

Giovani Colombo

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA DIETA E DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE 5 TADALAFIL NAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS, ÓXIDO NÍTRICO E PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA NO TECIDO ADIPOSE DE RATOS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médicas

Orientador:
Prof. Dr. Armando José d'Acampora

Co-orientador:
Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Colombo, Giovani

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA DIETA E DO INIBIDOR DA
FOSFODIESTERASE 5 TADALAFIL NAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS, ÓXIDO NÍTRICO E PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO
AVANÇADA NO TECIDO ADIPOSEO DE RATOS / Giovani Colombo ;
orientador, Armando José d'Acampora ; coorientador,
Leonardo de Lucca Schiavon. - Florianópolis, SC, 2014.
96 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Tecido adiposo. 3. Inflamação.
4. Óxido nítrico. 5. Estresse oxidativo. I. d'Acampora,
Armando José . II. Schiavon, Leonardo de Lucca . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas. IV. Título.

Giovani Colombo

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA DIETA E DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE 5 TADALAFIL NAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS, ÓXIDO NÍTRICO E PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA NO TECIDO ADIPOSEO DE RATOS

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas,

Área de concentração: Investigação Biomédica.

Florianópolis, 22 de setembro de 2014.

Prof.^a Dr.^a Tânia Silvia Fröde

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Armando José d’Acampora

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Leonardo de Lucca Schiavon

Co-Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol

Universidade do Extremo Sul Catarinense

Prof.^a Dr.^a Janaína Luz Narciso Schiavon

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Jane da Silva

Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Rosemeri Maurici da Silva

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Tânia Silvia Fröde

Universidade Federal de Santa Catarina

Para minha avó, que não media esforços nem era intimidada pelo cansaço para alcançar o que queria.

AGRADECIMENTOS

À Daniela, Elisa e Stella pela presença constante, mesmo quando não estavam ao meu lado.

Aos animais que tornaram possível este trabalho.

“Sou artista o suficiente para desenhar livremente em minha imaginação, que considero mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado, a imaginação abarca o mundo”.

Albert Einstein, 1931.

RESUMO

Introdução: Nas últimas décadas, descobriu-se que o adipócito era capaz de secretar adipocinas e citocinas com funções autócrinas, parácrinas e sistêmicas, que influenciavam de maneira importante, todo o metabolismo dos organismos vivos. Dentre os fatores associados aos distúrbios da biologia do adipócito, podemos destacar o estresse oxidativo, intimamente relacionado à formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Esparsos trabalhos na literatura têm procurado elucidar o papel da via do óxido nítrico (NO^*) na fisiologia do tecido adiposo. Essa via, por meio do aumento das concentrações de guanosina 3'5' monofosfato cíclico (GMPc), promove efeitos positivos na biologia do adipócito, e conseqüentemente maior equilíbrio no balanço energético e metabolismo sistêmicos. Outra maneira de incrementar as concentrações de GMPc é por meio da administração de inibidores da fosfodiesterase 5, medicamentos que no futuro talvez sejam úteis nos distúrbios do tecido adiposo, como a obesidade, e suas conseqüências. **Objetivos:** Identificar o impacto de uma dieta hipercalórica e hiperlipídica (dieta de cafeteria) sobre a variação do peso corporal, a ingestão alimentar, a resistência à ação da insulina, as concentrações séricas de adiponectina, bem como nas concentrações de fator de necrose tumoral α ($\text{TNF}\alpha$), interleucina 6 (IL-6), NO^* e AGEs no tecido adiposo visceral. Analisar o efeito do tadalafil na intensidade da resistência à insulina, nas concentrações séricas de adiponectina, assim como nas concentrações de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 e AGEs no tecido adiposo visceral. **Métodos:** Estudo analítico experimental controlado e com intervenção, envolvendo um total de 72 ratos machos *Wistar*, distribuídos em 06 subgrupos de 12 animais: subgrupo ração salina – SGRS, recebeu ração e solução salina; subgrupo ração tadalafil - SGRT, recebeu ração e tadalafil; subgrupo ração magro - SGRM, recebeu ração e solução salina; subgrupo cafeteria salina - SGCS, recebeu dieta de cafeteria e solução salina; subgrupo cafeteria tadalafil – SGCT, recebeu dieta de cafeteria e tadalafil e subgrupo cafeteria magro – SGCM, recebeu dieta de cafeteria e solução salina. O estudo teve a duração de 10 semanas, e o peso dos animais e a ingestão alimentar foram registrados semanalmente. Foram mensuradas as concentrações séricas de insulina e adiponectina, bem como as concentrações de $\text{TNF}\alpha$, IL-6, nitrito (metabólito do NO^*) e compostos de Maillard (equivalente aos AGEs) no tecido adiposo, sendo que todo o material foi coletado no momento do sacrifício dos animais. Na análise estatística foram empregados os testes ANOVA *one way* com correção de Tukey,

ANOVA *two way* e teste t pareado. **Resultados:** Foi observado um aumento significativo do peso corporal ao longo do estudo em todos os subgrupos. A média de peso final aos 60 dias foi superior nos animais alimentados com dieta de cafeteria. A ingestão alimentar em gramas foi maior nos animais alimentados com ração. Os animais alimentados com dieta de cafeteria apresentavam uma maior expansão do tecido adiposo. As médias do modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR) entre os subgrupos no final do acompanhamento não foram diferentes. A proporção da adiponectina sérica em relação ao tecido adiposo total foi maior nos animais que receberam dieta balanceada, e as concentrações de IL-6 foram maiores nos animais que receberam dieta de cafeteria. A concentração de nitrito foi maior nos animais submetidos à dieta balanceada. As concentrações médias de compostos de Maillard foram maiores nos animais submetidos à dieta de cafeteria e nos animais de maior peso. Nos animais submetidos à dieta de cafeteria e tadalafil a concentração de compostos de Maillard foi menor. **Conclusão:** A dieta de cafeteria por 60 dias, apesar de mais sacietógena, levou a uma média de peso ponderal e tecido adiposo visceral superiores nos animais a ela submetidos sem, no entanto, induzir a um aumento expressivo da resistência à ação da insulina. Apesar da expansão do tecido adiposo total, a dieta de cafeteria não foi capaz de aumentar proporcionalmente as concentrações de adiponectina, sugerindo a interferência de outros fatores na fisiologia desta adipocina. O aumento das concentrações de IL-6, no tecido adiposo visceral dos animais alimentados com dieta de cafeteria, indica um provável incremento no processo inflamatório local. A diminuição dos níveis de nitrito no tecido adiposo dos animais submetidos à dieta de cafeteria sugere um prejuízo à via do óxido nítrico, enquanto o aumento das concentrações de compostos de Maillard, e, por consequência de AGEs, uma intensificação do processo oxidativo. Outro fator relacionado aos compostos de Maillard foi o peso, já que os animais de menor peso apresentavam também uma concentração menor destes compostos. O uso do tadalafil não foi eficaz na redução da resistência à insulina, no aumento das concentrações séricas de adiponectina e na diminuição das concentrações de citocinas inflamatórias no tecido adiposo. No entanto, o tadalafil mostrou-se capaz de reduzir a concentração de AGEs no tecido adiposo de animais submetidos à dieta de cafeteria, sugerindo um possível efeito favorável sobre o estresse oxidativo.

Palavras-chave: Tecido adiposo. Adiponectina. Inflamação. Óxido nítrico. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: In recent decades, new discoveries demonstrated that the adipocytes were capable of secreting adipokines and cytokines with autocrine, paracrine and systemic functions, which influenced in important ways throughout the metabolism of living organisms. Among the factors associated with adipocyte biology disorders we can highlight oxidative stress, closely related to the advanced glycation end products (AGEs) formation. Few studies have sought to elucidate the role of nitric oxide (NO[•]) in the adipose tissue physiology. This pathway increases the titles of guanosine 3'5' cyclic monophosphate (cGMP), ultimately bringing positive effects on adipocyte biology, and consequently greater balance in energy control and systemic metabolism. Another way to increase cGMP levels is through the administration of phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitors, drugs that may be useful in the future in adipose tissue disorders, such as obesity and its consequences. **Objectives:** To identify the impact of a hypercaloric and hyperlipidic diet (cafeteria diet) on body weight variation, food intake, insulin resistance, serum adiponectin levels and visceral adipose tissue levels of tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 6 (IL-6), NO[•], and AGEs. To analyze the consequences of the administration of tadalafil in the intensity of insulin resistance, serum adiponectin levels, as well as visceral adipose tissue levels of TNF α , IL-6, and AGEs. **Methods:** Analytical controlled experimental intervention study involving a total of 72 male Wistar rats, divided into 06 subgroups of 12 animals: chow-saline subgroup (CSG) received chow and saline; chow-tadalafil subgroup (CTG) received chow and tadalafil; chow lean subgroup (CLG) received chow and saline; cafeteria diet-saline subgroup (CafSG) received cafeteria diet and saline; cafeteria diet-tadalafil subgroup (CafTG) received cafeteria diet and tadalafil; and cafeteria diet-saline lean subgroup (CafLG) received cafeteria diet and saline. The study lasted 10 weeks and weight gain and food intake were recorded weekly. Insulin and adiponectin levels were detected in serum. The concentrations of TNF α , IL-6, nitrite (NO[•] metabolite) and Maillard compounds (AGEs equivalent) were detected in adipose tissue. All the samples for testing were collected at the time of animals' sacrifice. In statistical analysis, one-way ANOVA test with Tukey correction, two-way ANOVA, and paired t test were applied. **Results:** A significant increase of body weight throughout the study was observed in all subgroups. The mean final weight at 60 days was higher in animals fed

cafeteria diet. Food intake in grams was higher in animals fed with chow at many times of the study. Animals fed the cafeteria diet had greater expansion of epididymal and retroperitoneal adipose tissue. The mean homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA -IR) between subgroups at the end of follow-up was not different. The serum adiponectin levels in relation to total adipose tissue were higher in animals fed a balanced diet, and the IL-6 levels were higher in animals fed cafeteria diet. The nitrite concentration was higher in animals subjected to balanced diet. Mean levels of Maillard compounds were higher in animals subjected to the cafeteria diet, and in the animals with the highest weight. In animals submitted to the cafeteria diet and tadalafil, concentration of Maillard compounds was lower. **Conclusion:** Cafeteria diet for 60 days, although more satiating, led to a higher mean total weight and visceral adipose tissue in animals that were submitted to it, without, however, resulting in a significant increase in insulin resistance. Despite the total adipose tissue expansion, cafeteria diet was not able to proportionally increase adiponectin levels, suggesting the influence of other factors in this adipokine production. Increased levels of visceral adipose tissue IL-6 of animals fed cafeteria diet indicate a probable increase in the local inflammatory process. The decreased adipose tissue nitrite levels of animals subjected to the cafeteria diet suggest injury to the nitric oxide pathway, while increased Maillard compounds levels, and consequently of AGEs, an intensification of the oxidative process. Another factor related to Maillard compounds was the weight of the animals, as leaner animals showed lower concentration of these compounds. The use of tadalafil was not effective in reducing insulin resistance, increasing adiponectin levels, and decreasing inflammatory cytokines in adipose tissue. However tadalafil was capable of reducing AGEs levels in the adipose tissue of animals fed cafeteria diet, suggesting a possible favorable effect on oxidative stress.

Keywords: Adipose Tissue. Adiponectin. Inflammation. Nitric oxide. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Via do óxido nítrico na fisiologia do adipócito.....	38
Figura 2:	Resultados dos trabalhos sobre a intervenção da via do óxido nítrico no tecido adiposo branco.....	41
Figura 3:	Divisão dos grupos experimentais.....	50
Figura 4:	Evolução das médias dos pesos em gramas nos diferentes subgrupos nos primeiros 30 dias do estudo.....	59
Figura 5:	Evolução das médias dos pesos em gramas nos diferentes subgrupos do 30º ao 60º dia do estudo.....	60
Figura 6:	Evolução das médias dos pesos em gramas nos diferentes subgrupos do 60º ao 75º dia do estudo.....	61
Figura 7:	Ingestão alimentar (Média \pm Desvio Padrão) nos diferentes subgrupos nos primeiros 30 dias do estudo.....	62
Figura 8:	Ingestão alimentar (Média \pm Desvio Padrão) nos diferentes subgrupos do 30º ao 60º dia do estudo.....	63
Figura 9:	Ingestão alimentar (Média \pm Desvio Padrão) nos diferentes subgrupos do 60º ao 75º dia do estudo.....	64
Figura 10:	HOMA-IR (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos diferentes subgrupos.....	66
Figura 11:	Adiponectina (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos diferentes subgrupos.....	67
Figura 12:	TNF α (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos diferentes subgrupos.....	68
Figura 13:	IL-6 (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos diferentes subgrupos.....	69

Figura 14: Nitrito (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos diferentes subgrupos.....	70
Figura 15: Compostos de Maillard (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos diferentes subgrupos.....	71
Figura 16: Compostos de Maillard (Média ± Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos diferentes subgrupos sem intervenção.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gordura visceral e subcutânea em gramas (Média \pm Desvio Padrão) ao final do acompanhamento nos diferentes subgrupos.....	65
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACRP30	<i>Complement-Related Protein of 30</i> Proteína do Adipócito Relacionada ao Complemento
AdipoR1	<i>Adiponectin Receptor 1</i> Receptor de Adiponectina tipo 1
AdipoR2	<i>Adiponectin Receptor 2</i> Receptor de Adiponectina tipo 2
ADP	Adenosina Difosfato
AGEs	<i>Advanced Glycation End Products</i> Produtos Finais de Glicação Avançada
AMP	Adenosina Monofosfato
AMPK	<i>5' AMP-Activated Protein Kinase</i> Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato
ANP	<i>Atrial Natriuretic Peptide</i> Peptídeo Natriurético Atrial
ATP	Adenosina Trifosfato
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i> Tecido Adiposo Marrom
CEBP	<i>CCAAT-Enhancer-Binding Proteins</i> Proteína Estimuladora de Ligação a CCAAT
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DE	Disfunção Erétil
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica

FAS	<i>Fatty Acid Synthase</i> Sintase do Ácido Graxo
GCs	Guanilato Ciclase Solúvel
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
G3PDH	Glicerol 3 Fosfato Desidrogenase
G6P	Glicose-6-Fosfato
G6PDH	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
GTP	Guanosina Trifosfato
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i> Lipoproteína de Alta Densidade
HK	Hexoquinase
HMW	<i>High Molecular Weight</i> Alto Peso Molecular
HOMA	<i>Homeostatic Model Assessment</i> Modelo de Avaliação da Homeostase
HOMA-IR	<i>Homeostatic Model Assessment Insulin Resistance</i> Modelo de Avaliação da Homeostase para Resistência à Insulina
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> Federação Internacional de Diabetes
IKK	<i>IκB kinase</i> Complexo IκB quinase
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal

IR	<i>Insulin Receptor</i> Receptor da Insulina
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i> Substrato do Receptor da Insulina
JNK	<i>c-Jun N-Terminal Kinases</i> Quinase c-Jun NH ₂ -Terminal
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> Lipoproteínas de Baixa Densidade
LPL	Lipase Lipoproteica
MAP quinase	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i> Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> Fator Inibidor da Migração de Macrófagos
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Forma Reduzida
NF-kappa-B	<i>Nuclear Factor kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells</i> Fator Nuclear de Transcrição Kappa-B
NO [•]	<i>Nitric Oxide</i> Óxido Nítrico
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i> Fator Inibidor do Ativador do Plasminogênio
PDE5	Fosfodiesterase 5
PGC-1a	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i> Coativador -1α do PPARγ

PKC	Proteína Quinase C
PKG	Proteína Quinase Dependente de GMPc
PPAR- α	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha</i> Receptor Alfa Ativado pelo Proliferador de Peroxissomo
PPAR- γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i> Receptor Gama Ativado pelo Proliferador de Peroxissomo
PRDM16	<i>PR Domain Containing 16</i> Proteína Coreguladora PRDM16
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> Espécies Reativas do Oxigênio
RPN	<i>Atrial Natriuretic Peptide Receptor</i> Receptor do Peptídeo Natriurético Atrial
SGCS	Subgrupo Cafeteria Salina
SGCT	Subgrupo Cafeteria Tadalafil
SGCM	Subgrupo Cafeteria Magro
SGRS	Subgrupo Ração Salina
SGRT	Subgrupo Ração Tadalafil
SGRM	Subgrupo Ração Magro
TG	Triacilglicerol
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOCE	Laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental

UCP1

Uncoupling Protein 1
Proteína Desacopladora 1

UFSC

Universidade Federal de Santa Catarina

WAT

White adipose tissue
Tecido Adiposo Branco

SUMÁRIO

I. REFERENCIAL TEÓRICO.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1 Considerações gerais.....	29
1.2 A adiponectina e seu papel na resistência à insulina e no balanço energético.....	31
1.3 As citocinas inflamatórias e seu papel na síndrome metabólica	34
1.4 Os produtos finais da glicosilação avançada (AGEs) e a obesidade	35
1.5 O óxido nítrico e a fisiologia do adipócito.....	36
1.6 Os inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5)	39
1.7 A via do óxido nítrico, os inibidores da PDE5 e o tecido adiposo	39
1.8 A dieta de cafeteria como modelo experimental de obesidade	42
2. JUSTIFICATIVA	43
3. HIPÓTESES.....	44
II. OBJETIVOS.....	45
1. GERAL.....	45
2. ESPECÍFICOS.....	45
III. MÉTODOS.....	47
1. DELINEAMENTO DO ESTUDO	47
2. AMOSTRA.....	47
3. PROTOCOLO DE ALIMENTAÇÃO	51
3.1 Ração para ratos.....	51
3.2 Dieta de cafeteria	51
4. ASPECTOS ÉTICOS	52
5. INTERVENÇÕES	52

5.1 Gavagem.....	52
5.2 Procedimento anestésico.....	52
5.3 Obtenção das amostras de soro.....	52
5.4 Obtenção e preparação do tecido adiposo.....	53
5.5 Morte indolor assistida	53
6. ANÁLISES LABORATORIAIS.....	53
6.1 Determinação dos níveis séricos de insulina e adiponectina	53
6.2 Determinação da glicemia	54
6.3 Cálculo do modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR).....	55
6.4 Cálculo do índice adiponectina sérica/gordura total	55
6.5 Determinação dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina 6 (IL-6)	55
6.5.a Determinação das proteínas	55
6.5.b Determinação das citocinas inflamatórias	55
6.6 Análise dos parâmetros relacionados ao óxido nítrico e produtos finais de glicação avançada.....	56
6.6.a Determinação das proteínas	56
6.6.b Análise do metabólito do óxido nítrico.....	56
6.6.c Avaliação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs).....	56
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57

IV RESULTADOS59

V DISCUSSÃO.....73

1. A dieta de cafeteria e o peso corporal.....	73
2. A dieta de cafeteria e a ingestão alimentar	74
3. Dieta de cafeteria e a gordura corporal.....	74
4. A dieta de cafeteria e o HOMA-IR.....	75

5. A dieta de cafeteria e as concentrações de adiponectina.....	75
6. A dieta de cafeteria e as concentrações de citocinas inflamatórias	76
7. A dieta de cafeteria e as concentrações de nitrito	76
8. A dieta de cafeteria e os compostos de Maillard.....	77
9. O tadalafil e o HOMA-IR	77
10. O tadalafil e os valores médios da relação adiponectina sérica/gordura total.....	78
11. O tadalafil e as concentrações de citocinas inflamatórias	78
12. O tadalafil e os compostos de Maillard.....	79
13. Limitações do estudo	80
VI CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES.....	81
1. Conclusões.....	81
2. Implicações	82
VII REFERÊNCIAS	83
ANEXO A - PROTOCOLO APROVADO PELA CEUA/UFSC.....	91
ANEXO B - ARTIGOS	93
1. Artigo de revisão publicado.....	93
2. Artigo original submetido.....	95

I. REFERENCIAL TEÓRICO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais:

Apesar da presença constante da fome ao longo da evolução humana, atualmente 65% da população mundial vive em países onde o sobrepeso e obesidade são causas mais importantes de mortalidade do que a desnutrição (1-2). Os seres humanos desenvolveram-se muito bem adaptados, como caçadores coletores, durante um período que vai de 6 milhões a 25 mil anos antes de Cristo, até o despertar da agricultura. Recentemente, o ambiente no qual o *homo sapiens* vive foi alterado drasticamente. Como consequência, os homens foram expostos a fatores para os quais o seu genótipo era mal adaptado. O desfecho, com o incremento da urbanização, é uma epidemia global de obesidade, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (2). Essa proporção mundial epidêmica de sobrepeso e obesidade é responsável por pelo menos 2,8 milhões de óbitos a cada ano em países diversos, independentemente de seu grau de desenvolvimento (3).

