundongos *db/db*, Koka *et al.* (2014) apresentaram a hipótese de que a diminuição na geração de ERO no tecido cardíaco após o tratamento com tadalafil (1 mg/kg, via intraperitoneal por 8 semanas) poderia estar associada ao aumento na expressão e ativação de SIRT 1 (sirtuína 1).

Corroborando os estudos de Barreiro *et al.* (2018), Duranti *et al.* (2016) e Koka *et al.* (2014), nossos resultados mostraram que, em fígado, houve um aumento na atividade da enzima antioxidante catalase nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com roflumilast na dose de 1 mg/kg, em relação aos animais alimentados com dieta hiperlipídica e não tratados (Figura 18A). Além disso, em relação às atividades das enzimas antioxidantes nos rins, o tratamento de animais alimentados com dieta hiperlipídica com tadalafil na dose de 2 mg/kg promoveu um aumento importante na atividade da catalase, em relação aos animais alimentados com dieta hiperlipídica e não tratados e em relação, inclusive, aos animais alimentados com dieta padrão (Figura 20A).

7. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que os inibidores de fosfodiesterases roflumilast e tadalafil possuem potencial para serem utilizados no tratamento da obesidade e suas complicações. Entretanto, apesar de diversos estudos clínicos já terem sido realizados com inibidores de fosfodiesterases, diversos mecanismos relacionados aos benefícios desses fármacos ainda não foram totalmente elucidados.

Roflumilast (inibidor de PDE 4) e tadalafil (inibidor de PDE 5) preveniram de maneira significativa o ganho de peso corporal, com destaque para os efeitos antiobesogênicos do roflumilast. Ambos os tratamentos, nas duas doses utilizadas, promoveram melhorias significativas na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina demonstrando o efeito benéfico que esses inibidores de fosfodiesterases possuem sobre o metabolismo de glicose.

Os tratamentos com roflumilast e com tadalafil também foram eficazes na prevenção dos danos glico-oxidativos em animais obesos. Em animais alimentados com dieta HL e tratados com esses inibidores de fosfodiesterases, houve diminuição nos níveis de AGEs fluorescentes no plasma e nos rins, bem como diminuição nos níveis de TBARS em plasma, fígado e rins. Todos esses fatores podem ter contribuído sobremaneira para a proteção da atividade da enzima antioxidante PON 1, o que pode ser extremamente importante na atenuação das complicações cardiovasculares associadas às disfunções metabólicas.

Esse estudo avança no estado-da-arte dos inibidores de fosfodiesterases, reunindo evidências pré-clínicas acerca de seus benefícios nas alterações observadas na obesidade; tais evidências contribuem para novos estudos que tenham como objetivo contribuir para o reposicionamento de inibidores de PDE 4 e 5 para o tratamento da obesidade, diabetes mellitus e complicações associadas.

8. REFERÊNCIAS

Abbas G, Al-Harrasi AS, Hussain H, Hussain J, Rashid R, Choudhary MI. Antiglycation therapy: Discovery of promising antiglycation agents for the management of diabetic complications. **Pharm Biol.** 2016; 54: 198-206.

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Obesidade e síndrome metabólica. <https://abeso.org.br/conceitos/obesidade-e-sindrome-metabolica/>. Acesso em 19 de maio de 2021.

Andolfi C, Fisichella PM. Epidemiology of Obesity and Associated Comorbidities. **J Laparoendosc Adv Surg Tech A.** 2018; 28(8): 1-6.

Arcaro CA, Assis RP, Zanon NM, Paula-Gomes S, Navegantes LCC, Kettelhut IC, Brunetti IL, Baviera AM. Involvement of cAMP/EPAC/Akt signaling in the antiproteolytic effects of pentoxifylline on skeletal muscles of diabetic rats. **J Appl Physiol.** 2018; 124(3): 704-16.

Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat Rev Drug Discov.** 2004; 3: 673–683.

Assis R, Arcaro C, Gutierrez V, Oliveira J, Costa P, Baviera A, Brunetti I. Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of LDL oxidation and increases in HDL and paraoxonase levels in streptozotocin-diabetic rats. **Int J Mol Sci.** 2017; 18(4).

