



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

VITÓRIA JULYANA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM RATOS
OBESOS INDUZIDO POR DIETA “HIGH FAT” APÓS
INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 5**

RECIFE
2022

VITÓRIA JULYANA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM RATOS
OBESOS INDUZIDO POR DIETA “HIGH FAT” APÓS
INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 5**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Valéria Nunes de Souza

RECIFE
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Vitória Julyana da.

Avaliação das alterações hepáticas em ratos obesos induzido por dieta "high fat" após inibição da fosfodiesterase 5 / Vitória Julyana da Silva. - Recife, 2022.
47 : il., tab.

Orientador(a): Valéria Nunes de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. Doença hepática gordurosa não alcoólica. 2. Estresse oxidativo. 3. Fosfodiesterase-5. 4. Inflamação. 5. Sildenafil. I. Souza, Valéria Nunes de. (Orientação). II. Título.

610 CDD (22.ed.)

VITÓRIA JULYANA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HEPÁTICAS EM RATOS
OBESOS INDUZIDO POR DIETA “HIGH FAT” APÓS
INIBIÇÃO DA FOSFODIESTERASE 5**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 25/11/2022

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra Valéria Nunes de Souza
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Profa. Dra. Cristina de Oliveira Silva
Centro Acadêmico de Vitória - UFPE/ Departamento de Nutrição

Profa. Dra. Glória I. Boente Pinto Duarte
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Dedico este trabalho a Deus e aos
meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof. Dra. Valéria Nunes pela orientação neste trabalho de conclusão de curso. Além disso, sou grata pela oportunidade que me proporcionou no desenvolvimento dos projetos de Iniciação Científica, como também minha participação na monitoria da disciplina de Fisiologia Humana.

À Prof. Dra. Glória I. B. P. Duarte, que forneceu suporte através da estrutura do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular (LFFCV) da UFPE e pelo auxílio na compra de materiais para o desenvolvimento da pesquisa.

À Profa. Dra. Luiza A. Rabelo do Laboratório de Reatividade Cardiovascular (LRC-UFAL), que colaborou com a dieta hiperlipídica e com os ensaios do perfil REDOX. Como também agradeço ao Dr. Jaime Dativo de Medeiros, que ajudou na realização do Folch.

À Mestre Rosa A. B. Rivas, Lavínia Beatriz Herminio da Silva (Mestranda) e Luiza Mayara, que ajudaram no tratamento e cuidados dos animais, bem como na realização e na análise de resultados da histologia.

Agradeço ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (LFFCV/DFF/CB/UFPE) e ao Laboratório de Reatividade Cardiovascular, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS), Universidade Federal de Alagoas (UFAL), pela estrutura fornecida para realização dos experimentos. Agradeço também aos técnicos por todo trabalho. Como também, sou grata a PROPESQ/UFPE pelo fornecimento da bolsa de apoio financeiro.

Sou imensamente grata a Deus pela sua fidelidade e amor durante todos os momentos. Gostaria de agradecer aos meus pais, Ana Sílvia e Natanael Pereira, por todo o suporte físico, emocional e espiritual durante toda graduação, sem eles não seria possível.

À Raphael Xavier por todo apoio durante a fase final do curso, que deixou os meus dias mais leves e me encorajava a cada momento. Não poderia deixar de agradecer também aos meus colegas de curso Adriana, Henrique e Jean, que estiveram comigo durante todas as lutas e conquistas do curso.

SILVA, V. J. **Avaliação das alterações hepáticas em ratos obesos induzido por dieta “high fat” após inibição da fosfodiesterase 5.** 2022. 47. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

A obesidade é uma doença inflamatória crônica, considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Ela é um importante fator de risco para o desenvolvimento dos distúrbios metabólicos que caracterizam a síndrome metabólica (SMet). Dentre estes, destaca-se a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Diversos fatores estão envolvidos na progressão da DHGNA, incluindo o fato de que o fígado gorduroso apresenta maior susceptibilidade à inflamação e ao estresse oxidativo. Importantes aspectos do metabolismo lipídico são modulados pela enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), desta forma, a inibição da PDE5 pode desempenhar uma função regulatória importante na patogenia e progressão da DHGNA, considerando-se um possível alvo terapêutico. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar as alterações hepáticas em ratos obesos induzido por dieta hiperlipídica após inibição da PDE5. Para isso, foram utilizados ratos machos Wistar, os quais foram divididos em Grupo controle (CT), que recebeu dieta padrão para roedor; Grupo obeso (HFD), que recebeu dieta hiperlipídica (58,4% kcal lipídios) e Grupo Obeso+Sildenafil (HFD-SIL) que recebeu dieta hiperlipídica e intervenção farmacológica com Sildenafil (45mg.Kg-1/dia, via oral-gavagem). Avaliaram-se: peso corporal, hepático e dos depósitos lipídicos; morfologia (histologia) e deposição lipídica hepática (técnica de Folch); perfil redox hepático (peroxidação lipídica, atividade e expressão gênica de enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase); expressão gênica hepática para um marcador para macrófagos, o “Cluster of Differentiation 68” (CD68), bem como para a captação de ácidos graxos (CD36). Os resultados demonstram que o consumo de dieta hiperlipídica aumentou significativamente o peso corporal e dos depósitos de tecido adiposo branco epididimal e perirenal, mas não do peso hepático. Entretanto, observou-se aumento significativo de triglicérides e ácidos graxos livres, bem como desarranjos na arquitetura dos hepatócitos dos animais HFD comparado aos CT. Os parâmetros redox avaliados não foram diferentes entre os grupos. Entretanto, o marcador gênico inflamatório, CD68, foi significativamente aumentado no grupo HFD comparado ao CT. No grupo HFD-SIL observou-se melhora dos desarranjos na arquitetura dos hepatócitos, diminuição da deposição qualitativa de macrovesículas lipídicas, bem como diminuição significativa do mRNA para CD36 e CD68 no fígado quando comparado ao grupo HFD sem tratamento. Em conjunto, os resultados demonstram que, no modelo animal utilizado, a inibição da PDE5 com o sildenafil parece melhorar a morfologia hepática e a deposição qualitativa de lipídios induzidos dieteticamente, possivelmente por diminuir a captação lipídica e atenuar vias inflamatórias.

Palavras-chave: Doença hepática gordurosa não alcoólica. Estresse oxidativo. Fosfodiesterase-5. Inflamação. Sildenafil.

SILVA, V. J. **Evaluation of liver changes in obese rats induced by a high fat diet after phosphodiesterase 5 inhibition.** 2022. 47. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Obesity is a chronic inflammatory disease, considered one of the biggest public health problems in the world. It is an important risk factor for the development of the metabolic disorders that characterize the metabolic syndrome (MetS). Among these, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) stands out. Several factors are involved in the progression of NAFLD, including the fact that fatty liver is more susceptible to inflammation and oxidative stress. Important aspects of lipid metabolism are modulated by the enzyme phosphodiesterase type 5 (PDE5), thus, PDE5 inhibition may play an important regulatory role in the pathogenesis and progression of NAFLD, considering it a possible therapeutic target. Therefore, the aim of this study was to evaluate liver changes in obese rats induced by a high fat diet after PDE5 inhibition. For this, male Wistar rats were used, which were divided into a control group (CT), which received a standard diet for rodents; Obese Group (HFD), which received a high fat diet (58.4% kcal lipids) and the Obese + Sildenafil Group (HFD+SIL), which received a high fat diet and pharmacological intervention with Sildenafil (45mg.Kg⁻¹/day, oral gavage). The following were evaluated: body weight, liver weight and lipid deposits; morphology (histology) and hepatic lipid deposition (Folch technique); hepatic redox profile (lipid peroxidation, activity and gene expression of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase; hepatic gene expression for a marker for macrophages, the "Cluster of Differentiation 68" (CD68), as well as for fatty acid uptake (CD36). The results demonstrate that consumption of a high fat diet significantly increased body weight and epididymal and perirenal white adipose tissue deposits, but not liver weight. However, there was a significant increase in triglycerides and free fatty acids, as well as disorders in the architecture of hepatocytes in HFD animals compared to CT. The REDOX parameters were not different between groups. However, the inflammatory gene marker, CD68, was significantly increased in the HFD group compared to the CT group. In the HFD+SIL group, there was an improvement in the architecture of hepatocytes, a decrease in the qualitative deposition of lipid macrovesicles, as well as a significant decrease in the mRNA for CD36 and CD68 in the liver when compared to the HFD group without treatment. Taken together, the results demonstrate that, in the animal model used, the inhibition of PDE5 with sildenafil seems to improve hepatic morphology and the qualitative deposition of dietary-induced lipids, possibly by decreasing lipid uptake and attenuating inflammatory pathways.