A síndrome metabólica é um conjunto dos mais poderosos fatores de risco para a morte cardiovascular. Os critérios para seu diagnóstico, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), são a presença de obesidade central, associada a 2 ou mais dos seguintes achados: altas concentrações de triglicerídeos, valores reduzidos de lipoproteínas de alta densidade (HDL), pressão arterial aumentada e glicemia de jejum elevada. As causas da síndrome metabólica continuam a desafiar os especialistas, mas a resistência à insulina, obesidade central, fatores genéticos, sedentarismo, envelhecimento, estados pró-inflamatórios e alterações hormonais são considerados agentes causais. A resistência à insulina ocorre quando as diferentes células do organismo se tornam menos sensíveis, ou eventualmente resistentes à insulina, o hormônio produzido pelas células beta do pâncreas para facilitar a absorção de glicose (4).

Existe um tênue balanço entre a resistência à insulina e a massa efetiva de células beta no pâncreas, para compensar as alterações metabólicas. Contudo, em indivíduos suscetíveis, estas células podem ficar sobrecarregadas, falhar em contrabalançar a resistência à insulina e levar ao aparecimento do diabetes. Tem-se proposto que esta falha seja causada por um aumento na apoptose das células beta, provocado pela combinação de hiperglicemia crônica, hiperlipidemia, e certas citocinas

que interferem nas vias de sinalização que mantêm o crescimento e sobrevivência celular adequados (5).

Ao longo das duas últimas décadas foi estabelecido o conceito de que o tecido adiposo não é um simples depósito energético, mas também um órgão endócrino, que libera fatores conhecidos como adipocinas (6-7). São exemplos de adipocinas: leptina, adiponectina, resistina, visfatina, apelina, vaspina e omentina (6). Os adipócitos humanos são capazes também de produzir e liberar citocinas como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), e as interleucinas relacionadas ao início e perpetuação da inflamação (6-8). A disfunção dessas adipocinas e citocinas é capaz de reduzir a sensibilidade celular sistêmica à insulina e contribuir para o aparecimento da síndrome metabólica (9-10). Em razão do papel do tecido adiposo no controle metabólico, sua expansão promove alterações em sua fisiologia normal, gerando distúrbios autócrinos, parácrinos e finalmente sistêmicos (9-10).

A obesidade é fator determinante para a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), compostos intimamente relacionados ao stress oxidativo (11). Os AGEs são capazes de interferir na fisiologia normal dos adipócitos, diminuindo a secreção de adiponectina, aumentando a expressão de citocinas inflamatórias e diminuindo a sensibilidade à insulina (12-14).

O óxido nítrico (NO^{\cdot}) é uma pequena molécula gasosa, liberada por diferentes tipos celulares no organismo, onde age como neurotransmissor ou agente parácrino (15). Quando se liga a guanilato ciclase solúvel (GCs) causa a sua ativação e conseqüentemente um incremento da conversão da guanosina-5'-trifosfato (GTP) em guanosina 3'5' monofosfato cíclico (GMPc) (15). O aumento da concentração de GMPc promove mudanças fisiológicas mediadas em grande parte pela proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (15). Alguns estudos sugerem o envolvimento da via NO^{\cdot} /GMPc /PKG em vários aspectos da fisiologia do tecido adiposo, e conseqüentemente, uma conexão com as disfunções da síndrome metabólica (16-22).

A fosfodiesterase 5 (PDE5) é a enzima responsável pela degradação e inativação do GMPc (23-24). Sua inativação, por meio dos inibidores da PDE5, como o tadalafil, tem sido estudada por alguns pesquisadores para avaliar seu efeito nas desordens relacionadas à síndrome metabólica, como a inflamação do tecido adiposo, resistência à insulina, aterosclerose, e finalmente, a morte por causas cardiovasculares (16-18, 22).

1.2. A adiponectina e seu papel na resistência à insulina e no balanço energético:

A adiponectina foi descrita em 1995, como uma nova proteína de função desconhecida, então denominada proteína do adipócito relacionada ao complemento (ACRP30), já que é estruturalmente similar à proteína C1q do sistema complemento. O fato de sua expressão ter sido encontrada somente em adipócitos, o aumento de sua secreção pela ação da insulina, e a sua presença fisiológica no plasma, sugeriam que ela estava envolvida no controle do *status* nutricional do organismo (25).

A adiponectina é uma proteína de 244 aminoácidos, sintetizada a partir de um gene localizado no braço longo do cromossoma 3 (3q27), secretada por adipócitos, e que circula de forma copiosa no plasma (26-27). Ela representa a proteína mais abundante secretada pelo tecido adiposo (28). Seus efeitos benéficos são mediados principalmente por dois receptores celulares de membrana, os receptores tipo 1 (AdipoR1) e 2 (AdipoR2). Apesar dos receptores da adiponectina serem encontrados sistemicamente, a importância da expressão de seus subtipos varia conforme o tecido estudado, o que também regula a ação deste hormônio (26, 29).

Uma característica singular da estrutura da adiponectina é sua capacidade de se agrupar, em várias isoformas oligoméricas características. Podemos encontrar a adiponectina na circulação predominantemente na forma de três complexos oligoméricos, o formato trimérico, hexamérico e o de alto peso molecular (HMW); este último configura a isoforma mais ativa na sensibilização à ação da insulina (30). Entre todas as espécies em que a sequência primária de aminoácidos da adiponectina foi clonada, se evidenciou uma semelhança de mais de 80% em sua estrutura (30).

O promotor do gene da adiponectina contém múltiplos sítios de ligação, para fatores transcricionais que modulam sua atividade. A transcrição do gene pode ser estimulada pela ação destes fatores; dentre eles podemos destacar a ativação do receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR- γ), que constitui o alvo da ação dos medicamentos da classe tiazolinedionas, usados no tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2 (31). Outros fármacos também aumentam as concentrações de adiponectina, muitas vezes por mecanismos desconhecidos. Dentre estes fármacos podemos citar as estatinas, os inibidores da enzima conversora de angiotensina, bloqueadores dos receptores de angiotensina, fenofibrato, niacina, ezetimiba, acarbose,

sulfoniluréias, bloqueadores androgênicos e o rimonabanto (31-32). Podemos também observar uma redução da transcrição em estados crônicos de inflamação e oxidação, como os encontrados na obesidade, e em caso do *stress* do retículo endoplasmático, que resulta de condições como o excesso de aporte nutricional e obesidade (31). Em relação ao mecanismo molecular da sensibilização ao efeito da insulina, promovido pela adiponectina, podemos destacar a estimulação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) pelo hormônio (33). Para a manutenção da vida celular, é imprescindível que haja um equilíbrio na relação entre a adenosina trifosfato (ATP) e a adenosina difosfato (ADP) (34). Situações que consomem o ATP ou impedem a sua síntese acabam gerando ADP e adenosina monofosfato (AMP) (35). Entre estas situações, podemos destacar os fatores que interferem com a produção de ATP, como a hipóxia, hipoglicemia e a isquemia, e os que aumentam o consumo de ATP, como a contração muscular. A AMPK também pode ser ativada pela leptina, e por hormônios que agem via receptores acoplados à proteína G (35). Uma vez ativada, a AMPK promove uma reação em cascata, que inibe os processos metabólicos celulares que não são essenciais à sobrevivência da célula em curto prazo, como a síntese de lipídeos, carboidratos e proteínas. Independente do estímulo inicial, a ativação da AMPK promove mudanças metabólicas que seriam benéficas em indivíduos com *diabetes mellitus* tipo 2 e síndrome metabólica, como um incremento da captação e metabolismo da glicose no músculo e em outros tecidos, diminuição da produção de glicose pelo fígado e inibição da síntese e aumento da oxidação de ácidos graxos (35). A adiponectina também estimula a degradação de ácidos graxos e o consumo de energia, em parte via ativação do receptor nuclear alfa ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPAR- α), o que promove uma diminuição do conteúdo de triglicérides dos músculos esqueléticos e fígado, e conseqüentemente a um aumento da sensibilidade à ação da insulina *in vivo* (33). A administração de adiponectina recombinante em roedores resulta em um aumento da captação de glicose, e na oxidação de ácidos graxos no músculo, redução da produção de glicose hepática e uma maior sensibilidade à ação da insulina sistemicamente (28).

As concentrações basais baixas de adiponectina são fortes preditoras do aparecimento futuro de *diabetes mellitus*, em humanos com alto risco para a doença, mesmo após o ajuste para o peso corporal (36). Em uma metanálise de estudos prospectivos, encontrou-se uma forte associação inversa entre as concentrações plasmáticas de adiponectina e a incidência de *diabetes mellitus* tipo 2. Os resultados não diferiram substancialmente em relação ao ensaio de mensuração do

hormônio, método de diagnóstico do diabetes, tamanho do estudo, duração do seguimento, índice de massa corporal ou proporção de homens e mulheres. Entre as variáveis confundidoras, destacam-se dados demográficos e variações do estilo de vida dos pacientes incluídos nos trabalhos, a dúvida se a adiponectina é um marcador causal para o *diabetes mellitus* ou só um fator paralelo com outras atividades biológicas, os erros diagnósticos e a heterogeneidade dos vários estudos que deram origem a esta metanálise (37).

Os baixos níveis plasmáticos de adiponectina são um dos mais fortes e consistentes preditores da progressão, em curto prazo, de doença coronariana aterosclerótica em homens e mulheres assintomáticos (38). O tecido adiposo, especialmente o visceral, expressa numerosos genes para proteínas secretadas na circulação, entre elas o fator inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), que funciona como um regulador do sistema fibrinolítico. Em modelos animais de obesidade, a expressão do gene relacionado ao PAI-1 encontra-se aumentada. A expansão do tecido adiposo visceral levaria à diminuição da adiponectina circulante e também aumentaria as concentrações plasmáticas do PAI-1, assim favorecendo os eventos trombóticos (39).

Os pacientes que apresentam doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), especialmente aqueles com esteatohepatite, têm concentrações de adiponectina plasmática significativamente mais baixas do que os indivíduos saudáveis. As baixas concentrações desta adipocina são preditores independentes de esteatose hepática e necroinflamação (40). Em células hepáticas estelares ativadas sob cultura, a adiponectina, especialmente a isoforma multimérica, apresenta efeito antifibrótico mediado pela ativação da AMPK (41). Em aparente contraste com seu efeito hepatoprotetor, demonstrou-se que em humanos e ratos com cirrose a adiponectina está aumentada (42-43).

Portanto, conforme o que foi acima discutido, a adiponectina, que constitui a proteína mais abundante secretada pelo adipócito, apresenta um papel crucial na modulação do aporte alimentar e do gasto energético. As baixas concentrações plasmáticas desta adipocina estariam associadas ao aparecimento de diversas patologias, como o *diabetes mellitus*, a doença coronariana aterosclerótica e a DHGNA.

1.3. As citocinas inflamatórias e seu papel na síndrome metabólica:

Para entender a relação da inflamação do tecido adiposo com a síndrome metabólica é importante destacar que, neste tecido, encontramos macrófagos originados da medula óssea, e que a concentração dessas células inflamatórias está diretamente relacionada com o grau de obesidade (44). As concentrações do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), uma quimiocina envolvida na infiltração tecidual por macrófagos, encontram-se elevadas na obesidade e na resistência à insulina (29). A associação inversa das concentrações de adiponectina, derivada do tecido adiposo visceral, e do MIF na obesidade, sugere que a inflamação pode ser responsável pelas baixas concentrações dessa adipocina (29). A ativação desses macrófagos teciduais promove a liberação de várias quimiocinas, o que por sua vez recruta mais dessas células inflamatórias, perpetuando o processo inflamatório (44). Citocinas como o $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 β e fatores secretados por macrófagos exercem efeitos parácrinos ativando vias inflamatórias no interior das células alvo para a insulina (9, 44). A concentração desses agentes pró-inflamatórios recebe ainda um reforço de citocinas secretadas diretamente pelo tecido adiposo (6-8).

O $TNF\alpha$ é uma das citocinas secretadas pelos adipócitos e macrófagos teciduais, que pode afetar a sensibilidade à insulina (45). Sua expressão está aumentada no tecido adiposo de humanos e animais obesos, e por esta razão tem-se postulado que ela esteja envolvida na conexão entre obesidade e aumento da resistência à insulina (45). O aumento das concentrações de $TNF\alpha$, bem como de ácidos graxos livres, prejudica a via de sinalização da insulina por meio da ativação de várias serina quinases (10, 46). A fosforilação da proteína quinase C theta (PKC θ) gera uma ativação em cascata de duas outras quinases, a quinase c-JUN NH2-terminal (JNK) e o complexo I κ B quinase (IKK). JNK e IKK interagem com o substrato do receptor da insulina (IRS-1), promovendo sua fosforilação à serina que acaba bloqueando o IRS-1 (10, 46). A resistência à insulina ocorre em razão da interrupção da interação entre o receptor da insulina (IR) / IRS-1 e pela própria degradação do IRS-1 (10, 44, 46).

Acredita-se que o tecido adiposo possa produzir até um terço das concentrações de IL-6 presentes no plasma, e que suas altas concentrações estão associadas ao incremento da resistência à ação da insulina, e são preditoras do desenvolvimento de diabetes mellitus (47). Em dois ensaios clínicos a utilização de tocilizumabe, um anticorpo anti-IL-6, promoveu a redução das concentrações glicêmicas e do índice

do modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR) (48-49).

Levando-se em consideração o que foi acima discorrido, podemos afirmar que a relação entre inflamação, obesidade e síndrome metabólica é clara. Mesmo que a inflamação não seja a única agente causadora da resistência à insulina, ele participa ativamente do processo, servindo de conector entre os distúrbios do tecido adiposo e sua expressão sistêmica maior, a síndrome metabólica.

1.4. Os produtos finais da glicação avançada (AGEs) e a obesidade:

Os AGEs são as substâncias finais de uma glicação não enzimática (11). A dislipidemia, hiperglicemia e o estresse oxidativo, presentes na obesidade, desempenham importantes papéis nas vias complexas de formação dos AGEs (11). Mesmo na ausência de diabetes, os AGEs podem também ser adquiridos por meio da ingestão de alimentos industrializados e pelo uso do tabaco (50). Estudos realizados em humanos e animais demonstraram que aproximadamente 10% dos AGEs presentes nos alimentos podem ser absorvidos, e que dois terços permanecem no organismo por 72 horas, tempo suficiente para promover stress oxidativo, gerar mais AGEs, e potencialmente levar à injúria tissular (50).

Dentre os mecanismos propostos para explicar os efeitos deletérios dos AGEs estão a glicação de proteínas intracelulares, alteração da matriz proteica extracelular e a ligação dessas moléculas com seus receptores em diferentes tipos celulares, promovendo a ativação de vias de sinalização intracelulares (51). Como resultado final dessas interações, temos a alteração da função celular e a interferência na interação normal entre as proteínas e as células (51). Os AGEs afetam a fisiologia normal dos adipócitos, interferindo na secreção de adipocinas e citocinas inflamatórias, inclusive do TNF α (12-13). Promovem um aumento da expressão da proteína quimiotática de monócitos e do inibidor do ativador do plasminogênio, que em conjunto com o estímulo à ativação do fator nuclear de transcrição kappa-B (NF-kappa-B), estão implicados na intolerância à glicose associada à obesidade (12). Os AGEs também podem diminuir a expressão de adiponectina, uma adipocina, como já mencionado antes, relacionada à melhora da sensibilidade celular à insulina (52). Nos adipócitos os AGEs promovem resistência à insulina por diminuir a captação de glicose mediada por insulina (14).

