

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 25/06/2025.



**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

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

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

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 glutathiona 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	20
Figura 2. Reações de formação de ERO e ação das enzimas antioxidantes CAT e SOD.....	20
Figura 3. Via de sinalização do AMPc.....	26
Figura 4. Via de sinalização do GMPc	27
Figura 5. Estrutura química do roflumilast.....	28
Figura 6. Estrutura química do tadalafil	29
Figura 7. Delineamento experimental do piloto realizado para escolha do sistema lipídico nanoestruturado mais adequado para veiculação dos inibidores de fosfodiesterase.....	34
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.....	36
Figura 9. Curva de calibração de 1,1,3,3-TMP ($\mu\text{mol/L}$) e leituras realizadas em (A) espectrofluorímetro e (B) espectrofotômetro	41
Figura 10. Curva de calibração de albumina ($\mu\text{g/mL}$)	44
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)	48
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)	50
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) 52

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) 55

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) 56

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) 59

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) 60

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) 61

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) 63

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) 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Famílias de fosfodiesterase, seus respectivos substratos e os principais tecidos de expressão das PDE	25
Tabela 2. Composição da dieta padrão (P) e da dieta hiperlipídica (HL)	33
Tabela 3. Tamanhos das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta para os sistemas lipídicos nanoestruturados	45
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.	46
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).....	52
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).....	53

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	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. Obesidade e resistência à insulina.....	16
2.2. Estresse oxidativo	17
2.3. Formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs)	19
2.4. Fígado	20
2.5. Rins	21
2.6. Fosfodiesterases.....	22
2.6.1. Inibidores de fosfodiesterases	25
2.7. Reposicionamento de fármacos	27
2.8. Nanopartículas	28
3. OBJETIVO GERAL	29
3.1. Objetivos específicos	29
7. CONCLUSÃO	30
8. REFERÊNCIAS	31
9. ANEXO 1: Protocolo CEUA/FCF/CAR: 24/2017	44

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).

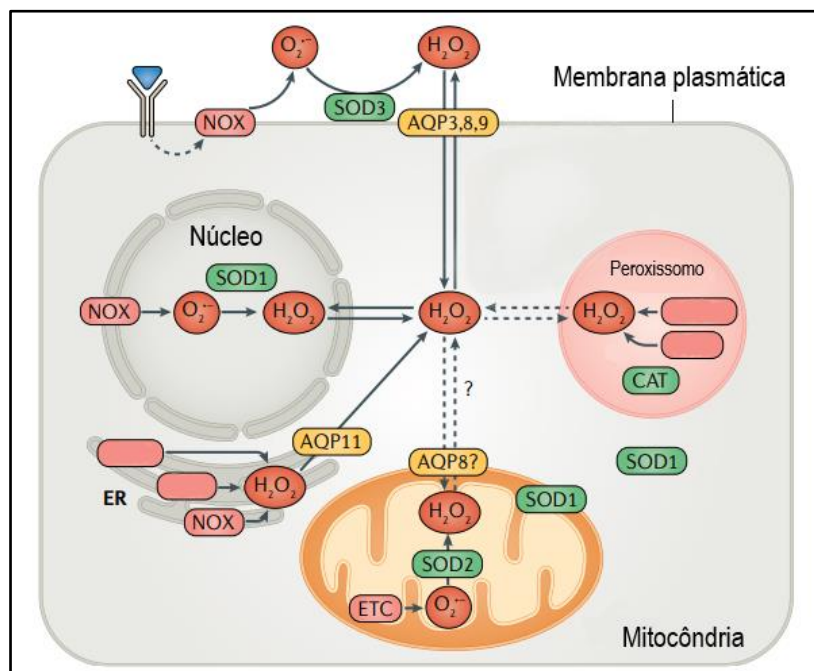


Figura 1. Principais organelas envolvidas na geração de ERO intracelular e localização das enzimas antioxidantes. AQP: canais de aquaporina / peroxiporinas; CAT: catalase; ER: retículo endoplasmático, (*endoplasmic reticulum*); ETC: cadeia transportadora de elétrons (*electron transport chain*); Nox: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