Key words: Non-alcoholic fatty liver disease. Oxidative Stress. Phosphodiesterase 5. Inflammation. Sildenafil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Relação da inflamação do tecido adiposo com o tecido hepático na DHGNA	18
Figura 2 – Progressão da DHGNA.	19
Figura 3 – A captação de ácidos graxos para dentro do hepatócito através da CD36.	20
Figura 4 – Ativação das vias inflamatórias clássica e alternativa.	22
Figura 5 – Ação do cGMP nos órgãos envolvidos na regulação do metabolismo... ..	23
Figura 6 – Deposição lipídica hepática.	31
Figura 7 – Imagens representativas do tecido hepático corado com Hematoxilina e eosina (H&E).	32
Figura 8 – Atividade enzimática hepática da SOD e Catalase. Peroxidação lipídica, TBARS.	33
Figura 9 – Expressão relativa mRNA SOD1, Catalase, CD36 e CD68 no tecido hepático.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de *primers* utilizados (5'–3').28

Tabela 2 - Peso corporal, dos tecidos adiposos epididimal e perirenal e tecido hepático de ratos controle, HFD e HFD+SILDENAFIL.30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
CD36	Cluster de Diferenciação 36
CD68	Cluster de Diferenciação 68
cGKI	Proteína Cinase Tipo I Dependente de cGMP
cGMP	Guanosina 3' 5' Monofosfato Cíclico
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
ERON	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
HE	Hematoxilina e Eosina
HFD	Dieta High Fat
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
NEFA	Ácidos Graxos Não Esterificados
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDE5	Fosfodiesterase 5
PKG	Proteína Quinase Ativada pela cGMP
PKGI	Proteína Quinase Ativada pela cGMP (isoforma 1)
PPAR- γ	Receptores Ativados Por Proliferadores De Peroxissomas Gama
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
RI	Resistência à Insulina
sGC	Guanilato Ciclase Solúvel
SMet	Síndrome Metabólica
SOD	Superóxido Dismutase
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAM	Tecido Adiposo Marrom
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
UCP1	Proteína Desacopladora 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 OBESIDADE.....	15
2.1.1 Parâmetros Moleculares da Obesidade.....	16
2.2 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA.....	19
2.3 FOSFODIESTERASE TIPO 5 E SILDENAFIL.....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: MODELO ANIMAL E CUIDADOS ÉTICOS.....	26
4.2 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
4.3 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO LIPÍDICA HEPÁTICA.....	27
4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA HEPÁTICA.....	27
4.5 AVALIAÇÃO REDOX HEPÁTICA.....	28
4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	29
4.7 COMITÊ DE ÉTICA.....	29
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXOS.....	46
ANEXO A	47

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pelo acúmulo anormal e excessivo de gordura tanto no tecido adiposo quanto na distribuição regional do corpo (WHO, 2000; BELLIGOLI *et al.*, 2019), com índice de massa corporal (IMC) $\geq 30\text{kgm}^2$ (SPEED, M. S. *et al.*, 2019), sendo considerada um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Estima-se que em 2025 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso (WHO, 2018) e 38% da população adulta do mundo (WANG, J. *et al.*, 2019) tenha excesso de peso em 2030 sem intervenção eficaz (JULIBERT *et al.*, 2019). Esse crescimento exponencial da obesidade tem contribuído com o desenvolvimento de morbidades e complicações metabólicas nos sistemas, o que pode ser considerado como um potencial gatilho pró-inflamatório (SJÖSTRÖM, L. *et al.*, 2004; RUIZ-CANELA *et al.*, 2015; FRANCO, MORAIS & COMINETTI, 2016; GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017).

Dentre os distúrbios metabólicos resultantes da obesidade, tem-se a síndrome metabólica (SMet), um complexo sindrômico que reúne diversos fatores de risco cardiovasculares e metabólicos e é considerado um desafio multidisciplinar com importante repercussão para a saúde pública (ALBERTI *et al.*, 2009). A manifestação hepática da SMet é a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), decorrente da infiltração de gordura no fígado na ausência de consumo em longo prazo de etanol e/ou outras causas conhecidas de doença hepática, este agravo pode progredir para condições mais graves da doença como a cirrose e o hepatocarcinoma (ALBERTI *et al.*, 2009; BYRNE & TARGHER, 2014).

Diversos fatores estão envolvidos na progressão da DHGNA, incluindo o fato de que o fígado gorduroso apresenta maior susceptibilidade à inflamação e ao estresse oxidativo. Este último é um fenômeno decorrente do desequilíbrio entre as reações de oxidação e redução, caracterizado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) em função da produção aumentada destes ou pela redução das defesas antioxidantes e/ou pela combinação de ambos os fatores, levando a danos moleculares (DRÖGE, 2002; SIES, BERNDT & JONES, 2017). Esse processo está intimamente relacionado com o surgimento e progressão das morbidades que caracterizam à SMet, como a obesidade, a hipertensão, a diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e a resistência à insulina (RI), uma vez que promove diversos efeitos tóxicos no metabolismo celular e potenciais danos

fisiológicos nos sistemas (FONSECA *et al.*, 2014).

A inflamação severa do tecido adiposo prejudica a ação antilipolítica da insulina, promovendo uma maior captação e acúmulo de ácidos graxos livres no fígado, RI, inflamação e, posteriormente, fibrose (TILG & MOSCHEN, 2010; ALISI *et al.*, 2017; DULAI *et al.*, 2017). Desta forma, o elo importante entre a inflamação do tecido adiposo e do fígado relacionada com a obesidade diz respeito também ao papel emergente da polarização de macrófagos M1, via clássica que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias levando ao prejuízo tecidual (GORDON & MARTINEZ, 2010; ALISI *et al.*, 2017).

Importantes aspectos do metabolismo de lipídios são modulados pela via óxido nítrico (NO)/Guanilato ciclase solúvel (sGC)/Guanosina 3 '5' monofosfato cíclico (cGMP)/proteína quinase ativada pela cGMP (PKG): o aumento do cGMP melhora a sensibilidade à insulina (AYALA *et al.*, 2007), é importante para promover a expansão saudável do tecido adiposo branco, além do escurecimento do mesmo, fenômeno conhecido como “browning” (MITSCHKE *et al.*, 2013). A estimulação desta via melhora o fenótipo metabólico de camundongos com obesidade induzido por dieta (HOFFMANN *et al.*, 2015) e reverte a inflamação no tecido adiposo induzido por dieta hiperlipídica (HANDA *et al.*, 2011). Recentemente Chen e colaboradores (2022) demonstraram que o NO estimula a mobilização intracelular de zinco através da via sGC/cGMP/PKG, estimulando subsequentemente a diferenciação dos adipócitos. Desta forma, estratégias terapêuticas que aumentem esta sinalização podem ser importantes na prevenção e/ou tratamento de doenças associadas à obesidade, como a DHGNA. Nesse sentido, a inibição da fosfodiesterase 5 (PDE5), enzima específica para a hidrólise do cGMP (COLOMBO, G. *et al.*, 2013), pode desempenhar uma função regulatória importante na patogenia e progressão da DHGNA associada à obesidade, considerando-se um possível alvo terapêutico.

Embora diversos eventos metabólicos induzidos por dieta rica em lipídios tenham sido avaliados, os estudos moleculares em modelos animais experimentais que indiquem alvos envolvidos com o desenvolvimento da obesidade e das outras comorbidades associadas, como a DHGNA, ainda são necessários. Neste trabalho inibiu-se a PDE5 com o sildenafil em ratos obesos induzidos dieteticamente, na hipótese de que o aumento da sinalização do cGMP no tecido adiposo e fígado reflète na melhora das alterações hepáticas envolvidas na progressão da DHGNA associada à obesidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OBESIDADE

A obesidade é uma doença multifatorial que apresenta um processo patogênico complexo, o qual inclui fatores biológicos, psicossociais, socioeconômicos e ambientais, pelos quais desencadeiam fatores de risco à saúde por meio de uma heterogeneidade de vias metabólicas (POWELL-WILEY *et al.*, 2021). A obesidade aumenta o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios musculoesqueléticos e alguns tipos de cânceres (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017; WHO, 2000). Desse modo, esse agravamento metabólico é uma problemática que está diretamente ligada a uma diminuição na expectativa de vida da população, bem como aumentos expressivos de despesas financeiras para os sistemas de saúde (ENGIN, 2017).

A obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das doenças não transmissíveis, que incluem principalmente doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas, câncer e Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2), as quais estão diretamente associadas com a diminuição da expectativa de vida, representando uma perda de aproximadamente 5-20 anos, que varia de acordo com o grau de severidade da obesidade, como também pode ser afetada pela presença de comorbidades associadas (BLÜHER, 2019). Além de distúrbios fisiológicos, a obesidade também pode proporcionar desvantagens sociais, como uma baixa qualidade de vida, propensão ao desemprego e baixa produtividade (WOOLF; PFLEGER, 2003).

A causa fundamental da obesidade é o desbalanço energético prolongado entre um excesso de calorias consumidas e um baixo gasto energético (YANOVSKI, 2018). Mundialmente, é possível observar um aumento no consumo de alimentos com alta densidade energética, os quais são ricos em gordura e açúcares. Junto a isso, a tendência de crescimento da inatividade física resultante do estilo de vida sedentário ligado às atuais maneiras de trabalho, mudanças nos meios de transporte e urbanização, são causas da obesidade e sobrepeso (WHO, 2021).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a obesidade como um aumento no acúmulo de lipídios que pode repercutir na homeostase da massa

corporal, a qual pode ser diagnosticada através de um Índice de Massa Corporal (IMC) ≥ 30 kg/m² (WHO, 2017). Diante dos parâmetros para classificar a obesidade, o IMC ainda é o mais utilizado atualmente na classificação da obesidade. Entretanto, Powell-Wiley e colaboradores (2021) evidenciaram a presença de riscos cardiometabólicos e cardiovasculares em pacientes que apresentam excesso de depósito lipídico visceral, mas não são classificados como obesos diante dos parâmetros do IMC. Sendo assim, a mensuração da circunferência abdominal é uma metodologia que fornece indicações da composição corporal do indivíduo e adiciona informações importantes que complementam o diagnóstico clínico e diminuem as taxas de subdiagnóstico (POWELL-WILEY *et al.*, 2021).