Deve-se também destacar que durante as reações que levam à formação de AGEs, espécies reativas do oxigênio (ROS) são também geradas (53-54). Quando a concentração de ROS supera a capacidade do sistema de defesa antioxidante celular, por aumento na concentração desses radicais ou por uma diminuição nos mecanismos antioxidantes, o estresse oxidativo ocorre (55). O aumento da concentração de ROS então, direta ou indiretamente, medeia uma série de efeitos adversos como o dano aos ácidos nucleicos, às proteínas e aos lipídeos, e por essa razão tem sido associado à carcinogênese, neurodegeneração, aterosclerose, diabetes e ao envelhecimento (55).

Para finalizar, os AGEs parecem causa e efeito da resistência à insulina, já que os distúrbios metabólicos atribuídos à sua presença como a hiperglicemia e a dislipidemia acabam por estimular ainda mais a sua formação. Os AGEs estão diretamente implicados na infiltração inflamatória do adipócito e na sua incapacidade de secretar apropriadamente a adiponectina.

1.5. O óxido nítrico e a fisiologia do adipócito:

O NO^{\bullet} é uma pequena molécula gasosa, composta por um átomo de nitrogênio e um de oxigênio, tendo uma meia vida de alguns segundos (15). É produzido por uma família de sintases, e sua principal via de metabolização é a oxidação em nitrito e nitrato (56). No plasma e em outros fluidos fisiológicos, o NO^{\bullet} é oxidado quase completamente em nitrito, onde ele permanece estável por várias horas (56). Os AGEs têm a capacidade de diminuir a atividade das sintases do NO^{\bullet} , diminuindo a biodisponibilidade dessa molécula (57).

O NO^{\bullet} interage com o grupo heme da guanilato ciclase solúvel (GCs), promovendo a síntese de GMPc (15, 58). O GMPc funciona como um segundo mensageiro, mediando respostas biológicas a uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo hormônios, neurotransmissores, quimiocinas e citocinas (15, 59). O aumento da concentração deste nucleotídeo cíclico ativa a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) que fosforila uma variedade de substratos (15, 59-60). A fosforilação destes substratos regula uma miríade de processos fisiológicos, como a resposta imunológica, contração muscular, fisiologia da visão, glicogenólise, agregação plaquetária, condutibilidade dos canais iônicos, apoptose e crescimento celulares (15, 59-60). Outra forma de aumentar as concentrações de GMPc independente do NO^{\bullet} , que precisa ser destacada, é a que ocorre por meio

da ligação do peptídeo natriurético atrial (ANP) ao seu receptor (RPN-A) (61-63). Desta forma o tecido adiposo pode também ser alvo da via RPN-A/GMPc/PKG, culminando com a diferenciação celular (61-63).

Em relação ao tecido adiposo branco, o óxido nítrico é capaz de estimular a adipogênese por meio do aumento da expressão de genes específicos, o que pode ser evidenciado pelo incremento dos marcadores da adipogênese: triacilglicerol (TG), lipase lipoproteica (LPL), glicerol 3 fosfato desidrogenase (G3PDH), adiponectina, PPAR γ , sintase do ácido graxo (FAS), proteína estimuladora de ligação a CCAAT (CEBP), promotor lipoespecífico do gene aP2 e o transportador de glicose tipo 4 (GLUT 4) (16-17, 64-66).

O papel da via do óxido nítrico na inflamação do tecido adiposo branco pode ser evidenciado em um modelo animal (eNOS $-/-$), que demonstrou que a deficiência genética da enzima sintase do óxido nítrico aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias (CP) e o recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo epididimal de camundongos (16).

Outro aspecto relevante da via do NO \cdot é sua capacidade de induzir características do tecido adiposo marrom no tecido adiposo branco (67-68). A importância do tecido adiposo marrom é sua potencial capacidade de dissipar energia por meio da produção de calor, e possivelmente servir como contraponto para a obesidade e síndrome metabólica (68). Sob o estímulo da via do NO \cdot , o tecido adiposo branco pode se diferenciar e promover o aparecimento de células ricas em proteína desacopladora 1 (UCP1), as células beges ou *brite* (67, 69). Adipócitos beges, tal como as células do tecido adiposo marrom, podem induzir termogênese com eficiência, promovendo perda de peso e melhora dos transtornos metabólicos (67, 69).

Em resumo, a via do NO \cdot / GMPc / PKG desempenha um papel ativo na fisiologia do adipócito branco. Pode estimular a adipogênese, diminuir a inflamação tecidual, e induzir a um fenótipo celular com maior capacidade de dissipar energia, melhorando a saúde do tecido adiposo, e protegendo contra o aparecimento da obesidade e da síndrome metabólica (22) (Figura 1).

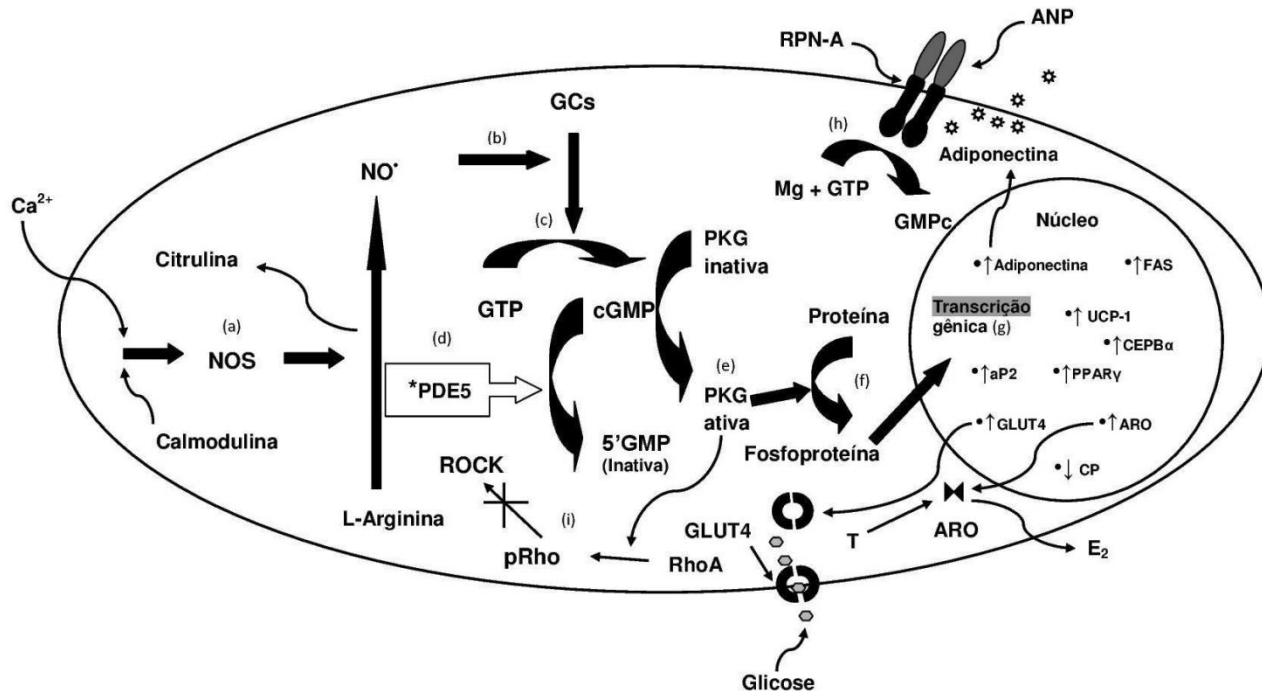


Figura 1. Via do Óxido nítrico (NO^{\bullet}) no adipócito. O NO^{\bullet} é produzido por sua sintase usando como substrato a arginina (a). O NO^{\bullet} ativa a guanilil ciclase solúvel (GCs) (b). A GCs aumenta a conversão da guanosina-5-trifosfato (GTP) em guanosina 3'5' monofosfato cíclico (GMPc) (c). A fosfodiesterase 5 pode hidrolisar o GMPc em sua forma inativa (d). Os altos níveis de GMPc ativam a proteína quinase G (PKG) (e). A PKG fosforila substratos, incluindo fatores de transcrição (f). Os fatores de transcrição coordenam a diferenciação celular e a secreção de citocinas (g). O peptídeo natriurético atrial (PNA) aumenta os níveis de GMPc, ligando-se ao seu receptor, e pode também ativar a PKG (h). A inibição da via ROCK tem efeitos anti-inflamatórios e anti-hipertrofos (i). *Sítio de ação da PDE 5 (22).

1.6. Os inibidores da fosfodiesterase 5 (PDE5):

A fosfodiesterase 5 (PDE5) é uma enzima que catalisa a hidrólise do GMPc levando à sua inativação (23-24). Foi identificada em 1978, e recebeu pouca atenção até a descoberta de que regulava a contração da musculatura lisa, e era o alvo da droga sildenafil (24, 70).

Os inibidores da PDE5 agem aumentando os níveis de GMPc, e foram inicialmente administrados a pacientes com asma induzida pelo exercício, revelando efeito broncodilatador moderado (70). Descobriu-se então que estes fármacos podiam potencializar o relaxamento induzido pelo NO* no corpo cavernoso do pênis, e assim serem úteis para o tratamento da disfunção erétil (DE) (70).

Em 1998 a introdução do inibidor da PDE5 sildenafil na prática clínica revolucionou o tratamento da DE, e após seu lançamento, dois outros fármacos, vardenafil e tadalafil, aumentaram ainda mais as opções terapêuticas para este transtorno (70-71).

Além do uso bem estabelecido dos inibidores de PDE5 para a DE, e posteriormente também para a hipertensão pulmonar, o perfil de segurança satisfatório dos três fármacos (sildenafil, vardenafil e tadalafil) encorajou a pesquisa do uso desses fármacos em outras doenças (23, 72). Desta forma, pesquisas têm sido realizadas avaliando o desempenho dos inibidores da PDE5 para o tratamento de doenças neurológicas, distrofia muscular, fenômeno de Raynaud, doenças autoimunes, fibrose cística, disfunções do trato genitourinário, câncer, obesidade e síndrome metabólica (22-23, 72).

Considerando o que foi anteriormente descrito, os inibidores da PDE5 têm mostrado efeitos diversos em vários órgãos e sistemas do organismo. Em razão do ótimo perfil de segurança, convém explorar ao máximo esta classe de fármacos, visando outras possíveis indicações terapêuticas.

1.7. A via do óxido nítrico, os inibidores da fosfodiesterase 5 e o tecido adiposo:

Esparsos estudos experimentais trouxeram evidências de que os inibidores da PDE5 poderiam interferir na fisiologia do tecido adiposo branco, e promover alterações benéficas em sua fisiologia (17, 22, 65, 67).

Foi em 2007 que um experimento com camundongos demonstrou pela primeira vez que a administração de sildenafil era capaz de

melhorar o balanço energético, e aumentar a sensibilidade à insulina nos animais submetidos a uma dieta hiperlipídica (66). A administração de sildenafil de forma crônica mostrou-se segura e não resultou em efeitos adversos na morfologia cardíaca ou nos níveis pressóricos (66).

Outro estudo explorou o efeito do sildenafil na adipogênese de pré-adipócitos em cultura (17). A administração deste inibidor da PDE5 resultou em um aumento pronunciado da expressão de genes relacionados à adipogênese, como o aP2 e o GLUT 4 (17). Os resultados evidenciaram ainda que o estímulo à adipogênese promovido pelo fármaco acontecia, pelo menos em parte, mediado pela via da PKG (17).

Um experimento com pré-adipócitos humanos expostos a tadalafil e sildenafil demonstrou um aumento na expressão da aromatase, e conseqüentemente a um aumento da razão estradiol / testosterona (73). Tal mudança poderia trazer efeitos favoráveis no endotélio em distúrbios metabólicos como a obesidade, a esteatose hepática e a resistência à insulina (18, 73).

Na obesidade existe um funcionamento mitocondrial inapropriado, tanto no tecido adiposo como no músculo (65). Visando estudar os efeitos do inibidor da PDE5 vardenafil na gênese mitocondrial, adipócitos omentais humanos foram expostos à droga (65). Um aumento benéfico no conteúdo de DNA mitocondrial pôde ser observado após 72 horas de administração do vardenafil (65).

A administração de sildenafil também foi capaz de estimular a via do NO^{*} / GMPc em adipócitos de camundongos submetidos a uma dieta hiperlipídica (16). A administração do fármaco foi capaz de aumentar a sensibilidade à insulina e diminuir os níveis glicêmicos (16).

Um estudo mais recente investigou a capacidade do sildenafil de induzir o efeito *browning* em adipócitos de camundongos e células 3T3-L1 (67). No efeito *browning* o tecido adiposo branco adquire algumas características do tecido adiposo marrom, como sua capacidade maior de dissipar energia (67). De fato o fármaco, mesmo por um período de 7 dias, levou a um aumento da expressão de marcadores da síntese mitocondrial como o UCP-1, o coativador-1 α do PPAR γ (PGC-1 α) e a proteína coreguladora PRDM 16 (PRDM16) (67).

Em resumo, podemos afirmar que alguns estudos experimentais conseguiram demonstrar que os inibidores da PDE5 poderiam promover mudanças fisiológicas positivas no tecido adiposo. Dentre estas mudanças poderíamos citar o incremento da diferenciação do adipócito, o aumento consequente da expressão de adiponectina, uma maior disponibilidade de estradiol, e um aumento da biossíntese mitocondrial (fenômeno *browning*). É importante destacar que as mudanças

promovidas por esses fármacos foram definidas por meio da expressão de genes relacionados a cada efeito pesquisado em questão (22) (Figura 2).

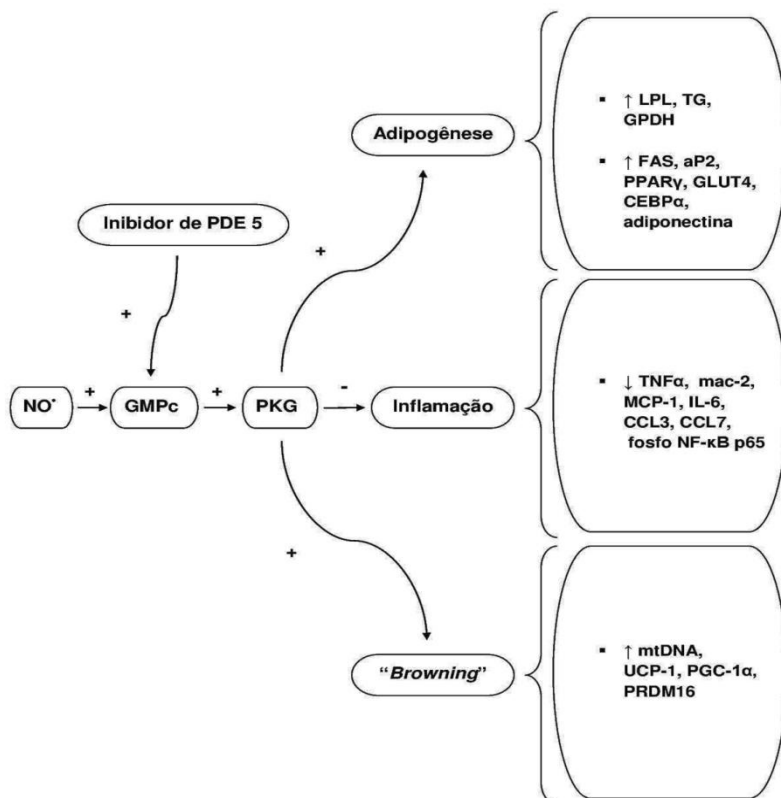


Figura 2. Fluxograma descrevendo resultados recentes de trabalhos da literatura sobre o papel da via do óxido nítrico na fisiologia do tecido adiposo branco. Óxido nítrico (NO^\bullet), guanosina 3'5' monofosfato (GMPc), proteína quinase G (PKG), lipase lipoproteica (LPL), triacilglicerol (TG), glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), proteína α estimuladora de ligação a CCAAT ($\text{CEBP}\alpha$), receptor γ ativado pelo proliferador de peroxissomo ($\text{PPAR-}\gamma$), ácido graxo sintase (FAS), promotor lipoespecífico do gene aP2 (aP2), transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4), fator de necrose tumoral α ($\text{TNF}\alpha$), complexo de ataque à membrana (Mac-2), fosforilação da subunidade p65 do fator nuclear- $\kappa\beta$ (**fosfoNF- $\kappa\beta$**), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), ligante de quimiocina 3 (CCL3), ligante de quimiocina 7 (CCL7), interleucina 6 (IL-6), DNA mitocondrial (mtDNA), proteína desacopladora 1 (UCP-1), coativador-1 α do $\text{PPAR}\gamma$ ($\text{PGC-1}\alpha$), proteína coreguladora PRDM16 (PRDM16) (22).

1.8. A dieta de cafeteria como modelo experimental de obesidade:

A dieta de cafeteria representa um modelo útil para os estudos da obesidade humana, pois é uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, palatável, que induz ganho de peso corporal rápido. Ainda que por períodos curtos, como o de quinze dias, esta dieta é suficiente para produzir um aumento significativo na adiposidade de ratos Wistar (74-75). A alta adiposidade está relacionada mais a um incremento da gordura visceral do que dos depósitos subcutâneos (74). Apesar da dieta de cafeteria ser capaz de promover um estado pré-diabético, com aumentos da glicose, insulina e ácidos graxos não esterificados no plasma (76), alguns trabalhos demonstraram que a ingestão alimentar é menor após o consumo de uma dieta rica em lipídeos, provavelmente por uma inibição da gordura sobre o esvaziamento gástrico, e um aumento da oxidação dos lipídeos durante a ingestão desta dieta (77-79). A secreção de adiponectina, em contraste com a secreção de outras adipocinas, está paradoxalmente diminuída na obesidade (80). Entretanto, trabalhos associando a dieta de cafeteria com a adiponectina demonstraram um aumento de sua expressão no tecido adiposo, e um incremento de seus títulos plasmáticos. Este fenômeno poderia representar um mecanismo de adaptação inicial à dieta altamente calórica, que, com a manutenção desta dieta por períodos maiores de tempo, quando então a deposição de gordura estivesse plenamente estabelecida, levaria finalmente à redução da capacidade de secreção de adiponectina pelo tecido adiposo. Assim, a diminuição das concentrações de adiponectina, nesta situação, seria mais uma consequência do que uma causa de obesidade (81-82).