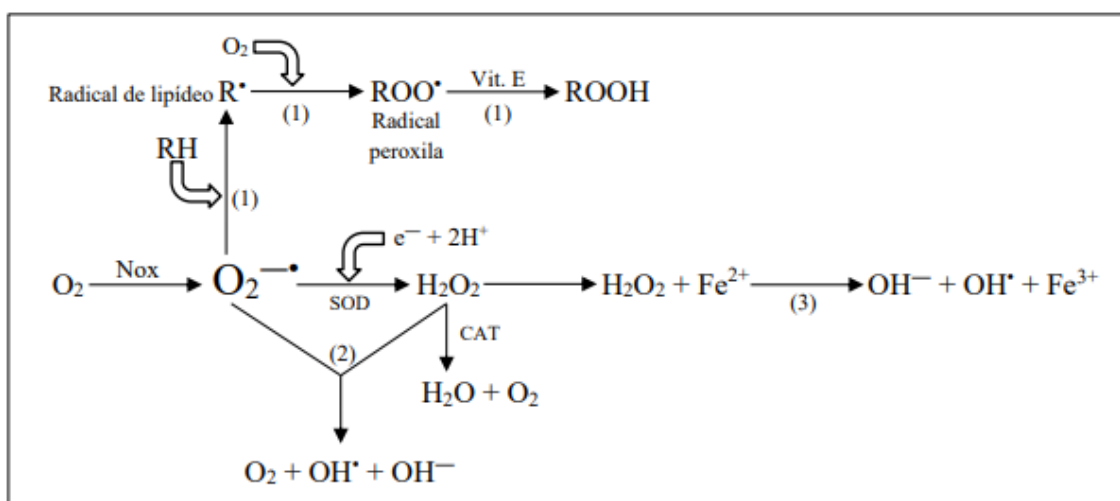


Figura 2. Reações de formação de ERO e ação das enzimas antioxidantes CAT e SOD. (1) Lipoperoxidação; (2) reação de Haber-Weiss; (3) reação de Fenton; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; Nox: NADPH oxidase neutrofílica. **Fonte:** Romão, 2016.

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 carbonílicos 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 dicarbonílicos altamente reativos: glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicosona. Estas dicarbonílicas, 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).

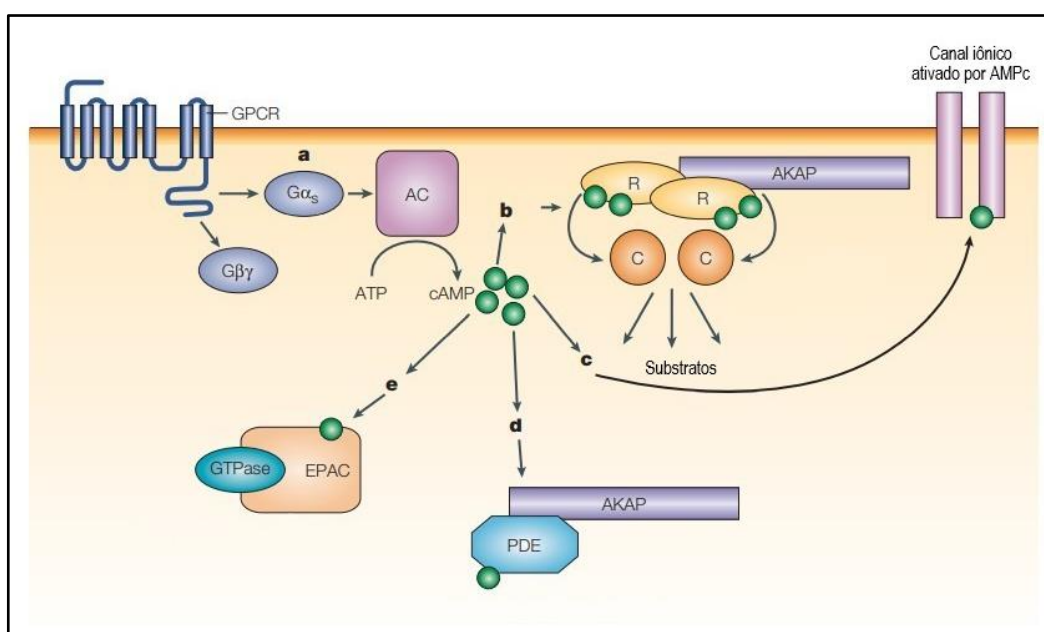


Figura 3. Via de sinalização do AMPc. **a:** a subunidade $G\alpha_s$ da proteína G ativa a enzima adenilato ciclase (AC), a qual converte ATP a AMPc; **b:** o AMPc se liga às subunidades regulatórias (R) da proteína quinase A (PKA), liberando as subunidades catalíticas (C) da enzima; **c:** ativação 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).