Estimativas realizadas no ano de 2016 revelam que mais de 1.9 bilhões de adultos, com idade acima de 18 anos, apresentavam um grau de sobrepeso (IMC ≥ 25 kg/m²) e mais de 650 milhões foram classificados com algum grau de obesidade. Diante disso, os dados apurados em 2016 pela OMS apontam que 39% da população mundial adulta apresentava sobrepeso e 13% eram obesos. Sendo assim, a obesidade quase triplicou no período entre 1975 e 2016 (WHO, 2021) e tornou-se um sério problema de saúde pública, fazendo-se necessários estudos para desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes para seu tratamento, bem como melhor compreensão de sua fisiopatogenia.

2.1.1 Parâmetros Moleculares da Obesidade

O tecido adiposo está envolvido em importantes aspectos do balanço energético corporal, dessa forma, é classificado em dois principais tipos: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). Durante os primeiros anos de vida existe o predomínio do TAM, mas a sua concentração diminui de acordo com o envelhecimento na medida em que o TAB se apresenta de maneira mais abundante (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017).

O TAM possui como principal função a termogênese, que é promovida pela alta concentração de mitocôndrias e a elevada expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1), também conhecida como termogenina. Essa proteína dissipa a energia do gradiente de prótons mitocondrial em forma de calor, sendo então uma via alternativa que não utiliza a ATP-sintase para conservar a energia da entrada de prótons na matriz mitocondrial em forma de ATP (ENERBÄCK, 2010). Por outro

lado, o TAB apresenta importante função endócrina, além de armazenar energia e secretar adipocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias, a exemplo da leptina, adiponectina, interleucinas (IL), resistinas e fator de necrose tumoral- α (TNF α) (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017; MITSCHKE *et al.*, 2013; UNAMUNO *et al.*, 2018). Além desses, também é possível destacar um terceiro tipo que é classificado como tecido adiposo bege, que pode ser observado no TAB após a exposição a baixas temperaturas, tratamentos prolongados com agonistas β -adrenérgicos ou agonistas de receptores ativados por proliferadores de peroxissomas gama (PPAR- γ) (PETROVIC *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Mitschke e colaboradores (2013) evidenciou a participação da via cGMP/PKG na isoforma I (PKGI) no processo de escurecimento do TAB, também conhecido como "browning", o qual pode potencialmente ser adotado como alternativa terapêutica no tratamento da obesidade através do uso de fármacos que aumentem os níveis de cGMP.

O tecido adiposo possui grande capacidade de adaptação aos estímulos metabólicos. Portanto, por conta das funções que o TAB exerce, ele está mais propenso a se adequar rapidamente aos estímulos que favorecem a obesidade. Sendo assim, o mecanismo para manutenção da homeostase se dá pelo aumento do depósito lipídico, conhecido como hipertrofia dos adipócitos, bem como a hiperplasia destes, que corresponde à formação de novos adipócitos (BERLANGA *et al.*, 2014; GHABEN, 2019). O processo de armazenamento de energia em forma de triglicerídeos e ácidos graxos chama-se lipogênese. Por outro lado, o processo de quebra de triglicerídeos e liberação dos ácidos graxos é conhecido como lipólise (LUO & LIU, 2016).

A partir do aumento do depósito lipídico, durante quadros de obesidade, disfunções bioquímicas e moleculares levam a um cenário inflamatório (**Figura 1**) e ao desequilíbrio na secreção das adipocinas, onde predomina a liberação de elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e diminuição das anti-inflamatórias, estabelecendo, desta forma, um estado inflamatório crônico (OUCHI, 2011; HAMMARSTEDT *et al.*, 2018). Em consequência, inicia-se o processo de resistência à insulina sistêmica, DM2, o excesso de lipídios é direcionado para outros *locus* (coração, vasos, fígado), comprometendo suas funções e caracterizando, desta forma, a lipotoxicidade (ALBERTI *et al.*, 2009; GRUZDEVA *et al.*, 2018; HAMMARSTEDT 2018).

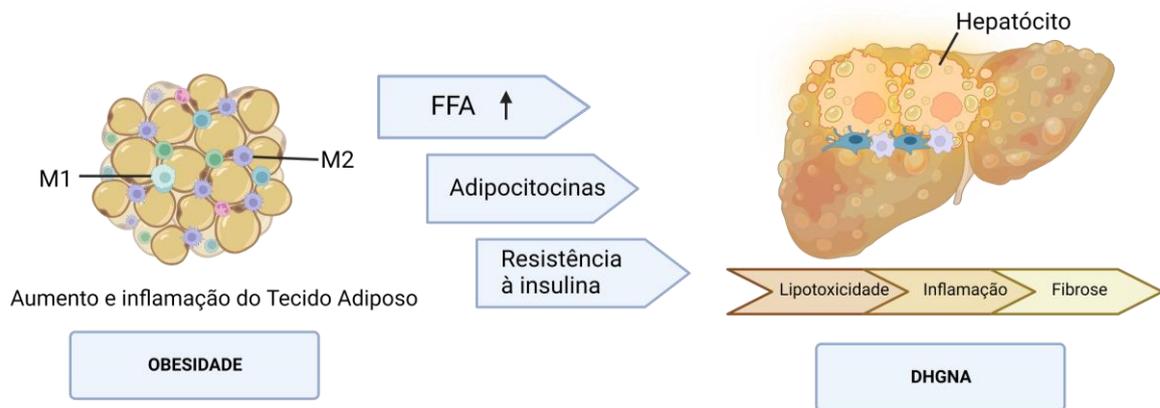


FIGURA 1. Relação da inflamação do tecido adiposo com o tecido hepático na DHGNA. FFA: ácidos graxos livres, do inglês “free fatty acids”; M1: macrófagos M1; M2: macrófagos M2. Fonte: adaptado de Alisi *et al.* 2017.

No cenário exposto, surge o quadro clínico conhecido como SMet, uma doença multifatorial definida como um conjunto de múltiplas desordens cardiovasculares e metabólicas, como hipertensão, DM2, resistência à insulina sistêmica, dislipidemia, DHGNA e obesidade (ALBERTI *et al.*, 2009), sendo esta última um fator etiológico da síndrome (AYDIN *et al.*, 2014). Sendo assim, tem sido utilizado modelos animais que reproduzem as alterações principais da doença visando a semelhança dos aspectos humanos dessa condição metabólica, com o objetivo de desenvolver novas estratégias para o tratamento das comorbidades que caracterizam a SMet. Desse modo, tendo em vista que a obesidade é um dos fatores centrais para o surgimento da SMet, o modelo animal em que há indução da obesidade através de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas são as mais utilizadas por se assemelharem com a dieta ocidental, que, por sua vez, está altamente associada com a obesidade (MORENO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2018; NUNES-SOUZA *et al.*, 2016).

Neste contexto, tendo-se a DHGNA como a manifestação hepática da SMet e sabendo-se da relevância fisiológica deste tecido como órgão estratégico para homeostase corporal, o conhecimento das alterações patológicas neste órgão torna-se relevante.

2.2 DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA

A doença hepática gordurosa não alcoólica é definida com base na presença da esteatose hepática, a qual é determinada pelo índice de adiposidade hepática e exames de imagem ou histologia. É importante ressaltar que o diagnóstico da DHGNA se dá na ausência de outras causas como: consumo de álcool (<20-30 g/dia), infecções virais, medicamentos esteatogênicos ou desordens monogênicas hereditárias (ARAÚJO *et al.*, 2018).

A DHGNA é a manifestação hepática da SMet (ALBERTI *et al.*, 2009), um agravo metabólico que é resultado da deposição de gotículas lipídicas nos hepatócitos na ausência de consumo de etanol a longo prazo, bem como de outras causas de doença hepática (BYRNE & TARGHER, 2014; BRUNT *et al.*, 2015; HASHIMOTO, TOKUSHIGE & LUDWIG, 2015). Tal agravo pode progredir para esteato-hepatite não alcoólica, caracterizada por esteatose, inflamação lobular e portal com progressiva deposição de colágeno, remodelamento vascular e, em consequente, evolução a estados mais graves da doença, como a cirrose e hepatocarcinoma (**Figura 2**) (BYRNE & TARGHER, 2014).