Em resumo, a dieta de cafeteria, apesar de algumas deficiências, é útil nos estudos experimentais sobre o impacto da dieta ocidental na expansão do tecido adiposo branco, e nas consequências locais e sistêmicas.

2. JUSTIFICATIVA

As interações entre o peso corporal, as características nutricionais da dieta, a resistência à insulina e o balanço energético, com fatores tão diversos como as concentrações séricas de adiponectina, a magnitude do processo inflamatório no tecido adiposo, e o estresse oxidativo celular, permanecem como objeto de controvérsia na literatura. Os hábitos alimentares inapropriados, que se encontram padronizados no modelo da dieta de cafeteria, precisam ser mais bem estudados, já que o aumento da obesidade em escala mundial não pode ser explicado somente por mudanças na bagagem genética. A dieta de cafeteria é um modelo útil para o estudo da obesidade, pois é hipercalórica e hiperlipídica, e induz hiperfagia voluntária e rápido ganho de peso. Por outro lado, a dieta com alto teor de lipídeos pode ocasionar hipofagia, em decorrência da lentificação do esvaziamento gástrico e da maior oxidação das gorduras. O conhecimento do impacto da dieta de cafeteria sobre as concentrações de adiponectina permitirá avanço no entendimento da dinâmica desse importante hormônio em relação à composição dos alimentos ingeridos. A secreção de adiponectina, em contraste com a secreção de outras adipocinas, está paradoxalmente diminuída na obesidade. A razão da baixa produção de adiponectina pelo tecido adiposo visceral tem sido atribuída em parte à inflamação, mas esse é um argumento que necessita ainda de maiores esclarecimentos. O papel da via do óxido nítrico no adipócito é outro assunto que, apesar da aparente relevância, foi muito pouco explorado. Poucas evidências sugerem que inibidores da PDE5, como o tadalafil, são capazes de gerar efeitos positivos na fisiologia do adipócito como a intensificação da diferenciação celular, o aumento das concentrações de adiponectina, o incremento da razão estradiol / testosterona, a diminuição da inflamação tissular e a indução do fenômeno *browning* pela maior biossíntese mitocondrial. Em conjunto, essas mudanças levariam a um maior gasto energético e à diminuição da resistência à insulina, e potencialmente poderiam ser exploradas no tratamento da obesidade e da síndrome metabólica. Por outro lado, é relevante registrar que esses exíguos resultados são em grande parte definidos pelo aumento da expressão de genes específicos no adipócito, e a real magnitude do efeito dessas mudanças nos desequilíbrios metabólicos sistêmicos carece ainda de maior investigação. Para finalizar, não encontramos nenhum trabalho na literatura que aborde o impacto da dieta de cafeteria e da administração de tadalafil na concentração de produtos finais de glicação avançada no tecido adiposo.

3. HIPÓTESES

- A dieta de cafeteria é capaz de induzir ganho de peso, expansão do tecido adiposo, resistência insulínica e diminuição nas concentrações séricas de adiponectina em ratos Wistar machos.

- A dieta de cafeteria é capaz de aumentar as concentrações de citocinas inflamatórias e produtos finais de glicação avançada no tecido adiposo branco de ratos Wistar machos.

- A dieta de cafeteria é capaz de diminuir as concentrações de óxido nítrico no tecido adiposo branco de ratos Wistar machos.

- O tadalafil pode diminuir a intensidade da resistência à ação da insulina em ratos Wistar machos submetidos à dieta balanceada ou hiperlipídica.

- A administração de tadalafil pode aumentar as concentrações séricas de adiponectina em ratos Wistar machos submetidos à dieta balanceada ou hiperlipídica.

- A administração de tadalafil pode diminuir as concentrações de citocinas inflamatórias e produtos finais de glicação avançada no tecido adiposo branco de ratos Wistar machos.

II. OBJETIVOS

1 GERAL:

- Estudar o efeito das características da dieta por 10 semanas, e da administração de tadalafil por curto período de tempo, sobre fatores relacionados ao controle metabólico (HOMA-IR, adiponectina, inflamação e estresse oxidativo) em modelo animal.

2 ESPECÍFICOS:

- Identificar o efeito da dieta de cafeteria sobre a variação do peso corporal, o depósito de tecido adiposo visceral, a ingestão alimentar e a resistência à ação da insulina (HOMA-IR);
- Estudar o efeito da dieta de cafeteria sobre as concentrações séricas de adiponectina em relação à gordura corporal total;
- Investigar o efeito da dieta de cafeteria sobre as concentrações de citocinas inflamatórias (TNF α /IL-6) no tecido adiposo visceral;
- Estudar o efeito da dieta de cafeteria sobre as concentrações de óxido nítrico e produtos finais da glicação avançada no tecido adiposo visceral;
- Analisar o efeito do tadalafil sobre a resistência à insulina (HOMA-IR);
- Estudar as consequências da administração de tadalafil sobre as concentrações séricas de adiponectina em relação à gordura corporal total;

- Analisar o efeito da administração de tadalafil sobre as concentrações de citocinas inflamatórias (TNF α /IL-6) no tecido adiposo visceral;

- Estudar o efeito da administração de tadalafil sobre as concentrações de produtos finais da glicação avançada no tecido adiposo visceral.

III MÉTODOS

1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo analítico experimental controlado e com intervenção, envolvendo animais, que foi desenvolvido no Laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental (TOCE) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

2. AMOSTRA

Um total de 72 ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem *Wistar*, machos adultos, com 60 dias de vida e peso médio entre 250 e 300 gramas, provenientes do biotério central da UFSC, permaneceram em regime de adaptação no laboratório por um período de sete dias antes do início das atividades. Durante todo o experimento foram controlados os níveis de ruído, luz, e se manteve o ciclo dia e noite bem definido (com fotoperíodo de 12 horas). A umidade foi mantida a $55\pm 10\%$ e a temperatura entre 20 e 24°C (83). O peso dos ratos foi aferido e registrado semanalmente, sempre no mesmo dia e no mesmo período, bem como no momento do sacrifício, por meio de balança digital (**Precision ®, PR 1000**).

a) Os animais inicialmente foram distribuídos randomicamente em 02 subgrupos, a saber (Figura 3):

Subgrupo ração SGR (n=36)

Esse subgrupo recebeu uma dieta balanceada (ração específica para ratos) por 04 semanas.

Subgrupo cafeteria SGC (n=36)

Esse subgrupo de ratos recebeu uma dieta hipercalórica (dieta de cafeteria) por 04 semanas.

b) Após 30 dias os 48 animais que apresentaram maior ganho de peso foram agrupados em dois subgrupos de 24 animais, e os restantes, com menor peso, em outros dois subgrupos de 12 animais. A retirada dos animais de menor peso visava obter uma amostra mais homogênea, com menor desvio padrão, e foi considerada após nossa experiência com ratos Wistar machos do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina em um estudo prévio, que deu origem a um artigo disponível na literatura (75).

Subgrupo ração SGR (n=24)

Esse subgrupo recebeu uma dieta balanceada (ração específica para ratos) por 04 semanas.

Subgrupo ração magro SGRM (n=12)

Esse subgrupo recebeu uma dieta balanceada (ração específica para ratos) por 04 semanas.

Subgrupo cafeteria SGC (n=24)

Esse subgrupo de ratos recebeu uma dieta hipercalórica (dieta de cafeteria) por 04 semanas.

Subgrupo cafeteria magro SGCM (n=12)

Esse subgrupo de ratos recebeu uma dieta hipercalórica (dieta de cafeteria) por 04 semanas.

c) Após os 60 dias os animais foram finalmente distribuídos em 6 subgrupos, sendo que o grupo de 24 ratos mais obesos, foi randomicamente distribuído em dois grupos de 12 animais:

Subgrupo ração salina SGRS (n=12)

Esse subgrupo recebeu uma dieta balanceada (ração específica para ratos) por 15 dias. Nestes últimos 15 dias antes do sacrifício dos animais este subgrupo recebeu salina por via oral por meio de gavagem.

Subgrupo ração tadalafil SGRT (n=12)

Esse subgrupo recebeu uma dieta balanceada (ração específica para ratos) por 15 dias. Nestes últimos 15 dias antes do sacrifício dos animais este subgrupo recebeu tadalafil 10 mg/kg/dia por via oral por meio de gavagem. A escolha do tadalafil se deu por seu maior tempo de ação quando comparado ao sildenafil e ao vardenafil (84), e sua dose foi baseada em trabalhos da literatura, que descreveram efeito terapêutico sem toxicidade aos animais (85-86).

Subgrupo ração magro SGRM (n=12)

Esse subgrupo recebeu uma dieta balanceada (ração específica para ratos) por 15 dias. Nestes últimos 15 dias antes do sacrifício dos animais este subgrupo recebeu salina por via oral por meio de gavagem.

Subgrupo cafeteria salina SGCS (n=12)

Esse subgrupo recebeu uma dieta hipercalórica (dieta de cafeteria) por 15 dias. Nestes últimos 15 dias antes do sacrifício dos animais este subgrupo recebeu salina por via oral por meio de gavagem.

Subgrupo cafeteria tadalafil SGCT (n=12)

Esse subgrupo de ratos recebeu uma dieta hipercalórica (dieta de cafeteria) por 15 dias. Nestes últimos 15 dias antes do sacrifício dos animais este subgrupo recebeu tadalafil 10 mg/kg/dia por via oral por meio de gavagem.

Subgrupo cafeteria magro SGCM (n=12)

Esse subgrupo recebeu uma dieta hipercalórica (dieta de cafeteria) por 15 dias. Nestes últimos 15 dias antes do sacrifício dos animais este subgrupo recebeu salina por via oral por meio de gavagem.

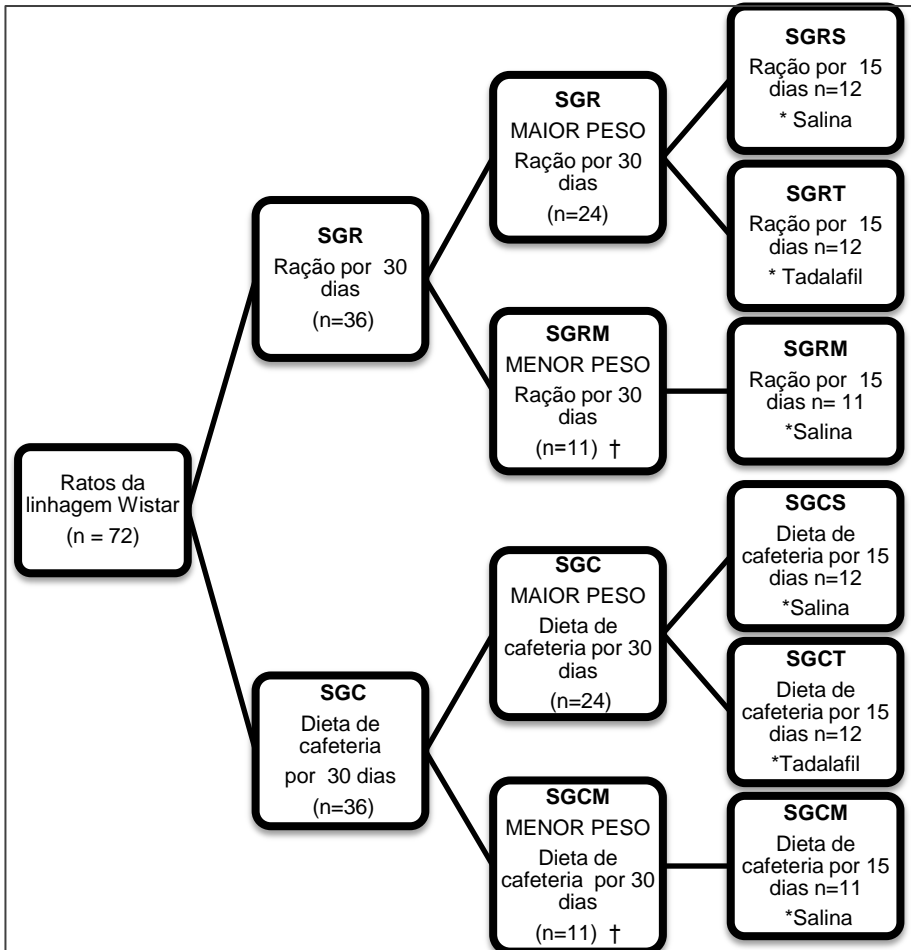


Figura 3. Organograma representando a divisão dos grupos experimentais. † Óbito de 01 animal de cada subgrupo magro.

3. PROTOCOLO DE ALIMENTAÇÃO

Após a divisão dos animais em 2 grupos experimentais, os ratos do SGR receberam diariamente ração específica para ratos *ad libitum*, enquanto os do SGC receberam apenas dieta de cafeteria, também *ad libitum*. No trigésimo dia do experimento, os animais de menor peso foram separados, e os ratos do SGR e SGRM continuaram recebendo ração balanceada para ratos, enquanto os do SGC e SGCM recebiam dieta de cafeteria por mais 30 dias até o 60º dia do experimento. Nos últimos 15 dias do trabalho, quando ocorreu a intervenção, os subgrupos foram finalmente divididos em SGRS, SGRT, SGRM alimentados com ração e SGCS, SGCT e SGCM alimentados com dieta de cafeteria.

A alimentação quando em quantidade mínima na bandeja era repostada, após ser pesada por meio de balança digital (**Precision**®, **PR 1000**), e então registrada.

3.1. Ração para Ratos

A dieta balanceada utilizada para a alimentação dos ratos foi a ração Nuvilab Cr-1®, específica para ratos e camundongos, com a seguinte composição: Proteína Bruta 22 a 22,5%, lipídeos 4,4 a 4,6% e carboidratos de 53 a 55%

- A dieta *Standard* (ração) foi administrada *ad libitum*
- A água foi oferecida *ad libitum*

3.2. Dieta de Cafeteria

Teve como base as dietas utilizadas em trabalhos e publicadas na literatura (74, 76), e era constituída de:

- Alimentos sólidos altamente energéticos, incluindo chocolate, biscoito recheado, bacon, salame, queijo gordo e doce de amendoim.
- Dieta líquida: incluía água *ad libitum*.

A distribuição dos nutrientes respeitou uma proporção de 45% de carboidratos, 45% de lipídeos e 10% de proteínas.

4. ASPECTOS ÉTICOS

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC sob o número PP00819 (Anexo A).

5. INTERVENÇÕES

5.1. Gavagem

Procedimento em que a substância é introduzida na cavidade oral ou no aparelho digestivo, por meio de um tubo esofágico ou estomacal. Um tubo flexível (ou agulha) com a ponta arredondada é introduzido na boca do animal, e gentilmente empurrado pelo esôfago até o estômago. No trabalho em questão foi escolhido o uso de um tubo fino acoplado a um *ependorf*, que serviu de bocal, para a administração do tadalafil (10mg/Kg de peso) ou salina até o estômago, por se mostrar menos traumático do que as agulhas rígidas. A intervenção ocorreu nos últimos quinze dias do experimento.

5.2. Procedimento Anestésico

Previamente à anestesia, foi administrada em cada animal uma dose de atropina na quantidade de 0.05 miligramas/Kg de peso por via subcutânea, um anticolinérgico visando evitar a sialorréia excessiva durante o ato anestésico (87). Após identificação dos animais, a anestesia foi realizada com uma solução de ketamina 75mg/Kg, associada à xilazina 10mg/Kg injetada intramuscular, na face interna de uma das patas traseiras (87). A efetividade da anestesia foi avaliada pela ausência de reflexo córneo-palpebral e reação motora após preensão com pinça do coxim adiposo de uma pata dianteira. Os animais foram então devidamente pesados.

5.3. Obtenção das amostras de soro

As amostras para a determinação das concentrações séricas de glicose, insulina e adiponectina foram obtidas por punção cardíaca, após

o procedimento anestésico e depois de um jejum de 12 horas. Após a coleta, o sangue foi centrifugado, para a obtenção do soro. Todas as amostras foram congeladas a -70°C , e descongeladas apenas no dia da realização dos ensaios.

5.4. Obtenção e preparação do tecido adiposo

Para a análise das citocinas inflamatórias o tecido adiposo visceral, obtido no dia do sacrifício dos animais da região epididimal, foi homogeneizado com solução de PBS contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,1 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10 mM, aprotinina 2 ng/mL e cloreto de benzamethonium 0,1 mM. O material foi então transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugado a $3000 \times g$ durante 10 min a 4°C e o sobrenadante obtido foi armazenado a -70°C para posterior análise.

Para as análises relacionadas ao estresse oxidativo o tecido adiposo da região epididimal, obtido no dia do sacrifício dos animais, foi homogeneizado em cinco volumes de tampão fosfato de sódio 20mM (pH 7,4) contendo cloreto de potássio. O material foi então centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C para descartar os núcleos e *debris* celulares. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante, uma suspensão de organelas mistas e preservadas, foi imediatamente analisado.

O tecido adiposo inguinal e retroperitonal, representantes do tecido adiposo subcutâneo e visceral respectivamente, foram retirados apenas para as suas quantificações em gramas e depois desprezados.

5.5. Morte indolor assistida

Foram utilizadas no experimento as doses de 300mg/kg de Ketamina e 30 mg/kg de Xilazina IM (87).

6. ANÁLISES LABORATORIAIS

6.1. Determinação das concentrações de insulina e adiponectina

A determinação das concentrações de insulina e adiponectina foi realizada no soro.