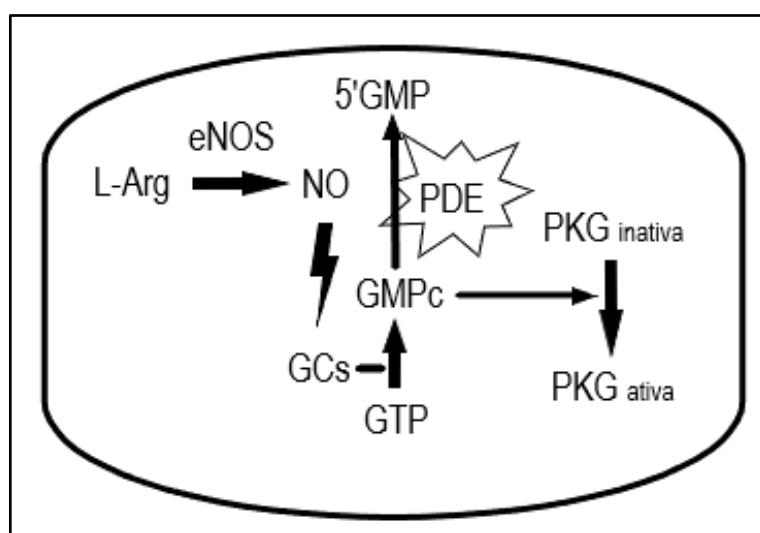


Figura 4. Via de sinalização do GMPc. L-Arg: L-Arginina; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; NO: óxido nítrico; GCs: guanilato ciclase citoplasmática; GTP: guanosina trifosfato; GMPc: guanosina monofosfato cíclico; 5'GMP: guanosina monofosfato (forma não cíclica); PDE: fosfodiesterase; PKG: proteína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

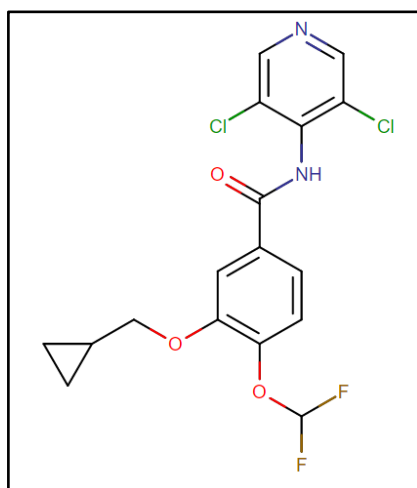


Figura 5. Estrutura química do roflumilast. **Fonte:** Drugbank, 2021.

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).

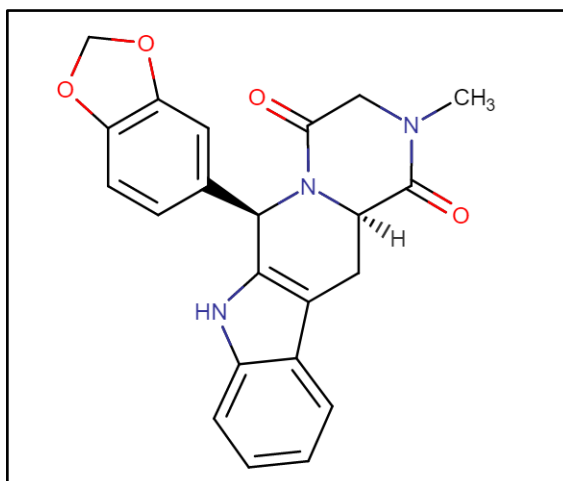


Figura 6. Estrutura química do tadalafil. **Fonte:** Drugbank, 2021.

2.7. Reposicionamento de fármacos

Roflumilast e tadalafil são interessantes candidatos para serem reposicionados ao tratamento de disfunções metabólicas. O reposicionamento de fármacos consiste na descoberta de novas indicações para medicamentos, além daquelas indicações previstas em bula e que, portanto, já foram estudadas e aprovadas (Ashburn e Thor, 2004). Essa estratégia é vantajosa, já que a descoberta de novas moléculas e todo o processo de lançamento de um medicamento inédito é oneroso e demanda um longo tempo. Para o reposicionamento de fármacos também é necessária realização de estudos clínicos. No entanto, o reposicionamento continua sendo vantajoso, pois o medicamento já foi aprovado para uso, portanto é comprovadamente seguro e eficaz (Langedijk *et al.*, 2015; Arcaro *et al.*, 2018).

Um dos mais famosos exemplos de reposicionamento é o inibidor de PDE 5 sildenafil. Na fase de pesquisa e desenvolvimento, a indústria farmacêutica Pfizer planejava um novo medicamento anti-hipertensivo, até que durante os estudos clínicos identificaram como efeito adverso casos de ereção. A Pfizer decidiu então por reposicionar o sildenafil (Viagra®) e comercializá-lo como tratamento para disfunção erétil, revolucionando este mercado (Jourdan *et al.*, 2020).

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.

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