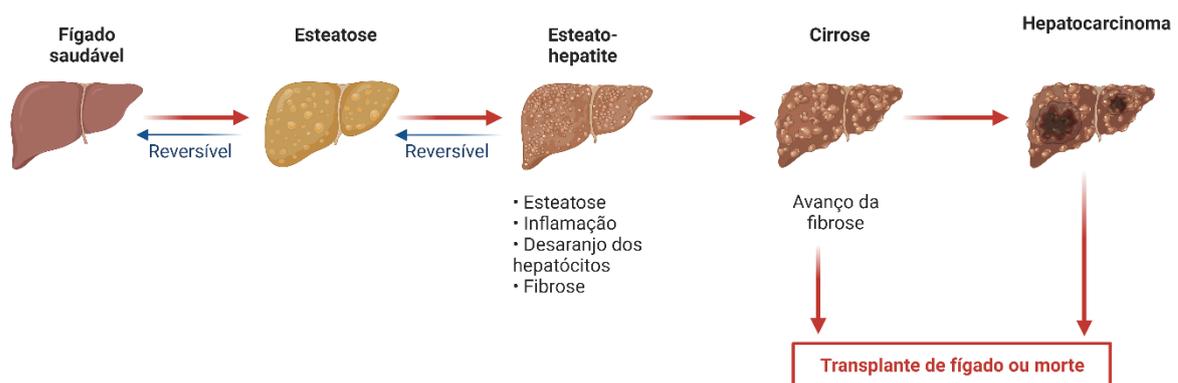


FIGURA 2. Progressão da DHGNA. Fonte: o autor.

Como descrito anteriormente, em consequência à disfunção dos adipócitos durante a obesidade, o excesso de lipídios é direcionado para outros órgãos, como o fígado. A captação de ácidos graxos para dentro do hepatócito ocorre através da CD36 (*cluster of differentiation 36*, também conhecida como translocase de ácidos graxos) e, desta forma, o aumento da regulação desta no fígado está

associado com a esteatose (**Figura 3**) (MIQUILENA-COLINA *et al.*, 2011; SHEEDFAR *et al.*, 2014). O excesso de ácidos graxos no fígado leva ao prejuízo da β -oxidação lipídica mitocondrial e, conseqüentemente, induz a disfunção mitocondrial com produção de EROs, as quais assumem um papel importante na progressão da DHGNA (PARADIES *et al.*, 2014).

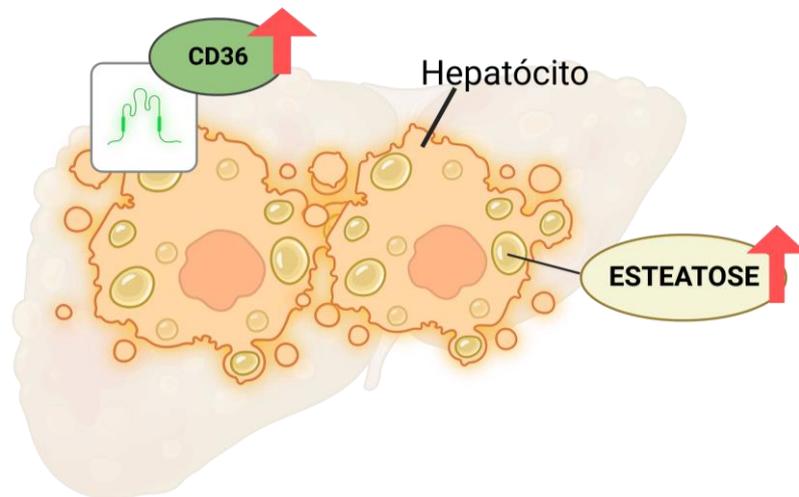


FIGURA 3. A captação de ácidos graxos para dentro do hepatócito através da CD36. O aumento da regulação desta no fígado está associado com a esteatose. Fonte: o autor.

Na manutenção da homeostase do metabolismo celular, ocorre a produção de EROs em concentrações baixas e moderadas, as quais atuam na fisiologia celular. Entretanto, elevadas concentrações destas moléculas reativas podem promover o estresse oxidativo. Este último é definido como uma condição onde o excesso de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio compromete ou é superior à ação dos sistemas antioxidantes endógenos, em função do aumento das substâncias pró-oxidantes ou diminuição da defesa antioxidante (DRÖGE, 2002; WOLIN, 2009). Tendo em vista esses processos, a regulação do estado redox através de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos é de extrema importância para manter a viabilidade celular, bem como preservar as funções de tecidos e órgãos. Desse modo, os principais antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutatona peroxidase (BIRBEN *et al.*, 2012).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina, em uma reação catalisada por três isoformas diferentes da NO sintase, atuando como componente chave em

diversos processos biológicos, sendo importante para manutenção do tônus vascular, pressão arterial, neurotransmissão, coagulação, na resposta imunológica e nos mecanismos oxidativos (FARAH, MICHEL, BALLIGAND, 2018). O NO exerce funções fisiológicas importantes atuando através de duas vias diferentes. A primeira é uma via indireta que promove a ativação da sGC, a síntese do cGMP e a consequente ativação da PKG. Por outro lado, a via direta de sinalização celular consiste na modulação de funções proteicas por meio de S-nitrosilação/N-nitrosilação, S-glutathionilação e nitração (INFANTE; COSTA; NAPOLI, 2021).

Diversos fatores patogênicos têm sido avaliados na hipertensão associada à obesidade, dentre eles, a disfunção endotelial é caracterizada pela diminuição da biodisponibilidade do NO juntamente com o comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio (DURANTE; JOHNSON; JOHNSON, 2007). Por outro lado, tem sido demonstrado que a enzima arginase é um potencial indutor da disfunção endotelial. A arginase é uma enzima central do ciclo da ureia, cuja função é metabolizar L-arginina em ornitina e ureia, compreendendo-se como a principal via para eliminação do excesso de nitrogênio resultante do metabolismo de aminoácidos e ácidos nucleicos. A arginase está expressa em tecidos extra-hepáticos, incluindo os vasos sanguíneos, onde compete com a enzima NO sintase endotelial (eNOS) pelo substrato L-arginina. Desse modo, pelo fato de a L-arginina ser o substrato exclusivo da eNOS, essa competição enzimática pode resultar numa diminuição da biodisponibilidade desse substrato para a via de produção do NO (JOHNSON *et al.*, 2015).

A obesidade é um fator de risco independente para a progressão da esteatose hepática para esteatohepatite, fibrose e progressão para cirrose (BYRNE & TARGHER, 2015). A severa inflamação do tecido adiposo branco prejudica a ação antilipolítica da insulina, induzindo no fígado a maior captação e acúmulo de ácidos graxos livres, assim como resistência à insulina hepática, inflamação e fibrose. Em tecidos metabólicos como o tecido adiposo, as células imunes (macrófagos e linfócitos T) têm um papel principal na progressão e desencadeamento de outras doenças, como a DHGNA (ALISI, *et al.*, 2017). Assim, em quadros de obesidade, ocorre uma comunicação importante entre a inflamação do tecido adiposo e do fígado, relacionada ao papel emergente dos macrófagos (ALISI *et al.*, 2017).

Os macrófagos já presentes no fígado, bem como aqueles que se diferenciam a partir dos monócitos circulantes que são recrutados, dão origem a

ativação inflamatória clássica (M1) ou alternativa (M2). A via clássica induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e, desta forma, causam um prejuízo tecidual, enquanto que a ativação da via alternativa induz ação anti-inflamatória, promovendo a reparação tecidual (**Figura 4**) (GORDON & MARTINEZ, 2010; ALISI *et al.*, 2017). Contudo, quando a lesão hepática persiste, como observado durante a progressão da DHGNA, os macrófagos M2 assumem um papel pro-fibrótico, dando origem a uma fibrose exacerbada (ALISI *et al.*, 2017), passando a contribuir para a progressão da DHGNA.

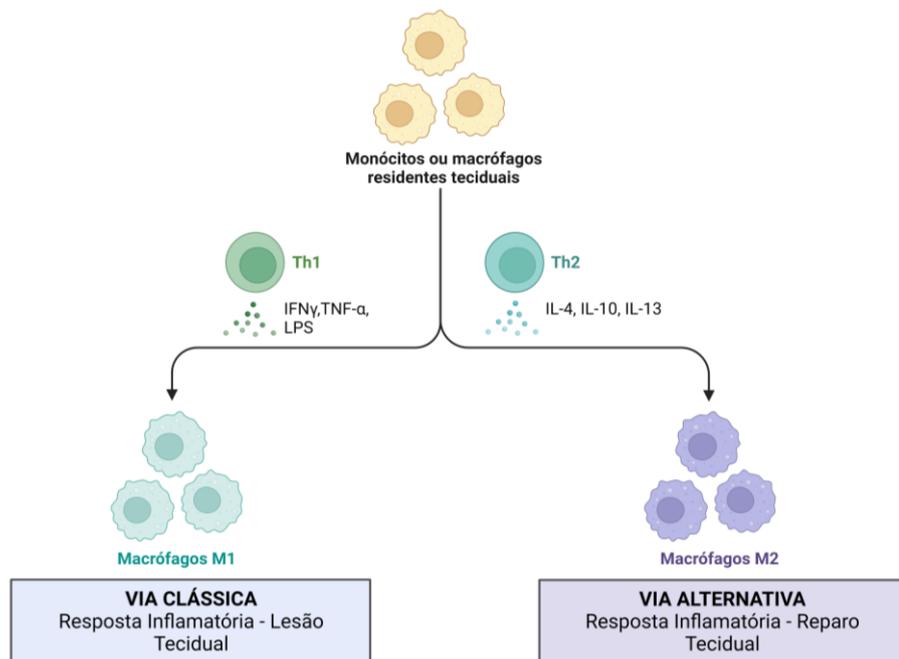


FIGURA 4. Ativação das vias inflamatórias clássica (M1) e a alternativa (M2). Fonte: adaptado de Alisi *et al.* 2017.