As concentrações de insulina foram determinadas por meio do Kit insulina rato-camundongo e os de adiponectina pelo Kit adiponectinário, ambos da marca Millipore® (Billerica, EUA) (ensaio ELISA). Os limites inferiores de detecção para os ensaios e as variações ideais de valores eram:

- Insulina – 0,2 ng/mL e 0,2 a 10 ng/mL
- Adiponectina – 0,155 ng/mL e 3,125 a 200 ng/mL

O ensaio ELISA utilizado foi do tipo sanduíche, em que um anticorpo conhecido (anticorpo de captura), neste caso direcionado ao antígeno (hormônio) que se quer mensurar, está fixado a uma placa de poliestireno. Faz-se uma primeira lavagem para retirar o anticorpo livre. Adiciona-se a amostra com o antígeno que se quer identificar e quantificar, que se liga ao anticorpo fixado nos poços da placa. Segue-se nova lavagem para eliminar o antígeno não ligado ao anticorpo. Acrescenta-se então um conjugado composto de outro anticorpo dirigido contra o antígeno, associado a uma enzima. Lava-se para retirar o conjugado livre. Adiciona-se por fim um cromógeno, e um substrato que, no caso de atividade enzimática, muda de cor e pode ser detectado por espectrofotometria. Foram utilizados os filtros de 450nm e 590nm na leitora de ELISA (espectrofotômetro), e todos os procedimentos relacionados à análise do material biológico colhido seguiram rigorosamente as instruções do fabricante dos Kits de exame e foram realizados em duplicata.

6.2. Determinação da glicemia

A glicemia foi determinada através do método da hexoquinase da Siemens Healthcare Diagnostics Inc.®. A glicose é fosforilada com adenosina trifosfato (ATP) na reação catalisada pela hexoquinase (HK). O produto glicose-6-fosfato (G6P) é então oxidado com a redução concomitante da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) para NADPH (forma reduzida da coenzima), na reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH). Um mol de NADP é reduzido a um mol de NADPH para cada mol de glicose presente. A absorbância em relação aos níveis de NADPH, e consequentemente da concentração de glicose, é então determinada.

6.3. Cálculo do modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR)

Os valores do HOMA-IR foram calculados por meio da seguinte fórmula: $\text{HOMA-IR} = \text{Glicemia de jejum (mg/dL)} \times \text{Insulina sérica de jejum } (\mu\text{U/mL}) / 405$.

6.4. Cálculo do índice adiponectina sérica/gordura total

A avaliação da proporção da adiponectina sérica pela quantidade de gordura total foi calculada pela seguinte fórmula: $\text{Índice adiponectina gordura} = \text{adiponectina sérica } (\mu\text{g/mL}) / \text{gordura total (epididimal + retroperitoneal + inguinal em mg)}$ (88).

6.5. Determinação das concentrações de fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucina 6 (IL-6)

6.5a Determinação das proteínas

O teor total de proteína foi medido no sobrenadante utilizando o método de Bradford, com albumina de soro bovino (BSA) como padrão (89).

6.5b Determinação das citocinas inflamatórias

A determinação das concentrações de TNF α e IL-6 foi realizada no tecido adiposo visceral.

As concentrações de TNF α foram determinadas por meio do Kit TNF-alpha DuoSet rato e os de IL-6 pelo Kit IL-6 DuoSet rato, ambos da marca R&D Systems® (Minneapolis, EUA) (ensaio ELISA). Os limites inferiores de detecção para os ensaios e as variações ideais de valores eram:

- TNF α – 62,5 ng/mL e 62,5 - 4,000 pg/mL
- IL-6 – 125 ng/mL e 125 - 8,000 pg/mL

Foram utilizados os filtros de 450nm e 550nm na leitora de ELISA (espectrofotômetro), e todos os procedimentos relacionados à análise do material biológico colhido seguiram rigorosamente as instruções do fabricante dos Kits de exame, e foram realizados em

duplicata. Os valores foram expressos como a quantidade de citocina / mg de proteína.

6.6. Análise dos parâmetros relacionados ao óxido nítrico e produtos finais de glicação avançada

6.6.a Determinação das proteínas

A quantificação das proteínas na análise do estresse oxidativo foi efetuada por meio da técnica de Lowry (90).

6.6.b Determinação do metabólito do óxido nítrico (NO[•]):

Em razão da meia vida extremamente curta do óxido nítrico *in vivo* (menos de 1 segundo em sangue circulante) (56, 91), a concentração de óxido nítrico foi estimada através de seu metabólito nitrito (NO₂⁻). A concentração de NO₂⁻ foi determinada de acordo com o método de Hevel e Marletta (92) no material sobrenadante, após a homogeneização do tecido adiposo epididimal. O total de NO₂⁻ foi mensurado por ensaio colorimétrico (leitadora multifuncional Tecan infinite M200 PRO (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria) a 540 nm baseado na reação de Gries (93).

6.6.c Avaliação das concentrações de produtos finais da glicação avançada (AGEs):

A formação dos compostos de Maillard, produtos iniciais nas reações que originam os AGEs, foi avaliada como previamente descrita por Biemel (94), no material sobrenadante, após a homogeneização do tecido adiposo epididimal. A detecção foi realizada por fluorescência, em a que luz emitida ou fluorescência é proporcional à concentração do composto analisado. A análise foi realizada nos espectros (λ_{exc}) 370 nm e 440 nm utilizando a leitadora multifuncional Tecan infinite PRO M200 (Tecan, Grödig/Salzburg, Austria).

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Após a constatação de que os dados assumiam uma distribuição normal, por meio do teste de Shapiro-Wilk, a comparação das médias dos diferentes subgrupos foi realizada utilizando o método estatístico ANOVA *one way* com correção de Tukey, quando se efetuava a análise de variância de um fator. Na análise de variância bifatorial foi empregado o ANOVA *two way*, seguido de ANOVA *one way* com correção de Tukey para a comparação entre os grupos. O teste t pareado foi utilizado para comparação das médias entre diferentes semanas do estudo em cada subgrupo. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando software SPSS versão 17.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

IV. RESULTADOS

Variação do peso corporal nos diferentes grupos ao longo das semanas de estudo e peso médio final no dia do sacrifício dos animais nos diferentes subgrupos:

A Figura 4 mostra a evolução das médias dos pesos em gramas ao longo dos primeiros trinta dias do estudo de dois subgrupos de ratos: subgrupo ração (SGR) e subgrupo cafeteria (SGC). Quando foi comparado o peso médio ao final do acompanhamento com o peso inicial foi observado um aumento significativo do peso corporal durante o período do estudo nos animais dos dois subgrupos ($p < 0,050$).

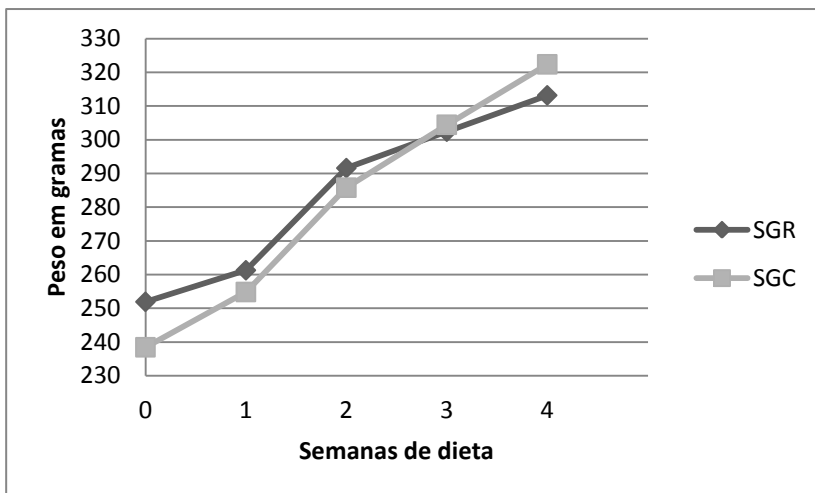


Figura 4. Evolução das médias dos pesos em gramas em dois subgrupos de ratos (SGR/SGC) desde o início do estudo, quando os animais apresentavam 60 dias de vida, até o 30º dia do experimento quando estavam com 90 dias de vida.

A Figura 5 mostra a evolução das médias dos pesos em gramas no segundo mês do estudo de quatro subgrupos de ratos: subgrupo ração (SGR), subgrupo ração magro (SGRM), subgrupo cafeteria (SGC) e subgrupo cafeteria magro (SGCM). Quando foi comparado o peso médio ao final do acompanhamento com o peso inicial foi observado um aumento significativo do peso corporal durante o período do estudo nos animais dos quatro subgrupos ($p < 0,050$). Quando o peso dos animais na 4ª semana foi comparado nos diferentes subgrupos, as médias foram maiores no SGR em relação ao SGRM ($p = 0,002$), no SGC em relação ao SGR ($p = 0,042$) e no SGC em relação ao SGCM ($p < 0,001$).

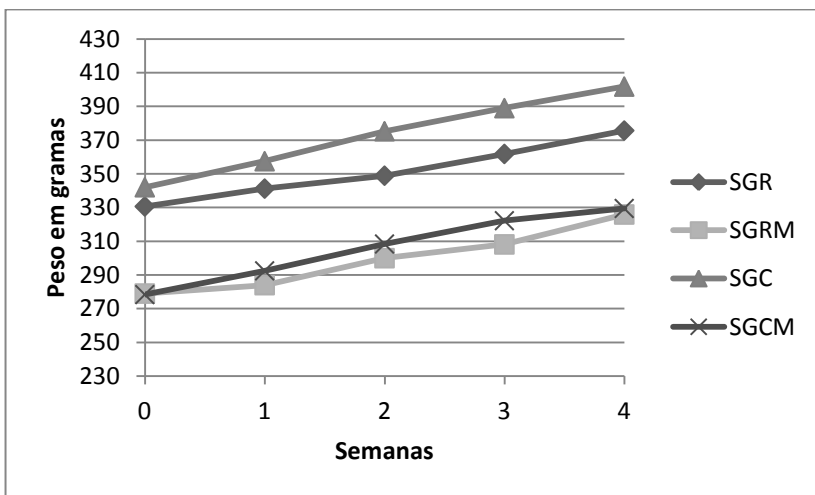


Figura 5. Evolução das médias dos pesos em gramas em quatro subgrupos de ratos do 30º dia do estudo, quando os animais apresentavam 90 dias de vida em que foram separados os doze animais mais magros de cada grupo, até o 60º dia do experimento, quando estavam com 120 dias de vida.

A Figura 6 mostra a evolução das médias dos pesos em gramas ao longo dos quinze dias finais do estudo, em seis subgrupos de ratos: subgrupo ração salina (SGRS), subgrupo ração tadalafil (SGRT), subgrupo ração magro (SGRM), subgrupo cafeteria salina (SGCS), subgrupo cafeteria tadalafil (SGCT) e subgrupo cafeteria magro (SGCM). Quando foi comparado o peso médio ao final do acompanhamento com o peso inicial não foi observada variação significativa do peso corporal durante o período do estudo em nenhum dos subgrupos.

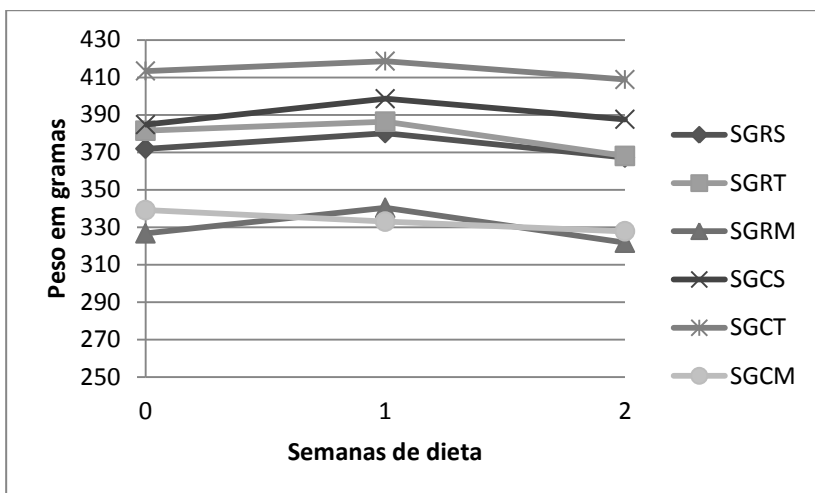


Figura 6. Evolução das médias dos pesos em gramas em seis subgrupos de ratos do 60º dia do estudo (início da intervenção), quando os animais apresentavam 120 dias de vida, até o 75º dia do experimento quando estavam com 135 dias de vida.

Varição da ingestão alimentar nos diferentes subgrupos ao longo dos 3 principais períodos do estudo:

A Figura 7 mostra a ingestão alimentar em gramas dos subgrupos que receberam ração específica para ratos (SGR) e dieta de cafeteria (SGC) nos 30 primeiros dias do experimento. Quando comparados em relação à ingestão alimentar, os animais do SGR apresentaram uma ingestão média maior que os animais do SGC em todas as semanas.

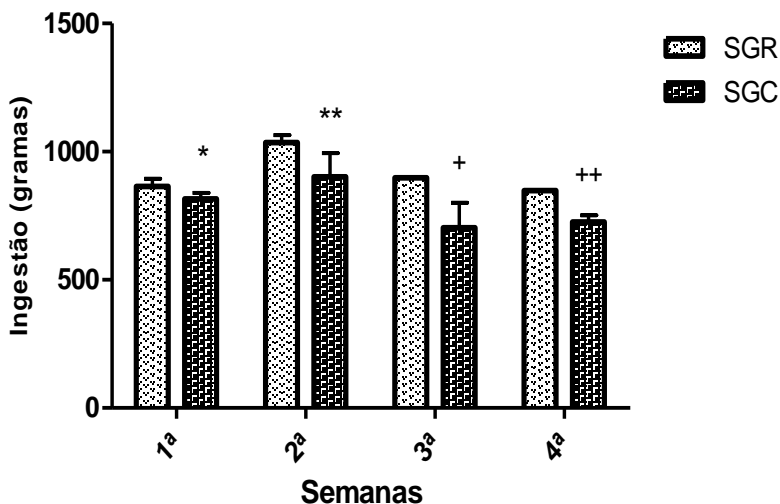


Figura 7. Ingestão (Média \pm DP) dos animais do SGR e SGC nos primeiros 30 dias do estudo. * $p = 0,013$ para comparação SGC e SGR na primeira semana, ** $p = 0,015$ na segunda semana, + $p = 0,004$ na terceira semana e ++ $p < 0,001$ na quarta semana.

A Figura 8 mostra a ingestão alimentar em gramas dos subgrupos que receberam ração específica para ratos (SGR/SGRM) e dieta de cafeteria (SGC/SGCM) no segundo mês do experimento. Quando comparados com relação à ingestão alimentar, os animais do SGR apresentaram uma ingestão média maior que os animais do SGC na primeira semana do segundo mês do estudo.

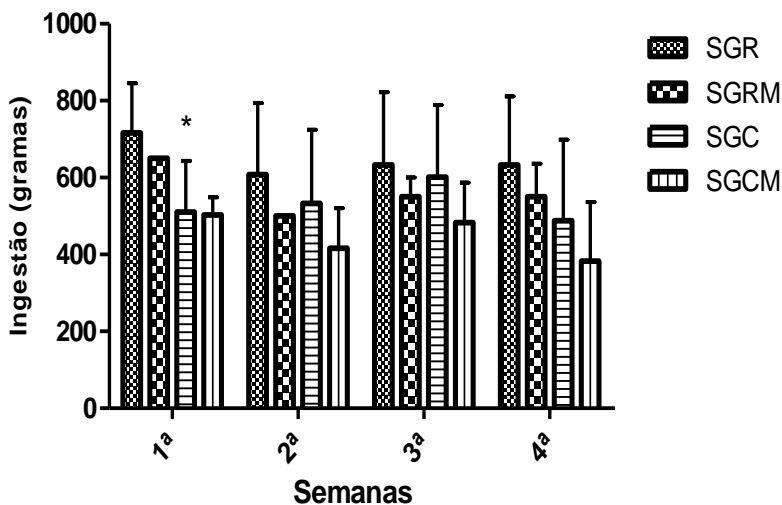


Figura 8. Ingestão (Média \pm DP) dos animais do SGR, SGRM, SGC e SGCM no segundo mês do estudo. * $p = 0,030$ para comparação SGC e SGR na primeira semana.

A Figura 9 mostra a ingestão alimentar em gramas dos subgrupos que receberam ração específica para ratos (SGRS/SGRT/SGRM) e dieta de cafeteria (SGCS/SGCT/SGCM) nos últimos 15 dias do experimento. Quando comparados com relação à ingestão alimentar, os animais do SGRS apresentaram uma ingestão média maior que os animais do SGCS na primeira semana dos 15 dias finais do estudo. Quando comparados com relação à ingestão alimentar, os animais do SGRS apresentaram uma ingestão média maior que os animais do SGRM e SGCS na segunda semana dos 15 dias finais do estudo. Quando comparados com relação à ingestão alimentar, os animais do SGCS apresentaram uma ingestão média maior que os animais do SGCM na segunda semana dos 15 dias finais do estudo.

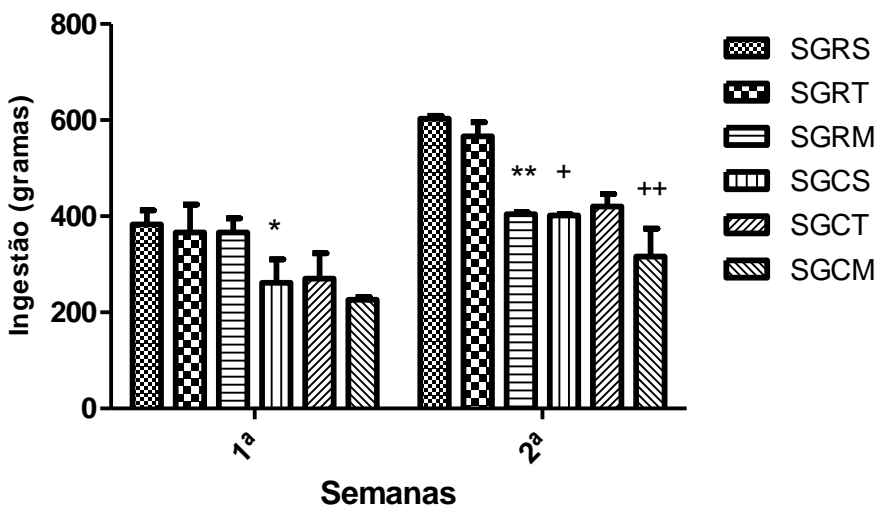


Figura 9. Ingestão (Média \pm DP) dos animais do SGRS, SGRT, SGRM, SGCS, SGCT e SGCM nos 15 dias finais do estudo. * $p = 0,007$ para comparação entre SGCS e SGRS na primeira semana. ** $p < 0,001$ para comparação entre SGRM e SGRS, + $p < 0,001$ para comparação entre SGCS e SGRS e ++ $p = 0,030$ para comparação SGCM e SGCS na segunda semana.