Baillie GS, Tejeda GS, Kelly MP. Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. **Nat Rev Drug Discov.** 2019; 18(10): 770-796.

Barreiro E, Puig-Vilanova E, Salazar-Degracia A, Pascual-Guardia S, Casadevall C, Gea J. The phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast reverts proteolysis in skeletal muscle cells of patients with COPD cachexia. **J Appl Physiol (1985).** 2018; 125(2): 287–303.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analyt Biochem.** 1971; 44: 276-87.

Beers RFJR, Sizer IW. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol Chem.** 1952; 195: 133-40.

Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. **Nat Rev Nephrol.** 2017; 13(10): 629-46.

Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovasc Res Oxford.** 1998; 37(3): 586-600.

Birkenfeld AL, Shulman GI. Non Alcoholic Fatty Liver Disease, Hepatic Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. **Hepatology.** 2014; 59(2): 713–23.

Blüher M. Konservative Therapie der Adipositas – wann und wie? **Dtsch Med Wochenschr.** 2015; 140: 24–28.

Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. **Br J Pharmacol.** 2006; 147: S252–S257.

Chistiakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. **Biochimie.** 2017; 132: 19-27.

Choi JS, Lee SE, Jang WS, Byeon JC, Park JS. Tadalafil solid dispersion formulations based on PVP/VA S-630: Improving oral bioavailability in rats. **Eur J Pharm Sci.** 2017; 106: 152–58.

Colombo G, Colombo MD, Schiavon LL, d'Acampora AJ. Phosphodiesterase 5 as target for adipose tissue disorders. **Nitric Oxide.** 2013; 5:186–192.

Cook JGH. Creatinine assay in the presence of protein. **Clin Chim Acta.** 1971; 32: 485-6.

Costa LG, McDonald BE, Murphy SD, Omenn GS, Richter RJ, Motulsky AG, Furlong CE. Serum Paraoxonase and its influence on paraoxon and chlorpyrifos-oxon toxicity in rats. **Toxicol Appl Pharmacol.** 1990; 103: 66-76.

de Freitas ES, da Silva PB, Chorilli M, Batista AA, de Oliveira Lopes E, da Silva MM, Leite CQ, Pavan FR. Nanostructured Lipid Systems as a Strategy to Improve the *in Vitro* Cytotoxicity of Ruthenium(II) Compounds. **Molecules.** 2014; 19: 5999-6008.

DrugBank. Roflumilast. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01656>. Acesso em: 30 de abril de 2021.

DrugBank. Tadalafil. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00820>. Acesso em: 30 de abril de 2021.

Duranti G, Ceci R, Sgrò P, Sabatini S, Di Luigi L. Influence of the PDE5 inhibitor tadalafil on redox status and antioxidant defense system in C2C12 skeletal muscle cells. **Cell Stress Chaperon.** 2017; 22(3): 389–396.

El-Badry M, Haq N, Feith G, Shakeel F. Solubility and Dissolution Enhancement of Tadalafil Using Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System. **J Oleo Sci.** 2014; 63(6): 567-76.

El-Mahdy NA, El-Sayad ME, El-Kadem AH. Combination of telmisartan with sildenafil ameliorate progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic model. **Biomed Pharmacother.** 2016; 81: 136-144.

Eli Lilly Canada Inc. CIALIS® (tadalafil) Product Monograph. Disponível em: <http://pi.lilly.com/ca/ cialis-ca-pm.pdf>. Acesso em: 03 de março de 2020.

Epstein PM, Basole C, Brocke S. The Role of PDE8 in T Cell Recruitment and Function in Inflammation. **Front Cell Dev Biol.** 2021; 9: 636778.

Francis SH, Houslay MD, Conti M. Phosphodiesterase inhibitors: factors that influence potency, selectivity, and action. **Handb Exp Pharmacol.** 2011; (204): 47-84.

Gassaway BM, Petersen MC, Surovtseva YV, Barber KW, Sheetz JB, Aerni HR, Merkel JS, Samuel VT, Shulman GI, Rinehart J. PKC ϵ contributes to lipid-induced insulin resistance through cross talk with p70S6K and through previously unknown regulators of insulin signaling. **Proc Natl Acad Sci.** 2018; 115(38): E8996-E9005.

Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res.** 2010; 107(9): 1058–1070.

González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF, Moreno LA, Bray GA, Martinez JA. Obesity. **Nat Rev Dis Primers.** 2017; 3(17034): 1-18.

Governo do Brasil. Brasileiros atingem maior índice de obesidade nos últimos treze anos. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45612-brasileiros-atingem-maior-indice-de-obesidade-nos-ultimos-treze-anos>. Acesso em: 29 de fevereiro de 2020.

Harcourt BE, Sourris KC, Coughlan MT, Walker KZ, Dougherty SL, Andrikopoulos S, Morley AL, Thallas-Bonke V, Chand V, Penfold SA, de Courten MP, Thomas MC, Kingwell BA, Bierhaus A, Cooper ME, de Courten B, Forbes JM. Targeted reduction of advanced glycation improves renal function in obesity. **Kidney Int.** 2011; 80(2): 190-8.

Hatzelmann A, Schudt C. Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. **J Pharmacol Exp Ther.** 2001; 297: 267–279.

Ho JE, Arora P, Walford GA, Ghorbani A, Guanaga DP, Dhakal B, Nathan DI, Buys ES, Florez JC, Newton-Cheh C, Lewis GD, Wang TJ. Effect of Phosphodiesterase Inhibition on Insulin Resistance in Obese Individuals. **J Am Heart Assoc.** 2014; 3:1-9.

Hughson MD, Hoy WE, Douglas-Denton RN, Zimanyi MA, Bertram JF. Towards a definition of glomerulomegaly: clinical-pathological and methodological considerations. **Nephrol Dial Transplant.** 2011; 26(7): 2202-8.

Hill KD, Eckhauser AW, Marney A, Brown NJ. Phosphodiesterase 5 inhibition improves beta-cell function in metabolic syndrome. **Diabetes Care**. 2009; 32(5): 857-859.

Inácio MD, Costa MC, Lima TFO, Figueiredo ID, Motta BP, Spolidorio LC, Assis RP, Brunetti IL, Baviera AM. Pentoxifylline mitigates renal glycoxidative stress in obese mice by inhibiting AGE/RAGE signaling and increasing glyoxalase levels. **Life Sci**, 2020; 258:118196.

Johann K, Reis MC, Harder L, Herrmann B, Gachkar S, Mittag J, Oelkrug R. Effects of sildenafil treatment on thermogenesis and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. **Nutr Diabetes**. 2018; 8(1): 9.

Jourdan JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P. Drug repositioning: a brief overview. **J Pharm Pharmacol**. 2020; 72(9): 1145-1151.

Kasper M, Funk RH. Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs). **Arch Gerontol Geriatr**. 2001; 32(3): 233-43.

Keravis T, Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signaling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. **Br J Pharmacol**. 2012; 165: 1288–1305.

Klinger JR, Kadowitz PJ. The Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Vascular Disease. **Am J Cardiol**. 2017; 120(8S): S71-S79.

Kohn HI, Liversedge M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **J Pharmacol Exp Ther**. 1944; 82: 292-300.

Koka S, Aluri HS, Xi L, Lesnefsky EJ, Kukreja RC. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 with tadalafil attenuates mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic hearts: potential role of NO/SIRT1/PGC-1 α signaling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2014; 306(11): H1558–H1568.

Kotur-Stevuljević J, Vekić J, Stefanović A, Zeljković A, Ninić A, Ivanišević J, Miljković M, Sopić M, Munjas J, Mihajlović M, Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. Paraoxonase 1 and atherosclerosis-related diseases. **Biofactors**. 2020; 46(2): 193-205.

Kraynik SM, Miyaoka RS, Beavo JA. PDE3 and PDE4 isozyme-selective inhibitors are both required for synergistic activation of brown adipose tissue. **Mol Pharmacol**. 2013; 83(6): 1155–1165.

Kuno Y, Iyoda M, Shibata T, Hirai Y, Akizawa T. Sildenafil, a phosphodiesterase type 5 inhibitor, attenuates diabetic nephropathy in non-insulin-dependent Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. **Br J Pharmacol**. 2011; 162: 1389–1400.