A via do NO/cGMP é importante para dilatação dos sinusóides hepáticos e consequente diminuição da resistência intra-hepática e da pressão portal, alterações presentes em quadros de cirrose hepática (IWAKIRI, 2015; KREISEL *et al.*, 2021; IWAKIRI & TREBICKA, 2021). A manutenção fisiológica desta via é chave para o metabolismo hepático no sentido de evitar a inflamação por infiltração aumentada de macrófagos e aumento da sinalização de IL-6, bem como prejuízo na ação da insulina (LUTZ *et al.*, 2011).

2.3 FOSFODIESTERASE TIPO 5 E SILDENAFIL

Nos mamíferos, foram identificadas 11 diferentes famílias de fosfodiesterases (PDEs), as quais possuem aproximadamente 100 subtipos e isoformas, distribuídas em diferentes tecidos de acordo com os estágios de desenvolvimento metabólico. Essa enzima tem como principal função catalisar a hidrólise dos nucleotídeos cíclicos que atuam como segundo mensageiro nas vias de sinalização celular (TULSIAN *et al.*, 2021).

A PDE5 é específica para a hidrólise do cGMP, que é um segundo mensageiro mediador de diversas respostas biológicas (**Figura 5**), incluindo vias hormonais, quimiocinas e citocinas (COLOMBO G. *et al.*, 2013). Dentre essas vias é possível destacar a via NO/cGMP/PKG, a qual tem grande importância na regulação cardiovascular e, também, do metabolismo de lipídios. A PDE5 atua hidrolisando o GMPc, produzindo uma forma inativa desse segundo mensageiro, conhecida como 5'-GMP. Portanto, o uso de um inibidor da PDE-5 promove uma maior biodisponibilidade do cGMP (KREISEL *et al.*, 2020).

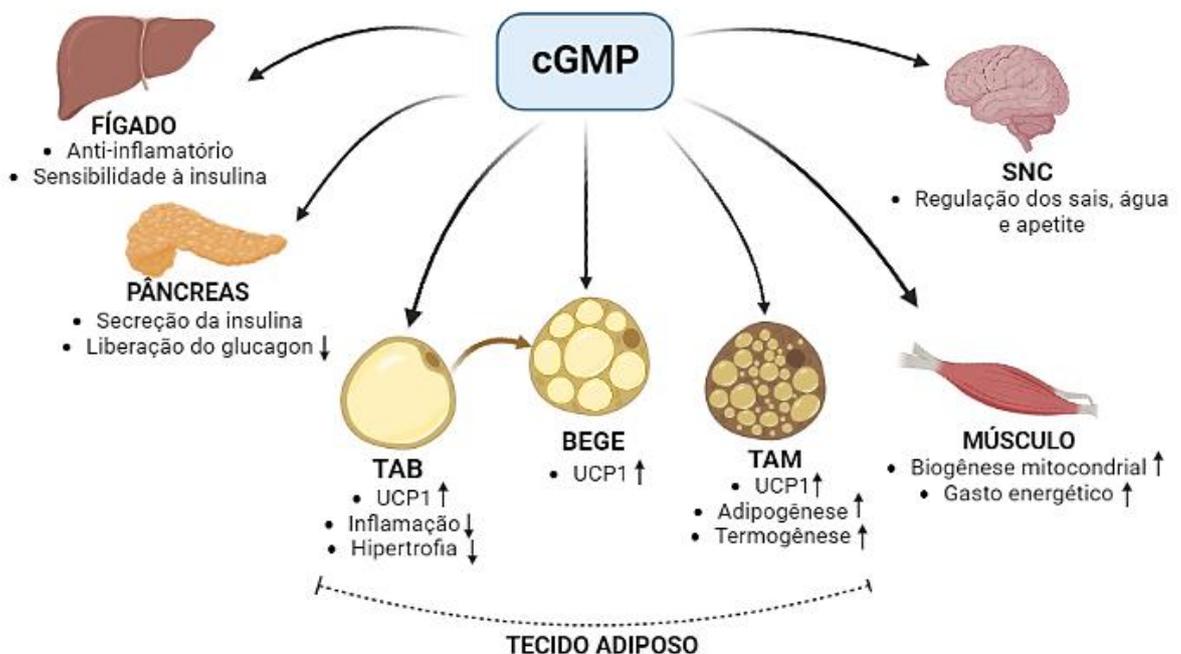


FIGURA 5. Ação do cGMP nos órgãos envolvidos na regulação do metabolismo. O cGMP regula vias de sinalização metabólicas que envolvem a insulina e glucagon,

além de potencialmente atuar como anti-inflamatório no tecido hepático. No tecido adiposo o cGMP reduz a hipertrofia do TAB, induz o efeito “Browning” e atua na diferenciação do TAM, aumentando o gasto energético. No tecido muscular o cGMP aumenta o gasto energético e no sistema nervoso central causa regulação de sais, água e apetite. Fonte: adaptado de Pfeifer *et al.*, 2013.

Tendo em vista os benefícios terapêuticos da inibição da PDE5, o primeiro fármaco produzido para essa finalidade foi o sildenafil, o qual foi aprovado pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (do inglês: “Food and Drug Administration” - FDA) no ano de 1998. Outros inibidores da PDE5 também foram aprovados, incluindo o tadalafil, vardenafil e avanafil. Esses inibidores apresentam diferenças farmacodinâmicas e farmacocinéticas que abrangem a seletividade de inibição da PDE5, potência de resposta, indicações de tratamento e efeitos adversos (AHMED; GEETHAKUMARI; BISWAS, 2021).

O sildenafil é um inibidor da PDE5 usado para o tratamento da disfunção erétil, hipertensão arterial pulmonar, demonstrando, experimentalmente, ação de diminuição da RI e expressão de citocinas pró-inflamatórias induzidas por dieta hiperlipídica no tecido adiposo de camundongos, como resultado do aumento dos níveis de cGMP (AYALA *et al.*, 2007; HANDA *et al.*, 2011). Considerando-se que a RI é um componente chave na patogênese da SMet e da DHGNA, demonstrou-se que, a inibição crônica da PDE5 com o sildenafil melhorou a sensibilidade à insulina em camundongos cronicamente alimentados com dieta hiperlipídica, destacando-se à PDE5 como um alvo potencial na inibição da RI e, conseqüente, melhora do perfil metabólico sistêmico e hepático (AYALA *et al.*, 2007).

Diante do exposto, neste trabalho inibiu-se a PDE5 com o sildenafil em ratos obesos induzidos dieteticamente, para avaliar se o aumento da sinalização do cGMP no fígado melhora as alterações hepáticas envolvidas na progressão da DHGNA associada à obesidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações hepáticas em ratos obesos induzido por dieta hiperlipídica após inibição da fosfodiesterase 5.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir a doença hepática gordurosa não alcoólica em ratos *Wistar* através da ingestão de dieta hipercalórica e hiperlipídica e realizar o tratamento farmacológico com sildenafil, um inibidor da fosfodiesterase 5;
- Avaliação hepática dos seguintes parâmetros:
 - Análise morfológica e de deposição lipídica qualitativa;
 - Deposição lipídica quantitativa, através da extração lipídica total e mensuração de frações lipídicas;
 - Peroxidação lipídica, atividade e expressão gênica de enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase);
 - Expressão gênica de um marcador para macrófagos (CD68) e um marcador de captação de ácidos graxos (CD36).

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: MODELO ANIMAL E CUIDADOS ÉTICOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Cardiovascular (LFFCV) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram utilizados ratos machos *Wistar* com 8 semanas de idade provenientes do Biotério Departamental da UFPE e divididos em 3 grupos experimentais: 1) O grupo Controle (**CT**; **n=5**), que recebeu dieta padrão “Chow” para roedor (11,8 % kcal lipídios); 2) Grupo Obeso (**HFD**; **n=5**), que recebeu dieta hiperlipídica (“high fat diet” - 58,4% kcal lipídios; NUNES-SOUZA *et al.*, 2016) por 16 semanas; 3) Grupo Obeso+Sildenafil (**HFD+SIL**; **n=7**), que recebeu dieta hiperlipídica durante 16 semanas e intervenção farmacológica com sildenafil (45mg.Kg⁻¹/dia, via oral-gavagem; WALKER *et al.*, 1999). Para este tratamento, o sildenafil foi administrado durante as 8 semanas finais da intervenção dietética. Diante das condições padrão de experimentação animal, foi administrado: água e alimentação *ad libitum*, tendo como veículo a água destilada nos grupos (CT e HFD). Durante todo o tempo experimental, os animais permaneceram alojados (2-3 por gaiola) em biotério com ciclo de luminosidade de 12 horas (6:00 às 18:00 h), com uma variação da temperatura entre 21 ± 2,0 °C, e em condições adequadas de higienização. Ao final da experimentação os animais foram pesados em balança de precisão para averiguação do peso corporal.