Valores médios da gordura epididimal (EP), gordura retroperitoneal (RP) e gordura inguinal (ING) mensurados no dia do sacrifício dos animais nos diferentes subgrupos:

As médias da gordura epididimal, gordura retroperitoneal e gordura inguinal são exibidas na Tabela 1. Quando comparados quanto à gordura epididimal final, os animais do SGCS apresentaram médias significativamente maiores que aqueles do SGRS ($p = 0,001$) e SGCM ($p = 0,017$). Quando comparados quanto à gordura retroperitoneal final, o SGCS apresentou média significativamente maior em relação ao SGRS ($p < 0,001$) e SGCM ($p = 0,028$). Quando comparados quanto à gordura inguinal final, os animais do SGCS apresentaram médias significativamente maiores que aqueles do SGRS ($p = 0,003$) e SGCM ($p = 0,022$).

Tabela 1 – Gordura epididimal (gramas), gordura retroperitoneal (gramas) e gordura inguinal (gramas) nos subgrupos ração salina (SGRS), ração tadalafil (SGRT), ração magro (SGRM), cafeteria salina (SGCS), cafeteria tadalafil (SGCT) e cafeteria magro (SGCM):

Grupos	SGRS	SGRT	SGRM	SGCS	SGCT	SGCM
Gordura	3,34	4,20	3,52	7,80	7,62	4,46
EP (g)	±1,04	±0,94	±1,20	±3,50 ^a	±2,90	±1,65 ^b
Gordura	4,59	6,00	5,24	12,97	13,12	8,82
RP (g)	±1,55	±1,74	±1,55	± 4,22 ^c	±4,80	±2,82 ^d
Gordura	4,52	5,39	4,82	9,70	9,55	5,62
ING (g)	±1,22	±1,21	±1,82	±4,37 ^e	±3,53	±2,02 ^f

*Média ± Desvio Padrão (DP)

ANOVA *one way*. ^a $p = 0,001$ para comparação SGCS e SGRS, ^b $p = 0,017$ para comparação SGCM e SGCS, ^c $p < 0,001$ para comparação SGCS e SGRS, ^d $p = 0,028$ para comparação SGCM e SGCS, ^e $p = 0,003$ para comparação SGCS e SGRS, ^f $p = 0,022$ para comparação SGCM e SGCS.

Valores médios do modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina (HOMA-IR):

A figura 10 mostra as médias do HOMA-IR ao final do acompanhamento dos subgrupos de animais que receberam ração específica para ratos (SGRS/SGRT) e dieta de cafeteria (SGCS/SGCT). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

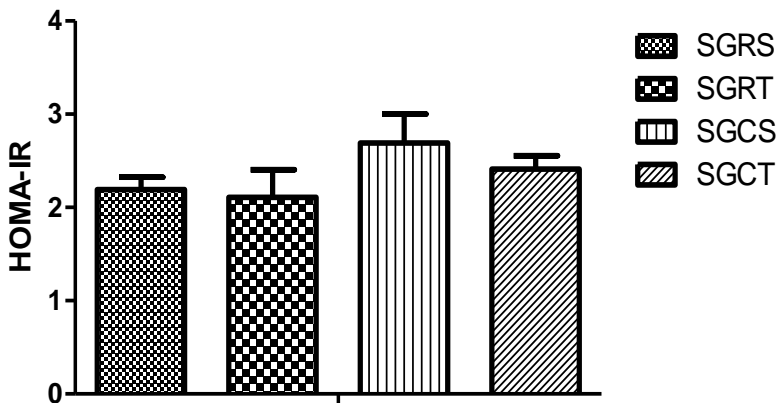


Figura 10. HOMA-IR (Média ± DP) dos animais do SGRS, SGRT, SGCS e SGCT calculada a partir das glicemias e insulinas séricas coletadas no dia do sacrifício dos animais.

Valores médios do índice adiponectina/gordura total nos diferentes subgrupos de animais em amostras de soro, colhidas no dia do sacrifício dos animais.

A Figura 11 mostra as média do índice adiponectina/gordura total dos subgrupos que receberam ração específica para ratos (SGRS/SGRT) e dieta de cafeteria (SGCS/SGCT). Quando comparados com relação índice adiponectina/gordura total, os animais do SGRS apresentaram um nível médio maior que os animais do SGCS ($p < 0,001$).

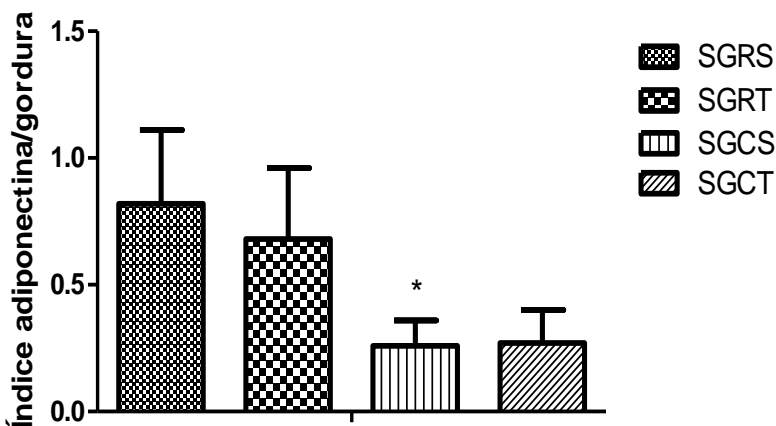


Figura 11. Índice adiponectina/gordura (Média ± DP) dos animais do SGRS, SGRT, SGCS e SGCT mensurado no tecido adiposo visceral extraído no dia do sacrifício dos animais. * $p < 0,001$ para comparação SGCS e SGRS

Concentrações médias de citocinas inflamatórias em amostras de tecido adiposo visceral, extraídas no dia do sacrifício dos animais.

A Figura 12 mostra as concentrações de fator de necrose tumoral α (TNF α) em pg/mg de proteína no tecido adiposo visceral dos subgrupos que receberam ração específica para ratos (SGRS/SGRT) e dieta de cafeteria (SGCS/SGCT). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

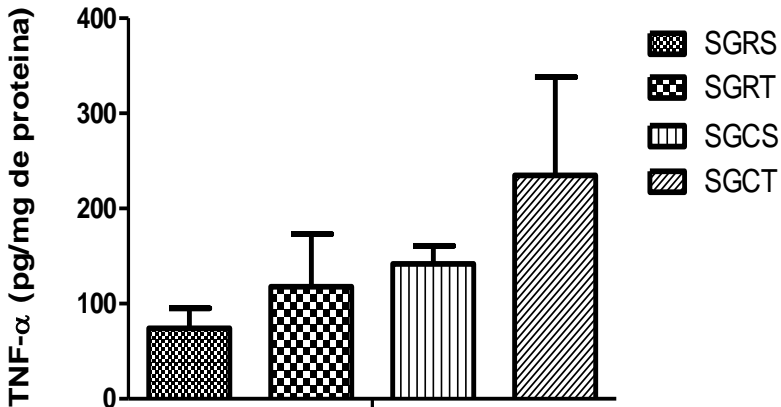


Figura 12. TNF α (Média \pm DP) dos animais do SGRS, SGRT, SGCS e SGCT mensurado no tecido adiposo visceral extraído no dia do sacrifício dos animais.

A Figura 13 mostra as concentrações de interleucina 6 (IL-6) em pg/mg de proteína no tecido adiposo visceral dos subgrupos que receberam ração específica para ratos (SGRS/SGRT) e dieta de cafeteria (SGCS/SGCT). Animais do SGCT apresentaram médias de IL-6 significativamente maiores que as do SGRT ($p = 0,043$).

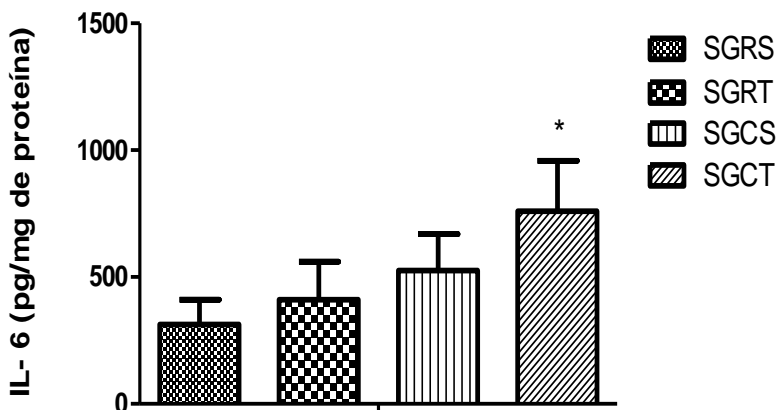


Figura 13. IL-6 (Média \pm DP) dos animais do SGRS, SGRT, SGCS e SGCT mensurado no tecido adiposo visceral extraído no dia do sacrifício dos animais. * $p = 0,043$ para comparação entre SGCT e SGRT.

Concentrações médias de nitrito nos diferentes subgrupos em amostras de tecido adiposo visceral, extraídas no dia do sacrifício dos animais.

A Figura 14 mostra as concentrações de nitrito em pmol/mg de proteína no tecido adiposo visceral dos subgrupos que receberam ração específica para ratos (SGRS/SGRT) e dieta de cafeteria (SGCS/SGCT). Quando comparados com relação ao nitrito do tecido adiposo visceral, os animais do SGRS apresentaram um nível médio maior que os animais do SGCS ($p = 0,013$).

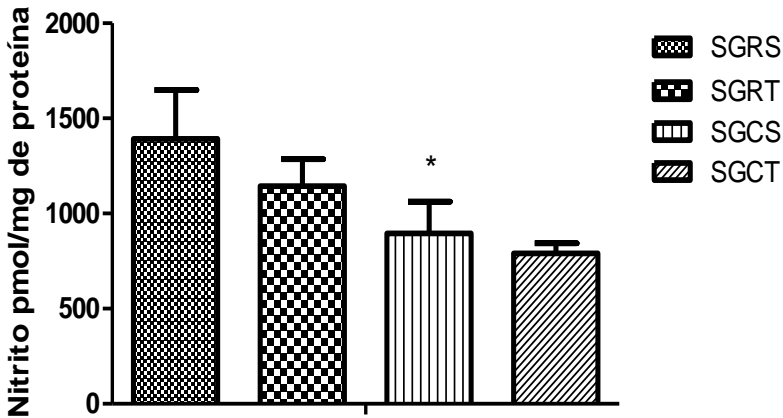


Figura 14. Nitrito (Média ± DP) dos animais do SGRS, SGRT, SGCS e SGCT mensurado no tecido adiposo visceral extraído no dia do sacrifício dos animais. * $p = 0,013$ para comparação SGCS e SGRS.

Concentrações médias de compostos de Maillard nos diferentes subgrupos em amostras de tecido adiposo visceral, colhidas no dia do sacrifício dos animais:

A Figura 15 mostra as concentrações de compostos de Maillard no tecido adiposo visceral dos subgrupos que receberam ração específica para ratos (SGRS/SGRT) e dieta de cafeteria (SGCS/SGCT). Animais do SGCS apresentaram médias significativamente mais elevadas que aqueles do SGRS ($p = 0,005$) e SGCT ($p = 0,038$).

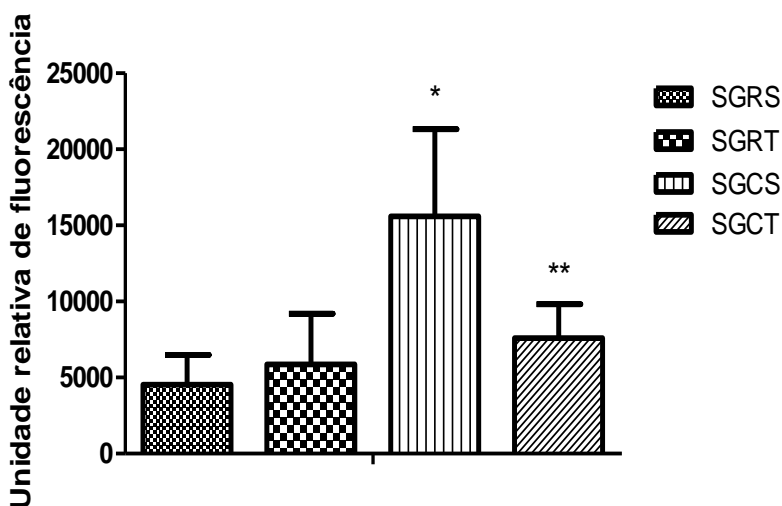


Figura 15. Compostos de Maillard (Média ± DP) dos animais do SGRS, SGRT, SGCS e SGCT mensurado do tecido adiposo visceral extraído no dia do sacrifício dos animais. * $p = 0,005$ para comparação entre SGCS e SGRS e ** $p = 0,038$ para comparação entre SGCT e SGCS.

A Figura 16 mostra as concentrações de compostos de Maillard no tecido adiposo visceral dos subgrupos que receberam ração específica para ratos (SGRS/SGRM) e dieta de cafeteria (SGCS/SGCM). Animais do SGCS apresentaram médias significativamente mais elevadas que aqueles do SGCM ($p = 0,008$).

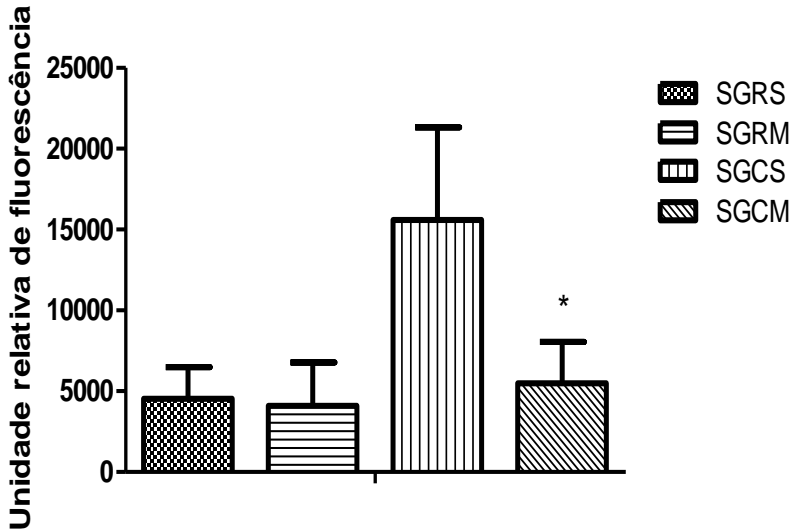


Figura 16. Compostos de Maillard (Média \pm DP) dos animais do SGRS, SGRM, SGCS e SGCM mensurado do tecido adiposo visceral extraído no dia do sacrifício dos animais. * $p = 0,008$ para comparação entre SGCM e SGCS.

V. DISCUSSÃO

O intuito do presente estudo foi abordar a influência da natureza da dieta sobre os transtornos metabólicos, associados principalmente à expansão do tecido adiposo, e concomitantemente, avaliar uma intervenção farmacológica específica sobre esses desequilíbrios. Conforme o assunto é discorrido, fatores tão distintos e aparentemente independentes como o metabolismo dos carboidratos, a inflamação e o estresse oxidativo se revelam coautores desses distúrbios metabólicos sistêmicos, relacionados ao aparecimento de doenças. Inicialmente se procurou validar o modelo animal de obesidade utilizado, mostrando que ele é realmente adequado ao desenho do estudo, e é potencialmente capaz de esclarecer as dúvidas levantadas, que justificam a realização do trabalho. O modelo animal de obesidade, alimentado com uma dieta rica em carboidratos e lipídeos, é então confrontado com seu grupo controle, submetido a uma dieta balanceada, e as diferenças são destacadas, mostrando ao que o hábito alimentar inadequado pode ocasionar. O equilíbrio fisiológico do tecido adiposo dos animais de diferentes subgrupos é explorado, tanto em material primário extraído do próprio tecido, quanto a partir de dosagens séricas pertinentes. A relevância da discussão que se segue fica óbvia quando lembramos que hoje enfrentamos uma epidemia global de obesidade, e, conseqüentemente da morbimortalidade a ela associada.

1. A DIETA DE CAFETERIA E O PESO CORPORAL

Quando foi avaliada a média ponderal ao final dos primeiros 30 dias de acompanhamento nos dois diferentes subgrupos de animais, não foi observada uma diferença significativa de peso, mas com 60 dias de dieta a diferença era evidente e os animais do SGC, que receberam dieta de cafeteria, apresentavam peso médio superior aos do SGR, que receberam dieta balanceada ($p=0,042$). Este achado vai ao encontro do que foi demonstrado na literatura, onde os animais submetidos à dieta de cafeteria também apresentavam um peso médio superior aos alimentados com ração balanceada (74, 76). A dieta de cafeteria, que tem como base a alimentação ocidental, tem sido responsabilizada, junto com o sedentarismo, pela crescente prevalência mundial de obesidade e suas conseqüências, com destaque às complicações cardiovasculares. Como nosso interesse era estudar a influência de fatores externos nos distúrbios do tecido adiposo, o maior peso encontrado nos animais

submetidos à dieta hipercalórica ratifica a qualidade do modelo animal de obesidade utilizado.

2. A DIETA DE CAFETERIA E A INGESTÃO ALIMENTAR

Ao longo do estudo a ingestão alimentar média foi por muitas vezes superior nos subgrupos alimentados com ração, quando comparados aos alimentados com dieta de cafeteria. Isto pôde ser particularmente constatado nos primeiros trinta dias do trabalho, em que em todas as semanas a ingestão média foi superior nos animais alimentados com a dieta balanceada. Este fato não deve causar estranheza se considerarmos que a dieta de cafeteria, por ser rica em lipídeos, pode gerar hipofagia (77-79). Devemos, todavia, lembrar que apesar da ingestão menor, a dieta de cafeteria apresenta um valor calórico total superior ao da dieta balanceada.