Langedijk J, Mantel-Teeuwisse AK, Slijkerman DS, Schutjens MH. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. **Drug Discov Today**. 2015; 20(8):1027-34.

Lin CH, Chang SH, Fang JY. Recent Advances Using Phosphodiesterase 4 (PDE4) Inhibitors to Treat Inflammatory Disorders: Animal and Clinical Studies. **Curr Drug Ther**. 2016; 11(1): 21-40.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 1951; 193: 265-275.

Lugnier C, Meyer A, Talha S, Geny B. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: New targets in the metabolic syndrome? **Pharmacol Ther**. 2020; 208: 107475.

Mandosi E, Giannetta E, Filardi T, Lococo M, Bertolini C, Fallarino M, Gianfrilli D, Venneri MA, Lenti L, Lenzi A, Morano S. Endothelial dysfunction markers as a therapeutic target for Sildenafil treatment and effects on metabolic control in type 2 diabetes. **Expert Opin Ther Targets**. 2015; 19(12): 1617-1622.

Maneschi E, Cellai I, Aversa A, Mello T, Filippi S, Comeglio P, Bani D, Guasti D, Sarchielli E, Salvatore G, Morelli A, Mazzanti B, Corcetto F, Corno C, Francomano D,

Galli A, Vannelli GB, Lenzi A, Mannucci E, Maggi M, Vignozzi L. Tadalafil reduces visceral adipose tissue accumulation by promoting preadipocytes differentiation towards a metabolically healthy phenotype: Studies in rabbits. **Mol Cell Endocrinol.** 2016; 424: 50-70.

Mátyás C, Németh BT, Oláh A, Török M, Ruppert M, Kellermayer D, Barta BA, Szabó G, Kökény G, Horváth EM, Bódi B, Papp Z, Merkely B, Radovits T. Prevention of the development of heart failure with preserved ejection fraction by the phosphodiesterase-5A inhibitor vardenafil in rats with type 2 diabetes. **Eur J Heart Fail.** 2017; 19: 326-336.

Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nat Rev Drug Discov.** 2014; 13(4): 290-314.

Mitschke MM, Hoffmann LS, Gnad T, Scholz D, Kruithoff K, Mayer P, Haas B, Sassmann A, Pfeifer A, Kilić A. Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. **FASEB J.** 2013; 27: 1621-1630.

Möllmann J, Kahles F, Lebherz C, Kappel B, Baeck C, Tacke F, Werner C, Federici M, Marx N, Lehrke M. The PDE4 inhibitor roflumilast reduces weight gain by increasing energy expenditure and leads to improved glucose metabolism. **Diabetes Obes Metab.** 2017; 19: 496–508.

Montanari T, Pošćić N., Colitti M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. **Obes Rev.** 2017; 18: 495-513.

Mroz JR. Clinical Enzimology. In: Anderson SC, Cockayne S (eds). **Clinical Chemistry Concepts & Applications.** chapter 11, Mc Graw-Hill, 179-202, 2003.

Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **J Basic Clin Pharm.** 2016; 7(2): 27–31.

Nio Y, Ookawara M, Yamasaki M, Hanauer G, Tohyama K, Shibata S, Sano T, Shimizu F, Anayama H, Hazama M, Matsuo T. Ameliorative effect of phosphodiesterase 4 and 5 inhibitors in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive uni-nephrectomized KKA^y mice. **FASEB J.** 2020; 34(11): 14997-15014.

Nissar AU, Tasduq SA. Endoplasmic reticulum stress and Oxidative stress in the pathogenesis of Non-alcoholic fatty liver disease. **Free Radic Res.** 2015; 49(12): 1405-18.

Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules.** 2015; 5: 194-222.

Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of Liver and Muscle Insulin Resistance Induced by Chronic High-Fat Feeding. **Diabetes.** 1997; 46(11): 1768-74.

Onyango AN. Cellular Stresses and Stress Responses in the Pathogenesis of Insulin Resistance. **Oxid Med Cell Longev.** 2018; 2018: ID 4321714, 27p.

Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biol.** 2014; 2: 411-29.

Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A, Iwakoshi NN, Özdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. **Science.** 2004; 306(5695): 457-61.

Park HJ, Lee JH, Park YH, Han H, Sim DW, Park KH, Park JW. Roflumilast Ameliorates Airway Hyperresponsiveness Caused by Diet-Induced Obesity in a Murine Model. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2016; 55(1): 82–91.

Pfeifer A, Kilić A, Hoffmann LS. Regulation of metabolism by cGMP. **Pharmacol Ther.** 2013; 140(1): 81-91.

Pokupec R, Kalauz M, Turk N, Turk Z. Advanced glycation end products in human diabetic and non-diabetic cataractous lenses. **Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.** 2003; 241: 378-384.

Priyanka K, Singh S, Gill K. Paraoxonase 3: Structure and Its Role in Pathophysiology of Coronary Artery Disease. **Biomolecules.** 2019; 9(12): 817.

Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. **Circ Cardiovasc Genet.** 2008; 1(2): 147-152.

Rifai N, Warnick GR. Lipids, lipoproteins, Apolipoproteins, and other cardiovascular risk factors. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds). **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**, 4^a ed., Elsevier S., 903-81, 2006.

Romão GB. Estudo *in vitro* da ação de extrato hidroetanólico de *Cordia verbenacea* DC. em espécies reativas de oxigênio de importância biológica [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista; 2016. 118p.

Rush JW, Sandiford SD. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. **Clin Biochem.** 2003; 36: 345-51.

Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. **J Biol Chem.** 2004; 279: 32345–32353.

Sanders FWB, Griffin JL. De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. **Biol Rev.** 2016; 91: 452–68.

Santi D, Giannetta E, Isidori AM, Vitale C, Aversa A, Simoni M. Effects of chronic use of phosphodiesterase inhibitors on endothelial markers in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. **Eur J Endocrinol.** 2015; 172: R103–R114.

Schinner E, Wetzl V, Schlossmann J. Cyclic nucleotide signalling in kidney fibrosis. **Int J Mol Sci.** 2015; 16: 2320-2351.

Schwartz BG, Jackson G, Stecher VJ, Campoli-Richards DM, Kloner RA. Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors Improve Endothelial Function and May Benefit Cardiovascular Conditions. **Am J Med.** 2013; 126(3): 192-99.

Seifert R, Schneider EH, Bähre H. From canonical to non-canonical cyclic nucleotides as second messengers: pharmacological implications. **Pharmacol Ther.** 2015; 148: 154-84.

Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Bednorz M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N. Cigarette Smoke-Induced Emphysema and Pulmonary Hypertension Can Be Prevented by Phosphodiesterase 4 and 5 Inhibition in Mice. **PLoS One.** 2015; 10(6): e0129327.

Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2020; 21(7): 363-383.

Silva JA, Santana DP, Bedor DGC, Borba VFC, Lira AAM, Egito EST. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Quím Nova.** 2009; 32(6): 1389-1393.

Singh R, Lillard JW Jr. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Exp Mol Pathol.** 2009; 86(3): 215-223.

Tilg H, Moschen AR, Roden M. NAFLD and diabetes mellitus. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** 2016; 14(1): 32-42.

Tomino Y, Hagiwara S, Gohda T. AGE-RAGE interaction and oxidative stress in obesity-related renal dysfunction. **Kidney Int.** 2011; 80(2): 133-5.

Tomita N, Hotta Y, Naiki-Ito A, Hirano K, Kataoka T, Maeda Y, Takahashi S, Kimura K. The phosphodiesterase 5 inhibitor tadalafil has renoprotective effects in a rat model of chronic kidney disease. **Physiol Rep.** 2020; 8(17): e14556.

Trinder P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **J Clin Pathol.** 1969; 22: 158-61.

U.S. National Library of Medicine. PDE5 Inhibition for Obesity-Related Cardiometabolic Dysfunction. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02819440>. Acesso em: 26 de novembro de 2020.

United nations. Department of Economic and Social Affairs. Sustainable Development/ The goals: <https://sdgs.un.org/goals>. Acesso em: 19 de maio de 2021.