4.2 EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após o tratamento experimental delineado para cada grupo, os animais foram previamente anestesiados com ketamina/xilasina (110/10 mg.kg⁻¹, i.p) e, posteriormente, eutanasiados por punção cardíaca. Na sequência, o fígado de cada animal foi coletado, pesado em balança analítica e armazenado em freezer -80 °C (SANYO, North American Corporation, Panasonic Group) para posteriores análises. Desse modo, uma fração do tecido hepático foi destinada às análises histológicas e outras frações para análise lipídica e molecular. Ademais, os tecidos adiposos epididimal e perirenal também foram coletados e pesados em balança analítica, com o objetivo de avaliar a deposição lipídica. A tíbia direita foi coletada e utilizada para a

avaliação do crescimento longitudinal dos animais e normalização dos pesos teciduais, mensurando-a em comprimento através de um paquímetro.

4.3 AVALIAÇÕES HISTOLÓGICAS E QUANTIFICAÇÃO LIPÍDICA HEPÁTICA

Os fragmentos hepáticos foram fixados por imersão em formalina tamponada 10% por 24 horas. Na sequência, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70 – 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Para avaliação qualitativa da arquitetura e da deposição lipídica hepática, as inclusões em parafina foram seccionadas em micrótomo manual e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Posteriormente, as imagens obtidas por microscopia óptica de luz foram avaliadas qualitativamente através do software “Fiji-ImageJ® image processing software”. Ademais, a avaliação quantitativa da deposição lipídica hepática foi realizada através da extração lipídica pela técnica gravimétrica de Folch (Folch *et al.*, 1957) seguido pela mensuração dos níveis de lipídios totais, triglicerídeos, colesterol e ácidos graxos não esterificados (NEFA, do inglês “non-esterified fatty acid”) através de *kits* comerciais (Labtest® e WakoChemicals®) adaptados para microplacas.

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA HEPÁTICA

A expressão gênica no fígado foi avaliada através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) (Livak; Schmittgen, 2001). Onde o RNA total foi isolado por meio do Trizol® (Reagente Trizol®, Darmstadt, Alemanha) e quantificado na absorbância de 260nm. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa do cDNA a partir de 1 µg de RNA extraído (Reverse Transcriptase – Invitrogen®) e, na sequência, amplificado usando o GoTaq-qPCR Master Mix (Promega®; Mannheim, Alemanha) por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (Real time qPCR) para *primers* (**Tabela 1**) de alvos envolvidos com a via REDOX: superóxido dismutase 1 (SOD-1) e catalase; x inflamatória: *Cluster of Differentiation* 68 (CD68); e lipídica: CD36. O RNA foi quantificado como um valor relativo em comparação com uma referência interna, o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A análise da expressão foi obtida pela elevação negativa do $\Delta\Delta CT$ (“threshold cycle”) na base 2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen, 2001)

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados (5'–3').

Primer	Forward	Reverse
Catalase	CACGCTGGTAGTTGGCCACT	GCCCAGCCCTGACAAAATGC
CD36	CATGTAGGAAATGTGGAAGCGA	TCTTCCAGCCAATGCCTTTG
CD68	TAGGACCGCTTATAGCCCAAG	CTGTAGGTGTCATCGTGAAG
GAPDH	CCATCACCATCTTCCAGGAG	GTGGTTCACACCCATCACAA
SOD1	GACGGTGTGGCCAATGTGTC	CAAGCGGCTCCCAGCATTTC

CD36: *cluster of differentiation 36*; CD68: *cluster of differentiation 68*; GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; SOD1: superoxide dismutase 1.

4.5 AVALIAÇÃO REDOX HEPÁTICA

Para obtenção do homogenato, o tecido hepático foi triturado em tampão de lise celular RIPA (Tampão para radioimunoprecipitação – Cell Signaling Technology®, Beverly, MA) contendo coquetel de inibidores de protease e fosfatases (Roche®, Mannheim, Germany) em um homogeneizador. Na sequência, o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para dosagens enzimáticas e de peroxidação lipídica. Os dados obtidos foram normalizados pela concentração de proteínas totais, as quais foram mensuradas no sobrenadante utilizando o método de *Bradford* (BRADFORD, 1976).

A avaliação da peroxidação lipídica utiliza como marcadores as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), principalmente o malonildialdeído. Para isso, a mensuração dos metabólitos peroxidados foi realizada em microplacas por método já descrito anteriormente (WALLIN et al., 1993) com adaptações para microplacas. Para efetuar a mensuração da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi utilizado *kit* comercial (Sigma®) realizado em microplaca conforme instruções do procedimento operacional padrão do fabricante. Além disso, a atividade da catalase foi realizada pela taxa de decomposição de H₂O₂, o substrato da enzima, de acordo com o método descrito anteriormente (XU et al., 2008).

4.6 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise dos dados obtidos foi efetuada através da análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo *post-test Bonferroni*. Onde foram considerados valores de $p < 0,05$ para indicar significância estatística. Para tabulação e análise estatística dos resultados foram utilizados os programas Excel® (Microsoft, Santa Barbara, CA, USA) e Graph pad Prism® 5,0 (San Diego, CA, USA), pelos quais foram enfim expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

4.7 COMITÊ DE ÉTICA

A presente proposta é um subprojeto do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFPE com o número de processo nº0039/2020.

5 RESULTADOS

Conforme descrito na **Tabela 2**, observa-se um aumento significativo do peso corporal dos grupos que receberam a dieta hiperlipídica (HFD e HFD+SILD) quando comparados com o grupo que recebeu a dieta “Chow” padrão para roedor (CT). Além disso, observa-se uma maior deposição de tecido adiposo epididimal e perirenal dos grupos obesos (HFD e HFD+SILD) quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, o peso hepático não diferiu significativamente entre os grupos avaliados.

Tabela 2: Peso corporal, dos tecidos adiposos epididimal e perirenal e tecido hepático de ratos controle, HFD e HFD+SILDENAFIL.

Parâmetro	CT	HFD	HFD+SIL
Peso corporal (g)	418,4±13,2	472,7±11,5 ^a	485,9±20,5 ^a
Tecido adiposo epididimal (g/mm tibia)	0,184±0,01	0,252±0,03 ^a	0,258±0,03 ^a
Tecido adiposo perirenal (g/mm tibia)	0,198±0,03	0,375±0,06 ^a	0,461±0,07 ^a
Peso hepático (g/mm tibia)	0,305±0,02	0,309±0,003	0,325±0,02

Os dados são representados como média ± erro padrão. ANOVA uma via: a) p<0,05 vs CT.

Conforme ilustrado na **Figura 6**, o consumo de dieta hiperlipídica elevou a deposição lipídica total (**Figura 6A**) e de triglicerídeos (**Figura 6B**) nos grupos HFD e HFD+SIL. Além disso, observou-se um incremento significativo nos níveis de NEFA (**Figura 6D**) apenas no grupo HFD quando comparado ao CT, porém os níveis de colesterol total entre os grupos não diferiram significativamente (**Figura 6C**). Os parâmetros supracitados não foram alterados significativamente no grupo HFD+SIL em relação ao grupo HFD.