3. A DIETA DE CAFETERIA E A GORDURA CORPORAL

De grande importância no estudo foi constatar que o subgrupo de animais alimentado com dieta de cafeteria (SGCS) apresentava um peso médio de gordura visceral (epididimal e retroperitoneal) superior ao do subgrupo alimentado com ração (SGRS) ($p=0,001$ e $p<0,001$). O resultado comprova a qualidade do modelo animal de obesidade utilizado neste estudo. Este é um achado presente em outros trabalhos semelhantes da literatura, em que a dieta de cafeteria também foi capaz de gerar uma expansão do tecido adiposo visceral, superior à dieta balanceada (74, 81, 88). Com relação aos subgrupos de ratos com menor peso corporal total (SGRM e SGCM), retirados dos respectivos grupos maiores com intuito principal de controlar o desvio padrão das amostras, podemos constatar que com relação à gordura visceral (epididimal e retroperitoneal) o SGCS apresentava uma média superior ao SGCM ($p=0,017$ e $p=0,028$).

Ao avaliarmos a gordura inguinal, representante do tecido adiposo subcutâneo, verificamos que os animais alimentados com dieta de cafeteria (SGCS) apresentavam um peso médio de gordura subcutânea superior aos alimentados com ração (SGRS) ($p=0,003$). Este é um achado concordante com a literatura, onde os animais que recebiam a dieta de cafeteria também apresentavam maior expansão do tecido adiposo inguinal (88). Podemos observar que a quantidade de

tecido inguinal também estava relacionada ao peso, e não só à natureza da dieta ingerida, já que animais mais magros (SGCM), submetidos à mesma dieta (dieta de cafeteria) apresentavam uma quantidade menor desse tecido adiposo do que os de maior peso (SGCS) ($p=0,022$).

4. A DIETA DE CAFETERIA E O HOMA-IR

Quando se comparou o HOMA-IR nos diferentes subgrupos nenhuma diferença significativa foi encontrada. Apesar do HOMA-IR ser considerado um índice aceitável e confiável na estimativa da resistência à insulina em humanos, ratos e camundongos, os resultados dos trabalhos disponíveis na literatura sobre o impacto da dieta de cafeteria sobre este índice são variáveis (95). Dentre os estudos que utilizaram a dieta de cafeteria para a confecção de um modelo animal de obesidade, os valores do HOMA-IR encontrados variaram da total ausência de diferença (96) até o aumento significativo do índice (76). É possível que esta diversidade nos valores de HOMA-IR esteja relacionada à diversidade da composição das dietas empregadas, mas também ao gênero e à idade dos animais. De fato, tanto a idade quanto o sexo podem influenciar a sensibilidade à ação da insulina em animais e humanos (97-100). Em animais e humanos, com o envelhecimento, é possível ver uma redistribuição da gordura, adquirindo um caráter mais visceral, o que em conjunto com a deterioração geral de órgãos e sistemas, leva à diminuição da sensibilidade celular à insulina.

5. A DIETA DE CAFETERIA E O ÍNDICE ADIPONECTINA / GORDURA TOTAL

A adiponectina, secretada copiosamente pelo tecido adiposo, proporcionalmente encontra-se diminuída na obesidade (7, 28). Em nosso estudo, o subgrupo de animais alimentado com dieta de cafeteria (SGCS), e com uma maior expansão do tecido adiposo total, apresentava um valor menor da razão adiponectina/gordura total, do que o subgrupo alimentado com ração (SGRS) ($p<0,001$). Este achado encontra respaldo em outro trabalho experimental com ratos, em que nos animais alimentados com dieta de cafeteria, a adiponectina ajustada para o tecido adiposo branco também estava reduzida (88). A razão para a relação inversa da adiponectina e do grau de obesidade está talvez no fato do tecido adiposo visceral não ser um bom secretor desta adipocina (80).

6. A DIETA DE CAFETERIA E AS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS (TNF α /IL-6)

A inflamação tem sido responsabilizada inúmeras vezes pelas baixas concentrações de adiponectina produzidas pelo tecido adiposo visceral, e por muitos outros aspectos que associam os distúrbios da fisiologia do tecido adiposo com a síndrome metabólica (8, 29, 44). No trabalho aqui discutido podemos verificar que o achado de maiores títulos de IL-6 no tecido adiposo visceral de ratos do SGCT, quando comparados aos do SGRT, corrobora esta associação ($p=0,043$). A única diferença entre os dois grupos de animais é a constituição da dieta, sendo que o primeiro grupo (SGCT) foi submetido à dieta de cafeteria. Na literatura outros trabalhos relacionaram a IL-6 com a obesidade e processos inflamatórios crônicos (101-103). A expansão do tecido adiposo branco cursa com um aumento *in loco* dos títulos de IL-6, e finalmente a uma diminuição da sensibilidade celular local à insulina, que ao se tornar sistêmica dá origem aos vários aspectos relacionados à síndrome metabólica e a seu desfecho mais temido, a morbimortalidade cardiovascular (101-104).

7. A DIETA DE CAFETERIA E AS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE NITRITO

Reforçando a importância da via do óxido nítrico no tecido adiposo e validando o modelo de obesidade aqui utilizado, podemos verificar nos resultados que os animais submetidos à dieta balanceada e salina (SGRS) apresentavam concentrações médias superiores de nitrito, quando comparados aos alimentados com dieta de cafeteria e salina (SGCS) ($p=0,013$). Como já antes destacado, para avaliar as concentrações de óxido nítrico, em razão de sua efêmera meia vida, pode-se medir os seus metabólitos, aqui representados pelo nitrito. A via do óxido nítrico tem suma importância na fisiologia do adipócito, que vai do estímulo à sua diferenciação até a expressão de genes responsáveis pelo perfeito equilíbrio de todo tecido adiposo (16-17, 64-66). As maiores concentrações de nitrito, e conseqüentemente de óxido nítrico, no tecido adiposo epididimal dos ratos alimentados com ração, mostra que a gordura visceral desses animais apresentava-se mais saudável. Essa maior atividade da via do óxido nítrico, de forma autócrina e parácrina, é capaz de finalmente trazer efeitos sistêmicos

positivos, considerando a importância atual do tecido adiposo no controle do metabolismo geral.

8. A DIETA DE CAFETERIA E OS COMPOSTOS DE MAILLARD

Ao avaliarmos os compostos de Maillard, que estão diretamente relacionados aos produtos finais da glicação avançada (AGEs), percebemos que suas concentrações médias estavam mais elevadas nos animais alimentados com dieta de cafeteria (SGCS), quando comparados aos que receberam ração (SGRS) ($p=0,005$), ambos sem a influência do tadalafil. O mesmo podemos perceber ao compararmos os animais de maior peso, submetidos à dieta de cafeteria (SGCS), aos de peso inferior alimentados com a mesma dieta (SGCM) ($p=0,008$), também sem a influência do tadalafil. Estes resultados estão em concordância com a literatura, onde a obesidade já foi caracterizada como um importante estímulo à formação dos AGEs (11). De fato os AGEs podem interferir na fisiologia de múltiplos tecidos, incluindo aqui o tecido adiposo, de suma importância para o metabolismo da glicose (105-106). Ainda devemos lembrar que os animais submetidos à dieta de cafeteria podem receber um aporte extra de AGEs por meio da alimentação. Como já mencionado anteriormente, alimentos industrializados, comuns na dieta ocidental, podem ser fontes diretas de AGEs (50).

9. O TADALAFIL E O HOMA-IR

Com relação ao efeito do tadalafil sobre o HOMA-IR, não foram notadas diferenças significativas do ponto de vista estatístico, quando foram comparados os diferentes subgrupos. Ao analisarmos os dois trabalhos disponíveis na literatura, que avaliaram o efeito dos inibidores da PDE5 na sensibilidade à insulina, percebemos que em ambos os casos o tempo de administração da droga foi maior (16, 66). No primeiro trabalho o sildenafil foi administrado por 4 semanas (16) e no segundo estudo, também com sildenafil, foi a administração crônica da droga por 12 semanas que aumentou a sensibilidade à insulina (66). É possível que a administração do fármaco por apenas 2 semanas, no

estudo aqui discutido, não tenha sido suficiente para levar a uma melhora da sensibilidade sistêmica à insulina.

10. O TADALAFIL E OS VALORES MÉDIOS DA RELAÇÃO ADIPONECTINA SÉRICA/GORDURA TOTAL

Em nosso trabalho a administração de tadalafil não levou a um aumento do índice adiponectina/gordura total. De fato, trabalhos disponíveis na literatura evidenciaram que os inibidores da PDE5 podiam estimular esta adipocina no tecido adiposo branco (17, 65). Diferentemente de nosso experimento este incremento da adiponectina foi demonstrado por meio da expressão do seu gene, e não da molécula já formada (17, 65). É possível que esta seja a razão da discordância de resultados. Podemos nos perguntar se o aumento da expressão do gene é suficiente para justificar um efeito clínico relevante, já que a magnitude real do efeito da droga na secreção da adiponectina não ficou realmente clara.

11. O TADALAFIL E AS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS (TNF α /IL-6)

Ao analisarmos o efeito do tadalafil na concentração de citocinas inflamatórias no tecido adiposo visceral dos animais que receberam dieta de cafeteria ou ração balanceada, não encontramos qualquer diferença. De forma contrária um trabalho disponível na literatura mostrou que o sildenafil (inibidor da PDE5) podia atuar como anti-inflamatório no tecido adiposo branco (16). É relevante mencionar que aquele estudo avaliou a expressão do gene da citocina, e não a molécula já formada, como foi o caso do trabalho aqui discutido, o que pode ter sido o motivo da discrepância de resultados. A proteína formada apresenta possivelmente uma melhor relação com a magnitude do efeito da droga. Outro fator que pode ter influenciado os resultados foi o tempo de administração da droga. No trabalho que concluiu que um inibidor da PDE5 podia reduzir a expressão dos genes do TNF α e da IL-6, a droga foi administrada por quatro semanas (16).

12. O TADALAFIL E OS COMPOSTOS DE MAILLARD

Um dado de extrema relevância é a constatação que no tecido adiposo dos animais submetidos à dieta de cafeteria e tadalafil (SGCT) a concentração média de compostos de Maillard era menor do que a observada na gordura dos ratos que receberam dieta de cafeteria e salina (SGCS) ($P=0,038$). Podemos inferir que a melhora na fisiologia tecidual promovida pelo fármaco tenha criado um ambiente mais equilibrado e com uma menor produção das AGEs. De fato, como já mencionado anteriormente, alguns trabalhos experimentais disponíveis na literatura demonstraram que os inibidores da PDE5, aqui representados pelo tadalafil, podem promover modificações positivas na biologia do tecido adiposo, como o incremento da diferenciação do adipócito, o aumento consequente da expressão de adiponectina, uma maior disponibilidade de estradiol e um aumento da biossíntese mitocondrial (fenômeno *browning*) (17, 65, 67). Na literatura um único trabalho abordou a utilização dos inibidores da PDE5 no bloqueio dos efeitos deletérios dos AGEs em células endoteliais humanas (107). Os resultados deste estudo permitiram concluir que o vardenafil, um inibidor da PDE5, é capaz de inibir o aumento da expressão da proteína quimiotática de monócitos mediado pelos AGEs, quimiocina esta implicada no recrutamento de células inflamatórias, no início da formação da placa de aterosclerose nos vasos (107). Não encontramos nenhum estudo anterior que tenha analisado o efeito dos inibidores de PDE5 na concentração de AGEs no tecido adiposo.

13. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

É de grande importância que algumas limitações do estudo sejam discutidas.

Outros meios para a caracterização da resistência à insulina teriam sido úteis para reforçar a sua presença ou ausência nos grupos estudados. No trabalho aqui discutido foi utilizado o HOMA-IR para mensurar a resistência à insulina, e a ausência de resultados que confirmem sua presença já é um indicativo de que sua intensidade foi modesta. Como descrito anteriormente, o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, que não foi utilizado no presente estudo, fornece a mais pura e reprodutível informação sobre a ação tecidual da insulina (108-109). Contudo, o HOMA-IR, aplicado no estudo em questão, é considerado atualmente um índice simples e confiável na mensuração do grau de resistência à insulina, fortemente relacionado ao *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, que nos ratos é de difícil execução em razão do pequeno calibre dos vasos e da baixa volemia (95).

Em nosso trabalho os efeitos positivos do tadalafil no tecido adiposo branco foram avaliados por meio da dosagem das moléculas de interesse já formadas, e não da expressão de seus genes. Porém, a avaliação desses efeitos por meio da expressão gênica pode aumentar a sensibilidade da detecção, mas talvez superestime o efeito clínico da droga em questão.

VI. CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES

1. CONCLUSÕES

- A dieta de cafeteria foi capaz de levar a uma média final de peso maior nos animais a ela submetidos, quando comparados àqueles que receberam somente alimentação balanceada (ração).
- A dieta de cafeteria foi capaz de levar a uma média final de tecido adiposo visceral (epididimal/retroperitoneal) maior nos animais a ela submetidos, quando comparados àqueles que receberam somente alimentação balanceada (ração).
- A ingestão alimentar foi menor nos subgrupos de animais alimentados com a dieta de cafeteria, quando comparados àqueles que receberam alimentação balanceada (ração).
- A dieta de cafeteria por 10 semanas não alterou o índice de resistência à insulina (HOMA-IR).
- A dieta de cafeteria, apesar de levar a uma maior expansão do tecido adiposo total, não aumentou proporcionalmente as concentrações séricas de adiponectina.
- A dieta de cafeteria levou a uma maior concentração de IL-6 no tecido adiposo dos animais a ela submetidos.
- A dieta de cafeteria levou a uma menor concentração de nitrito, e conseqüentemente de óxido nítrico, no tecido adiposo dos animais a ela submetidos.
- A dieta de cafeteria levou a uma maior concentração de compostos de Maillard, e conseqüentemente de produtos finais de glicação avançada (AGEs), no tecido adiposo dos animais a ela expostos.

- A administração de tadalafil por duas semanas não foi capaz de influenciar o HOMA-IR
- O tadalafil não foi capaz de aumentar as concentrações séricas de adiponectina, em relação ao tecido adiposo, nos subgrupos de animais a ele expostos.
- A administração de tadalafil não foi efetiva em reduzir as concentrações de citocinas inflamatórias (TNF α /IL-6), no tecido adiposo de animais submetidos à dieta de cafeteria.
- A administração de tadalafil foi efetiva em reduzir as concentrações de compostos de Maillard, e conseqüentemente de produtos de glicação avançada (AGEs), no tecido adiposo de animais submetidos à dieta de cafeteria.

2. IMPLICAÇÕES

- A dieta de cafeteria é uma intervenção válida para a obtenção de um modelo animal adequado para o estudo da obesidade.
- A pesquisa sobre a utilização de tadalafil e de outros inibidores da PDE5 deve ser encorajada, visando uma possível aplicação dessa classe de drogas nos desarranjos do tecido adiposo e de suas conseqüências.

VII. REFERÊNCIAS

1. WHO. 10 facts on obesity. 2012.
2. Zimmet P, Thomas CR. Genotype, obesity and cardiovascular disease--has technical and social advancement outstripped evolution? *J Intern Med.* 2003 Aug;254(2):114-25.
3. WHO. Obesity and overweight. Geneva, centre WM;2011.
4. IDF. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome Brussels2006.
5. Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science.* 2005 Jan 21;307(5708):380-4.
6. Schutte AE, Huisman HW, Schutte R, van Rooyen JM, Malan L, Fourie CM, et al. Adipokines and cardiometabolic function: How are they interlinked? *Regul Pept.* 2010 Sep 24;164(2-3):133-8.
7. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care.* 2003 Aug;26(8):2442-50.
8. Hajer GR, van Haften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* 2008 Dec;29(24):2959-71.
9. Lee D-E, Kehlenbrink S, Lee H, Hawkins M, Yudkin JS. Getting the message across: mechanisms of physiological cross talk by adipose tissue. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism.* 2009 June 2009;296(6):E1210-E29.
10. Capurso C, Capurso A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. *Vascul Pharmacol.* 2012 Sep-Oct;57(2-4):91-7.
11. Gaens KH, Stehouwer CD, Schalkwijk CG. Advanced glycation endproducts and its receptor for advanced glycation endproducts in obesity. *Curr Opin Lipidol.* 2013 Feb;24(1):4-11.
12. Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007 May;76(2):236-44.
13. Rashid G, Luzon AA, Korzets Z, Klein O, Zeltzer E, Bernheim J. The effect of advanced glycation end-products and aminoguanidine on TNFalpha production by rat peritoneal macrophages. *Perit Dial Int.* 2001 Mar-Apr;21(2):122-9.
14. Wu CH, Huang HW, Huang SM, Lin JA, Yeh CT, Yen GC. AGE-induced interference of glucose uptake and transport as a possible cause of insulin resistance in adipocytes. *J Agric Food Chem.* 2011 Jul 27;59(14):7978-84.
15. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev.* 2010 Sep;62(3):525-63.
16. Handa P, Tateya S, Rizzo NO, Cheng AM, Morgan-Stevenson V, Han CY, et al. Reduced vascular nitric oxide-cGMP signaling contributes to adipose tissue inflammation during high-fat feeding. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Dec;31(12):2827-35.
17. Zhang X, Ji J, Yan G, Wu J, Sun X, Shen J, et al. Sildenafil promotes adipogenesis through a PKG pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jun 11;396(4):1054-9.