Vollert S, Kaessner N, Heuser A, Hanauer G, Dieckmann A, Knaack D, Kley HP, Beume R, Weiss-Haljiti C. The glucose-lowering effects of the PDE4 inhibitors roflumilast and roflumilast-N-oxide in db/db mice. **Diabetologia.** 2012; 55: 2779–88.

Xu J, Kitada M, Ogura Y, Koya D. Relationship Between Autophagy and Metabolic Syndrome Characteristics in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Front Cell Dev Biol.** 2021; 9:641852.

Waddleton D, Wu W, Feng Y, Thompson C, Wu M, Zhou YP, Howard A, Thornberry N, Li J, Mancini JA. Phosphodiesterase 3 and 4 comprise the major cAMP metabolizing enzymes responsible for insulin secretion in INS-1 (832/13) cells and rat islets. **Biochem Pharmacol.** 2008; 76: 884–93.

Wahlang B, McClain C, Barve S, Gobejishvili L. Role of cAMP and phosphodiesterase signaling in liver health and disease. **Cell Signal.** 2018; 49:105-15.

Whaley-Connell A, Sowers JR. Insulin Resistance in Kidney Disease: Is There a Distinct Role Separate from That of Diabetes or Obesity? **Cardiorenal Med.** 2018; 8: 41–9.

Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2004; 5(12): 959-970.

World Health Organization. Obesity and overweight. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 19 de maio de 2021.

World Obesity. Obesity and the SDGs: an opportunity hidden in plain sight: <http://www.worldobesity.org/news/blog-obesity-and-the-sdgs-an-opportunity-hidden-in-plain-sight>. Acesso em 19 de maio de 2021.

Wouters EFM, Bredenbröker D, Teichmann P, Brose M, Rabe, KF, Fabbri LM, Göke B. Effect of the Phosphodiesterase 4 Inhibitor Roflumilast on Glucose Metabolism in Patients with Treatment-Naive, Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.** 2012; 97(9): E1720–E1725.

Wroblewski F, Ladue JS. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac with hepatic disease. **Proc Soc Exp Biol Med.** 1956; 91: 569-71.

Wu C, Rajagopalan S. Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic strategy for metabolic disorders. **Obes Rev.** 2016; 17(5): 429-41.

Wysocka A, Zwolak A. The Relevance of Noncoding DNA Variations of Paraoxonase Gene Cluster in Atherosclerosis-Related Diseases. **Int J Mol Sci.** 2021; 22(4): 2137.

Zhang X, Ji J, Yan G, Wu J, Sun X, Shen J, Jiang H, Wang H. Sildenafil promotes adipogenesis through a PKG pathway. **Biochem Biophys Res Commun.** 2010; 396(4): 1054–1059.

Zhang Y, Chen ML, Zhou Y, Yi L, Gao YX, Ran L, Chen SH, Zhang T, Zhou X, Zou D, Wu B, Wu Y, Chang H, Zhu JD, Zhang QY, Mi MT. Resveratrol improves hepatic steatosis by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway. **Mol Nutr Food Res.** 2015; 59: 1443-57.

Zilin S, Naifeng L, Bicheng L, Jiping W. The determination of AGE-peptides by flow injection assay, a practical marker of diabetic nephropathy. **Clin Chim Acta.** 2001; 313: 69-75.

9. ANEXO 1: Protocolo CEUA/FCF/CAr: 24/2017



CERTIFICADO

*** Torna sem efeito o certificado expedido em 07 de novembro de 2017.**

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos dos inibidores de fosfodiesterases, roflumilast e tadalafil, sobre as alterações fisiometabólicas e biomarcadores do estresse glico-oxidativo em modelo de obesidade e resistência à insulina", registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAr: 24/2017, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Amanda Martins Baviera – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado ad referendum pela Coordenadora da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP em 04 de dezembro de 2019.

Vigência da autorização	Julho de 2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico/C57BL6/J
Nº de animais	179
Peso/Idade	3 a 4 semanas/ 20 g
Sexo	Machos
Origem	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB – UNICAMP
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 10 de dezembro de 2019.

Prof Dr Marcelo Tadeu Marin
Coordenador da CEUA