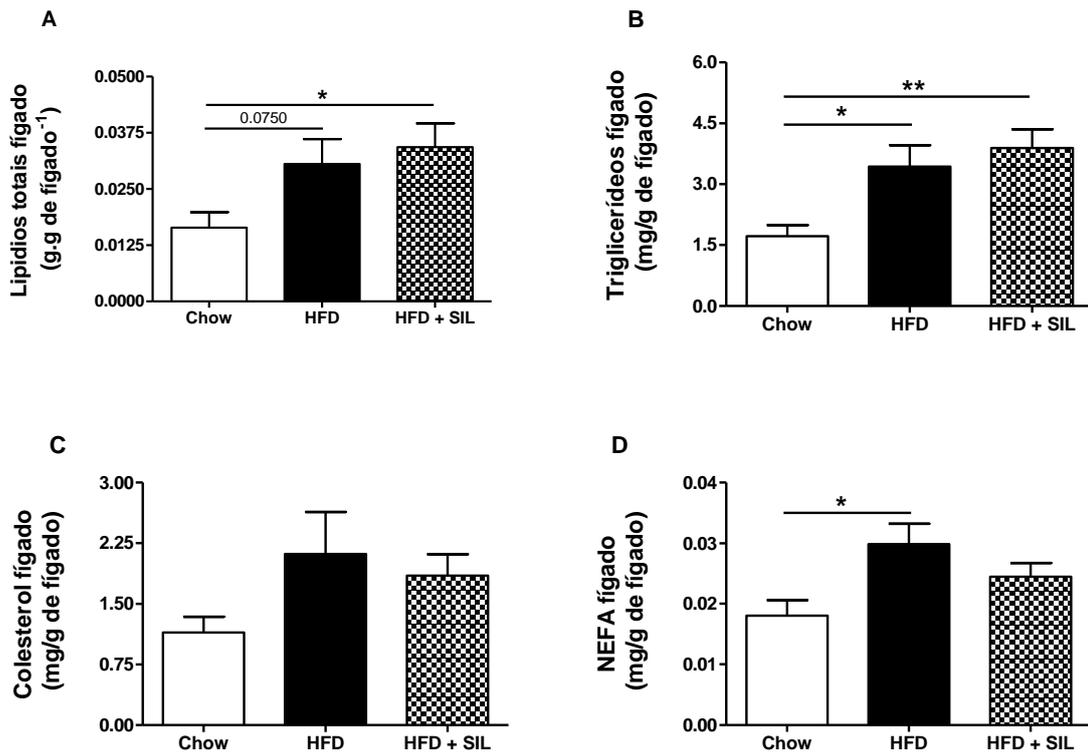


FIGURA 6. (A) Lipídios totais; **(B)** Triglicerídeos; **(C)** Colesterol; **(D)** NEFA: ácidos graxos não esterificados; n= 5-7 ratos *Wistar*/grupo. CT: grupo controle que recebeu dieta “Chow” (dieta padrão para roedor); HFD: grupo obeso que recebeu dieta hiperlipídica; HFD+SILD: grupo obeso que recebeu dieta hiperlipídica em concomitante intervenção com sildenafil. Os dados são representados como média \pm erro padrão. ANOVA uma via: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Em relação à análise histológica hepática, observou-se maior infiltração de macro e microvesículas lipídicas, além da presença de desarranjos na arquitetura dos hepatócitos no grupo HFD (**Figura 7B**) em relação ao grupo CT (**Figura 7A**), corroborando para o potencial efeito da dieta hiperlipídica e hipercalórica na indução da esteatose hepática. A intervenção farmacológica via oral com sildenafil em concomitante alimentação com dieta hiperlipídica favoreceu qualitativamente a redução da deposição de macrovesículas lipídicas (**Figura 7C**) e melhora do desarranjo na arquitetura dos hepatócitos, entretanto, microvesículas lipídicas ainda são observadas.

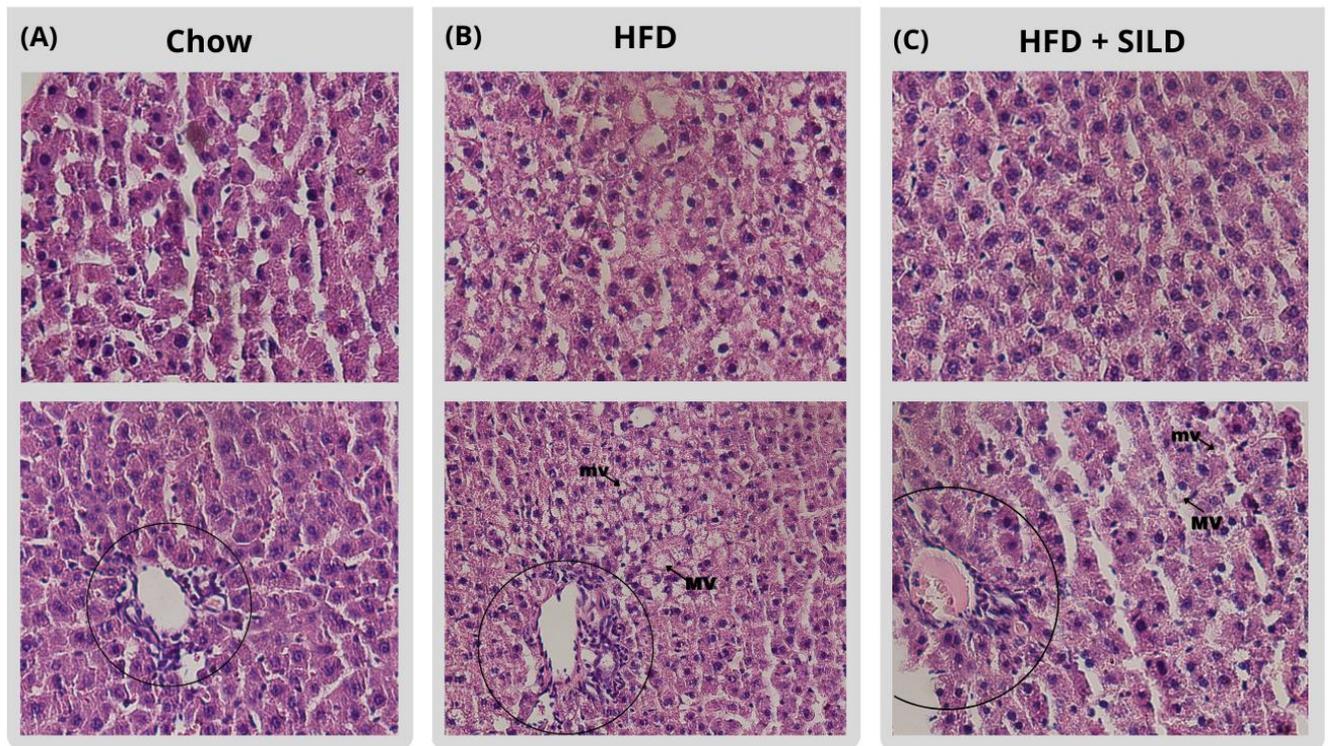


FIGURA 7. (A-C) Imagens representativas do tecido hepático corado com Hematoxilina e eosina (H&E), 150 hepatócitos por grupo, objetiva (20X). **MV**: macrovesículas lipídicas; **mv**: microvesículas lipídicas; **Círculo**: tríade portal (ducto biliar, veia porta e artéria hepática). CT: grupo controle que recebeu dieta “Chow” (dieta padrão para roedor); HFD: grupo obeso que recebeu dieta hiperlipídica; HFD+SILD: grupo obeso que recebeu dieta hiperlipídica em concomitante intervenção com sildenafil. Software “Fiji-ImageJ® image processing software”.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD (**Figura 8A**) e Catalase (**Figura 8B**), bem como a peroxidação lipídica (**Figura 8C**), no fígado não foram diferentes estatisticamente entre os grupos avaliados.

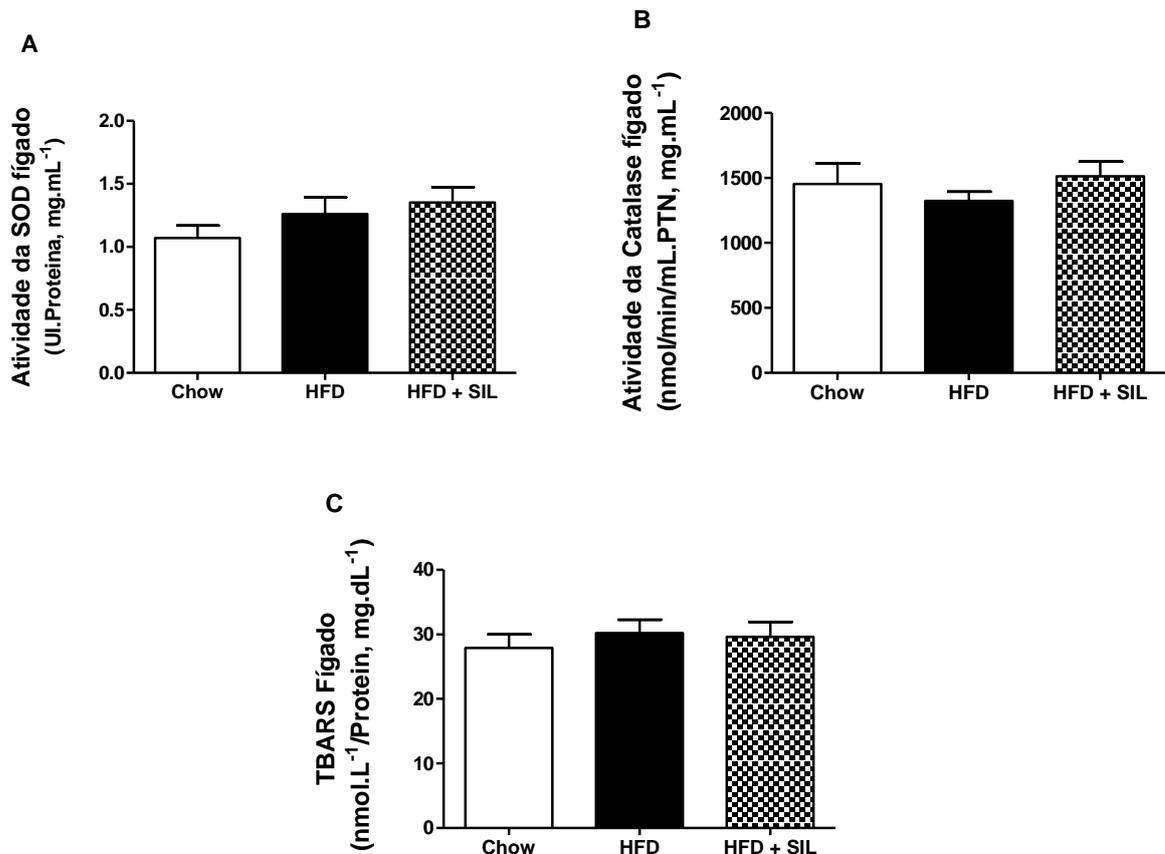


FIGURA 8. (A) Atividade da SOD: superóxido dismutase; **(B)** Atividade da Catalase; **(C)** Peroxidação lipídica, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; n= 5-7 ratos *Wistar*/grupo. CT: grupo controle que recebeu dieta “Chow” (dieta padrão para roedor); HFD: grupo obeso que recebeu dieta hiperlipídica; HFD+SILD: grupo obeso que recebeu dieta hiperlipídica em concomitante intervenção com sildenafil. Os dados são representados como média \pm erro padrão. ANOVA uma via.