18. Jones ME, McInnes KJ, Boon WC, Simpson ER. Estrogen and adiposity--utilizing models of aromatase deficiency to explore the relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Aug-Sep;106(1-5):3-7.
19. Hemmrich K, Gummersbach C, Paul NE, Goy D, Suschek CV, Kroncke KD, et al. Nitric oxide and downstream second messenger cGMP and cAMP enhance adipogenesis in primary human preadipocytes. *Cytotherapy*. 2010 Jul;12(4):547-53.
20. McGrowder D, Ragoobirsingh D, Brown P. Modulation of glucose uptake in adipose tissue by nitric oxide-generating compounds. *J Biosci*. 2006 Sep;31(3):347-54.
21. Mitschke MM, Hoffmann LS, Gnad T, Scholz D, Kruihoff K, Mayer P, et al. Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. *FASEB J*. 2013 Jan 9.
22. Colombo G, Colombo MD, Schiavon Lde L, d'Acampora AJ. Phosphodiesterase 5 as target for adipose tissue disorders. *Nitric Oxide*. 2013 Nov 30;35:186-92.
23. Francis SH, Blount MA, Corbin JD. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions. *Physiol Rev*. 2011 Apr;91(2):651-90.
24. Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev*. 2006 Sep;58(3):488-520.
25. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):26746-9.
26. Bluher M, Williams CJ, Kloting N, Hsi A, Ruschke K, Oberbach A, et al. Gene expression of adiponectin receptors in human visceral and subcutaneous adipose tissue is related to insulin resistance and metabolic parameters and is altered in response to physical training. *Diabetes Care*. 2007 Dec;30(12):3110-5.
27. Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M, et al. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2002 Jul;51(7):2325-8.
28. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med*. 2008 Nov-Dec;14(11-12):741-51.
29. Kos K, Wong SP, Huda MS, Cakir M, Jernas M, Carlsson L, et al. In humans the adiponectin receptor R2 is expressed predominantly in adipose tissue and linked to the adipose tissue expression of MMIF-1. *Diabetes Obes Metab*. 2010 Apr;12(4):360-3.
30. Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J*. 2008 Feb 1;409(3):623-33.
31. Phillips SA, Kung JT. Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target. *Curr Opin Pharmacol*. 2010 Dec;10(6):676-83.
32. Swarbrick MM, Havel PJ. Physiological, pharmacological, and nutritional regulation of circulating adiponectin concentrations in humans. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008 Jun;6(2):87-102.

33. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1784-92.
34. Santomauro Jún AC, Ugolini MR, Santomauro AT, Souto RPD. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2008;52:120-5.
35. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5179-83.
36. Mather KJ, Funahashi T, Matsuzawa Y, Edelstein S, Bray GA, Kahn SE, et al. Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes*. 2008 Apr;57(4):980-6.
37. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009 Jul 8;302(2):179-88.
38. Maahs DM, Ogden LG, Kinney GL, Wadwa P, Snell-Bergeon JK, Dabelea D, et al. Low plasma adiponectin levels predict progression of coronary artery calcification. *Circulation*. 2005 Feb 15;111(6):747-53.
39. Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, et al. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. *Intern Med*. 1999 Feb;38(2):202-6.
40. Targher G, Bertolini L, Rodella S, Zoppini G, Scala L, Zenari L, et al. Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 Jun;64(6):679-83.
41. Adachi M, Brenner DA. High molecular weight adiponectin inhibits proliferation of hepatic stellate cells via activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Hepatology*. 2008 Feb;47(2):677-85.
42. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*. 2009 Sep;50(3):957-69.
43. Silva TE, Colombo G, Schiavon LL. Adiponectin: A multitasking player in the field of liver diseases. *Diabetes Metab*. 2014 Apr;40(2):95-107.
44. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:219-46.
45. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Kramer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem*. 2008 Jul;114(3):183-94.
46. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*. 2000 Mar 24;275(12):9047-54.
47. Permana PA, Menge C, Reaven PD. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 10;341(2):507-14.
48. Ogata A, Morishima A, Hirano T, Hishitani Y, Hagihara K, Shima Y, et al. Improvement of HbA1c during treatment with humanised anti-interleukin 6 receptor antibody, tocilizumab. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):1164-5.

49. Schultz O, Oberhauser F, Saech J, Rubbert-Roth A, Hahn M, Krone W, et al. Effects of inhibition of interleukin-6 signalling on insulin sensitivity and lipoprotein (a) levels in human subjects with rheumatoid diseases. *PLoS One*. 2010;5(12):e14328.
50. Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep*. 2014 Jan;14(1):453.
51. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*. 2005 Jun;54(6):1615-25.
52. Maeda S, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi S. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks advanced glycation end products (AGEs)-RAGE-induced suppression of adiponectin mRNA level in adipocytes by inhibiting NADPH oxidase-mediated oxidative stress generation. *Int J Cardiol*. 2011 Nov 3;152(3):408-10.
53. Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jan 15;40(2):183-92.
54. Hidalgo FJ, Zamora R. Interplay between the maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1043:319-26.
55. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012 May;24(5):981-90.
56. Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*. 2007 Sep 1;43(5):645-57.
57. Neves D. Advanced glycation end-products: a common pathway in diabetes and age-related erectile dysfunction. *Free Radic Res*. 2013 Aug;47 Suppl 1:49-69.
58. Russo I, Del Mese P, Doronzo G, Mattiello L, Viretto M, Bosia A, et al. Resistance to the Nitric Oxide/Cyclic Guanosine 5'-Monophosphate/Protein Kinase G Pathway in Vascular Smooth Muscle Cells from the Obese Zucker Rat, a Classical Animal Model of Insulin Resistance: Role of Oxidative Stress. *Endocrinology*. 2008 April 1, 2008;149(4):1480-9.
59. Bischoff E. Potency, selectivity, and consequences of nonselectivity of PDE inhibition. *Int J Impot Res*. 2004 Jun;16 Suppl 1:S11-4.
60. Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res*. 2007 Feb 16;100(3):309-27.
61. Nishikimi T, Iemura-Inaba C, Akimoto K, Ishikawa K, Koshikawa S, Matsuoaka H. Stimulatory and Inhibitory regulation of lipolysis by the NPR-A/cGMP/PKG and NPR-C/G(i) pathways in rat cultured adipocytes. *Regul Pept*. 2009 Feb 25;153(1-3):56-63.
62. Miyashita K, Itoh H, Tsujimoto H, Tamura N, Fukunaga Y, Sone M, et al. Natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascades promote muscle mitochondrial biogenesis and prevent obesity. *Diabetes*. 2009 Dec;58(12):2880-92.
63. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C, et al. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest*. 2012 Mar 1;122(3):1022-36.

64. Yan H, Aziz E, Shillabeer G, Wong A, Shanghavi D, Kermouni A, et al. Nitric oxide promotes differentiation of rat white preadipocytes in culture. *J Lipid Res.* 2002 Dec;43(12):2123-9.
65. De Toni L, Strapazzo G, Giancesello L, Caretta N, Pilon C, Bruttocao A, et al. Effects of type 5-phosphodiesterase inhibition on energy metabolism and mitochondrial biogenesis in human adipose tissue ex vivo. *J Endocrinol Invest.* 2011 Nov;34(10):738-41.
66. Ayala JE, Bracy DP, Julien BM, Rottman JN, Fueger PT, Wasserman DH. Chronic treatment with sildenafil improves energy balance and insulin action in high fat-fed conscious mice. *Diabetes.* 2007 Apr;56(4):1025-33.
67. Mitschke MM, Hoffmann LS, Gnad T, Scholz D, Kruithoff K, Mayer P, et al. Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. *FASEB J.* 2013 Apr;27(4):1621-30.
68. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol.* 2014 Jan;10(1):24-36.
69. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol.* 2013 Jun;15(6):659-67.
70. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2006 Jan;147 Suppl 1:S252-7.
71. Shamloul R, Ghanem H. Erectile dysfunction. *Lancet.* 2012 Oct 4.
72. Guazzi M, Samaja M. The role of PDE5-inhibitors in cardiopulmonary disorders: from basic evidence to clinical development. *Curr Med Chem.* 2007;14(20):2181-91.
73. Aversa A, Caprio M, Antelmi A, Armani A, Brama M, Greco EA, et al. Exposure to phosphodiesterase type 5 inhibitors stimulates aromatase expression in human adipocytes in vitro. *J Sex Med.* 2011 Mar;8(3):696-704.
74. Rodriguez E, Ribot J, Rodriguez AM, Palou A. PPAR-gamma2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obes Res.* 2004 Sep;12(9):1455-63.
75. Colombo G, Bazzo ML, Nogueira CL, Colombo MD, Schiavon LL, d'Acampora AJ. A study on the short-term effect of cafeteria diet and pioglitazone on insulin resistance and serum levels of adiponectin and ghrelin. *Braz J Med Biol Res.* 2012 Oct;45(10):935-41.
76. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity (Silver Spring).* 2011 Feb 17.
77. Ebal E, Cavalie H, Michaux O, Lac G. Effect of a lipid-enriched diet on body composition and some regulatory hormones of food intake in growing rats. *Ann Endocrinol (Paris).* 2007 Oct;68(5):366-71.
78. Ramirez I. Hypophagia following dietary obesity. *Physiol Behav.* 1986;38(1):95-8.
79. Burton-Freeman B, Schneeman BO. Lipid infused into the duodenum of rats at varied rates influences food intake and body weight gain. *J Nutr.* 1996 Nov;126(11):2934-9.

80. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FLJ. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*. 2008 December 1, 2008;29(24):2959-71.
81. Lopez IP, Milagro FI, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, De Miguel C. High-fat feeding period affects gene expression in rat white adipose tissue. *Mol Cell Biochem*. 2005 Jul;275(1-2):109-15.
82. Perez-Echarri N, Perez-Matute P, Martinez JA, Marti A, Moreno-Aliaga MJ. Serum and gene expression levels of leptin and adiponectin in rats susceptible or resistant to diet-induced obesity. *J Physiol Biochem*. 2005 Jun;61(2):333-42.
83. Paiva FP MV, Santos ACS. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. Salvador: Fiocruz2005.
84. Wright PJ. Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. *Int J Clin Pract*. 2006 Aug;60(8):967-75.
85. Guzeloglu M, Yalcinkaya F, Atmaca S, Bagriyanik A, Oktar S, Yuksel O, et al. The beneficial effects of tadalafil on renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Urol Int*. 2011;86(2):197-203.
86. Sawamura F, Kato M, Fujita K, Nakazawa T, Beardsworth A. Tadalafil, a long-acting inhibitor of PDE5, improves pulmonary hemodynamics and survival rate of monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats. *J Pharmacol Sci*. 2009 Nov;111(3):235-43.
87. Taborda C MD, da Silva CA. Manual de Normas Técnicas. São Paulo: USP, Microbiologia Dd;2004.
88. Ribot J, Rodriguez AM, Rodriguez E, Palou A. Adiponectin and resistin response in the onset of obesity in male and female rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Apr;16(4):723-30.
89. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
90. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.
91. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2-3):273-89.
92. Hevel JM, Marletta MA. Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol*. 1994;233:250-8.
93. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982 Oct;126(1):131-8.
94. Biemel KM, Reihl O, Conrad J, Lederer MO. Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes: unraveling the structure of a pentosidine precursor. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):23405-12.
95. Mather K. Surrogate measures of insulin resistance: of rats, mice, and men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Feb;296(2):E398-9.
96. Naderali EK, Pickavance LC, Wilding JP, Williams G. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight. *Clin Sci (Lond)*. 2001 Jun;100(6):635-41.

97. Rowe JW, Minaker KL, Pallotta JA, Flier JS. Characterization of the insulin resistance of aging. *J Clin Invest.* 1983 Jun;71(6):1581-7.
98. Escriva F, Gavete ML, Fermin Y, Perez C, Gallardo N, Alvarez C, et al. Effect of age and moderate food restriction on insulin sensitivity in Wistar rats: role of adiposity. *J Endocrinol.* 2007 Jul;194(1):131-41.
99. Yki-Jarvinen H. Sex and insulin sensitivity. *Metabolism.* 1984 Nov;33(11):1011-5.
100. Macotela Y, Boucher J, Tran TT, Kahn CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes.* 2009 Apr;58(4):803-12.
101. Hartman J, Frishman WH. Inflammation and Atherosclerosis: A Review of the Role of Interleukin-6 in the Development of Atherosclerosis and the Potential for Targeted Drug Therapy. *Cardiol Rev.* 2014 Mar 10.
102. Shi C, Zhu L, Chen X, Gu N, Chen L, Yang L, et al. IL-6 and TNF-alpha Induced Obesity-Related Inflammatory Response Through Transcriptional Regulation of miR-146b. *J Interferon Cytokine Res.* 2014 Jan 15.
103. Luvizotto Rde A, Nascimento AF, Imaizumi E, Pierine DT, Conde SJ, Correa CR, et al. Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br J Nutr.* 2013 Nov;110(10):1803-9.
104. Bremer AA, Jialal I. Adipose tissue dysfunction in nascent metabolic syndrome. *J Obes.* 2013;2013:393192.
105. Kuniyasu A, Ohgami N, Hayashi S, Miyazaki A, Horiuchi S, Nakayama H. CD36-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products (AGE) in mouse 3T3-L1 and human subcutaneous adipocytes. *FEBS Lett.* 2003 Feb 27;537(1-3):85-90.
106. Ueno H, Koyama H, Shoji T, Monden M, Fukumoto S, Tanaka S, et al. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) regulation of adiposity and adiponectin is associated with atherogenesis in apoE-deficient mouse. *Atherosclerosis.* 2010 Aug;211(2):431-6.
107. Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi S. Vardenafil, an inhibitor of phosphodiesterase-5, blocks advanced glycation end product (AGE)-induced up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA levels in endothelial cells by suppressing AGE receptor (RAGE) expression via elevation of cGMP. *Clin Exp Med.* 2011 Jun;11(2):131-5.
108. Geloneze B, Tambascia MA. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* 2006;50:208-15.
109. Hughey CC, Hittel DS, Johnsen VL, Shearer J. Hyperinsulinemic-euglycemic clamp in the conscious rat. *J Vis Exp.* 2011(48).

ANEXO A – Protocolo aprovado pela CEUA/UFSC**Resultado de Solicitação de Protocolo CEUA****Protocolo**

PP00819

Título

EFEITO DO TADALAFIL NAS ADIPOCINAS E MARCADORES INFLAMATÓRIOS RELACIONADOS À SÍNDROME METABÓLICA

Data de Entrada

03/09/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

07/12/2012

Considerações

Ofício nº 123/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Armando José d'Acampora, Clínica Cirúrgica - CCS
Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de setenta e dois ratos (Rattus Norvegicus).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER

APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 14/03/2017**

Data 14/12/2012




**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**

ANEXO B – ARTIGOS

1. Artigo de revisão publicado


Nitric Oxide 35 (2013) 186–192



Contents lists available at [ScienceDirect](#)


Nitric Oxide

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yniox



Review

Phosphodiesterase 5 as target for adipose tissue disorders



Giovani Colombo ^{a,*}, Maria Daniela H. Périco Colombo ^b, Leonardo De Lucca Schiavon ^a, Armando José d'Acampora ^a

^a Federal University of Santa Catarina, Brazil
^b Hematology and Transfusion Medicine Center of Santa Catarina (HEMOSC), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 5 May 2013
 Revised 26 September 2013
 Available online 28 October 2013

Keywords:
 Adipocyte
 Adipogenesis
 Nitric oxide
 Phosphodiesterase 5
 Phosphodiesterase 5 inhibitor
 White adipose tissue

ABSTRACT

Introduction: Adipose tissue as an endocrine organ is responsible for the release of multiple cytokines, which have the most diverse metabolic functions. Therefore, it is extremely important to preserve its physiological health in order to avoid local and systemic disorders. Experiments available in literature show the importance of the nitric oxide (NO)/guanosine 3'5' cyclic monophosphate (cGMP)/protein kinase G (PKG) pathway in adipocyte biology. Phosphodiesterase 5 (PDE5) is an enzyme responsible for cGMP inactivation, and the use of its inhibitors can be an alternative in the search of a more balanced adipose tissue.

Objective: This review aims to describe the PDE5 role and the possibility of using PDE5 inhibitors in adipocyte physiology derangements and their consequences.

Design and methods: Studies published in the last 10 years that related PDE5 and its inhibitors to adipose tissue were raised in major databases.

Results: PDE5 is present in adipocyte, and PDE5 inhibitors can promote adipogenesis, interfere with adipokines secretion, decrease inflammatory markers expression, and increase the thermogenic potential of white adipose tissue.

Conclusions: PDE5 plays an important role in adipocyte physiology and the use of its inhibitors may prove a useful tool to combat adipose tissue disorders and its highest expression, metabolic syndrome.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

Introduction	186
Cyclic nucleotide phosphodiesterases	187
Phosphodiesterase 5 (PDE5)	187
Phosphodiesterase inhibitors	187
Adipose tissue, adipokines, and inflammation	188
NO/cGMP/PKG pathway and the adipocyte physiology	188
NO pathway, PDE5 inhibitors and adipose tissue	189
Conclusion	191
Conflicts of interest	191
References	191

Introduction

While hunger was a constant presence during human evolution, nowadays 65% of the world's population live in countries where overweight and obesity kill more people than underweight [1,2].

Over the last years adipose tissue rose from a simple energy deposit to an endocrine organ, producing hormones known as adipokines, and also cytokines related to the onset and perpetuation of inflammation [3–5]. On account of its role in metabolic control, adipose tissue expansion leads to alteration of its normal

^{*} Corresponding author. Address: Federal University of Santa Catarina, Rua Pastor William Richard Schisler Filho, 900/711, Itacorubi, Florianópolis, Santa Catarina, CEP 88034100, Brazil. Fax: +55 48 32229357.

E-mail addresses: gcolomboufsc@gmail.com (G. Colombo), mrdanielahemosc@gmail.com (Maria Daniela H. Périco Colombo), leo-jf@uol.com.br (L.D.L. Schiavon), gacampora@gmail.com (A.J. d'Acampora).

1089-8603/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2013.10.006>

2. Artigo original submetido

Obesity



**TADALAFIL DECREASES ADVANCED GLYCATION END
PRODUCTS LEVELS IN ADIPOSE TISSUE OF DIET-INDUCED
OBESE RATS**

Journal:	<i>Obesity</i>
Manuscript ID:	14-0928-Orig
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-Aug-2014
Complete List of Authors:	Colombo, Giovani; Federal University of Santa Catarina, Internal Medicine Schiavon, Leonardo; Federal University of Santa Catarina, Internal Medicine Bazzo, Maria; Federal University of Santa Catarina, Clinical Analysis Latini, Alexandra; Federal University of Santa Catarina, Biochemistry Scheffer, Débora; Federal University of Santa Catarina, Biochemistry Golffetto, Lisleia; Federal University of Santa Catarina, Clinical Analysis d'Acampora, Armando; Federal University of Santa Catarina, Surgery
Keywords:	Adipocytes, Nitric Oxide , High-Fat Diet, Oxidative Stress, Adipokines

SCHOLARONE™
Manuscripts