Semelhante à atividade enzimática, a expressão gênica relativa da SOD1 (**Figura 9A**) e da Catalase (**Figura 9B**) não diferiram significativamente entre os grupos. Por outro lado, a expressão relativa do mRNA de CD36 no fígado (**Figura 9C**) se mostrou significativamente diminuída no grupo HFD+SILD quando comparado ao grupo obeso (HFD). De modo semelhante, a expressão relativa do mRNA de CD68 (**Figura 9D**) apresentou-se significativamente aumentada no grupo que recebeu a dieta HF quando comparado ao grupo controle e ao grupo obeso tratado com o sildenafil (HFD+SILD). Desse modo, o tratamento com o sildenafil promoveu uma diminuição na expressão gênica hepática do CD36 e CD68 em ratos obesos.

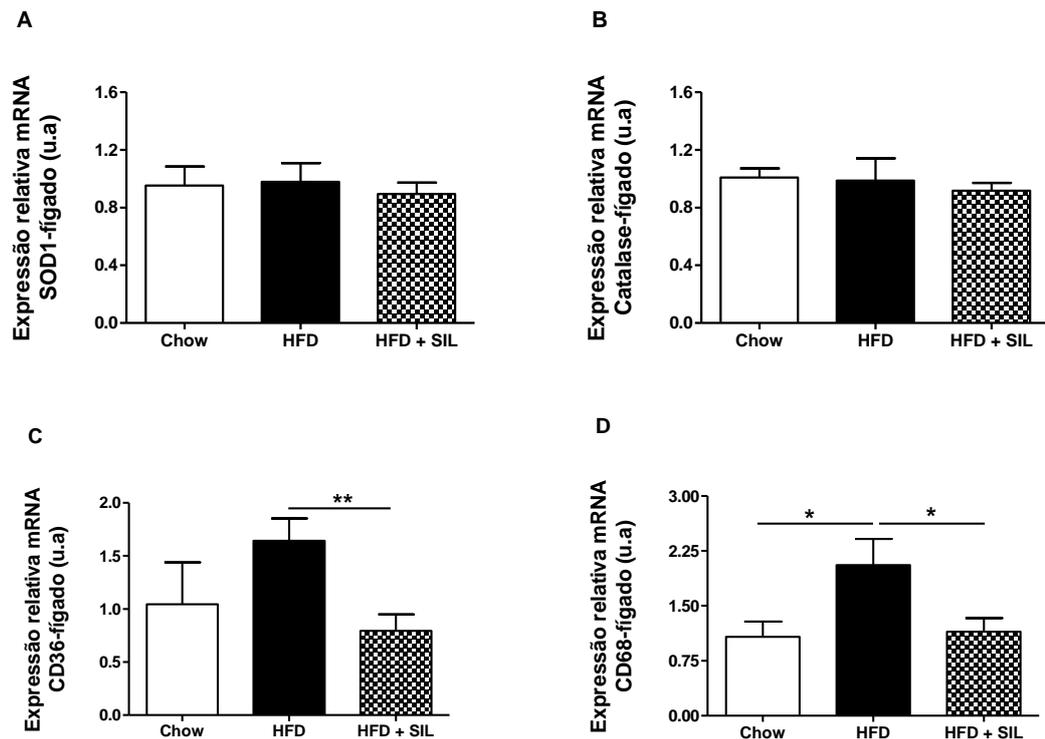


FIGURA 9. (A) Expressão relativa mRNA SOD1: gene 1 da superóxido dismutase; **(B)** Expressão relativa mRNA da Catalase; **(C)** Expressão relativa de mRNA para *Cluster of Differentiation 36* (CD36); **(D)** Expressão relativa de mRNA para *Cluster of Differentiation 68* (CD68) n= 5-7 ratos *Wistar*/grupo. CT: grupo controle que recebeu dieta “Chow” (dieta padrão para roedor); HFD: grupo obeso que recebeu dieta hiperlipídica; HFD+SILD: grupo obeso que recebeu dieta hiperlipídica em concomitante intervenção com sildenafil. Os dados são representados como média \pm erro padrão. ANOVA uma via: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou a indução dietética da obesidade e da DHGNA em ratos, bem como a melhora de um marcador da via lipídica e inflamatória hepática após a inibição da PDE5, sugerindo a participação de alterações na via NO/cGMP/PKG na progressão da DHGNA.

A ingestão de dieta com elevado teor de gordura por roedores mimetiza a ingestão hipercalórica e hiperlipídica humana com consequente desenvolvimento de obesidade e outras morbidades associadas, tais como a

resistência à insulina e a DHGNA (NUNES-SOUZA *et al.*, 2016). Nesse sentido, no presente estudo observou-se o aumento do peso corporal e da deposição de tecido adiposo epididimal e perirenal dos animais alimentados com dieta hiperlipídica, demonstrando, desta forma, a indução da obesidade nesses animais. Por outro lado, o grupo HFD que teve a PDE5 inibida com sildenafil ($45\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}/\text{dia}$) durante 8 semanas não apresentou diminuição do peso corporal e dos depósitos de tecidos adiposos brancos avaliados. Entretanto, estudos realizados por Ayala e colaboradores (2007) relataram uma diminuição do peso corporal dos ratos tratados com sildenafil ($12\text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}/\text{dia}$) duas vezes ao dia durante 12 semanas, sugerindo que o consumo de menores doses diárias e com tempo de tratamento mais crônico com o inibidor da PDE5 aparentemente favorece o balanço energético corporal.

Os ácidos graxos livres (AGL) são importantes para diversas funções celulares, entretanto, o aumento crônico dos AGL promove distúrbios metabólicos como a resistência à insulina sistêmica, a qual favorece a deposição hepática dos AGL, bem como a resistência à insulina hepática (BERLANGA *et al.*, 2014). Tendo em vista esse aspecto, o aumento dos AGL e triglicerídeos hepáticos sugerem que o estado de obesidade e resistência à insulina sistêmica induzida dieteticamente (dados de delineamentos anteriores do nosso grupo) contribuíram para a instalação de esteatose hepática, como demonstrado no estudo realizado por Nunes-Souza e colaboradores (2016). Entretanto, o grupo tratado com o inibidor da PDE5 não apresentou uma melhora quantitativa do perfil lipídico hepático, o qual, de modo semelhante, também não foi observado por Bruckbauer e colaboradores (2016), demonstrando que a deposição lipídica hepática, provavelmente, não envolve diretamente a participação da PDE5. Indiretamente, entretanto, a diminuição do mRNA para o CD36 hepático no grupo tratado com sildenafil sugere uma menor captação de ácidos graxos, uma vez que o aumento da regulação de CD36 no fígado está associado com a esteatose (MIQUILENA-COLINA *et al.*, 2011; SHEEDFAR *et al.*, 2014). Esse dado, provavelmente, contribuiu para a atenuação qualitativa da deposição de macrovesículas lipídicas e do desarranjo na arquitetura dos hepatócitos observado nesses animais, somado a provável maior disponibilidade de cGMP consequente a inibição da PDE5.

A via do NO/cGMP é importante para dilatação dos sinusóides hepáticos e consequente diminuição da resistência intra-hepática e da pressão portal, alterações presentes em quadros de cirrose hepática (IWAKIRI, 2015; KREISEL *et al.*,

2021; IWAKIRI & TREBICKA, 2021). Desta forma, inibidores da PDE5 podem apresentar um papel importante na atenuação da fibrose hepática, uma das alterações que caracterizam a progressão da DHGNA, por melhorarem essa sinalização via aumento da disponibilidade de cGMP. No entanto, a fibrose hepática ainda será avaliada nesses grupos.

O NO é sintetizado a partir da L-arginina, em uma reação catalisada por três isoformas diferentes da NO sintase (FARAH, MICHEL, BALLIGAND, 2018). Estudos prévios demonstraram que o NO, um potente vasodilatador via cGMP, participa em múltiplas funções antioxidantes e citoprotetoras (GLADWIN *et al.*, 2006). Tendo em vista esse aspecto, as funções que o NO exerce como mediador biológico depende estritamente da sua concentração. Sendo assim, baixas concentrações desencadeiam efeitos diretos nos processos de proliferação e sobrevivência celular, enquanto altas concentrações de NO estão associadas à inibição do crescimento celular e ao estresse oxidativo e nitrosativo (INFANTE; COSTA; NAPOLI, 2021).

A dieta hiperlipídica é um potente indutor do estresse oxidativo através de alterações no metabolismo do oxigênio (FARAH, MICHEL, BALLIGAND, 2018; YUVARAJ *et al.*, 2021). No desequilíbrio do sistema REDOX, as EROs são produzidas por diversas fontes, no fígado, por exemplo, a disfunção mitocondrial desempenha um papel fundamental na produção destas espécies e na fisiopatogenia da DHGNA, principalmente durante a β -oxidação de ácidos graxos mitocondriais em excesso (PARADIES *et al.*, 2014). O ânion superóxido é o principal agente oxidante, o qual é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da reação de dismutação catalisada pela SOD. O H_2O_2 logo é clivado pelas enzimas catalase e glutathione peroxidase, tendo como produto final H_2O e O_2 (BIRBEN *et al.*, 2012).

No presente trabalho a análise REDOX hepática, avaliada através da atividade enzimática e da expressão gênica relativa da SOD e catalase, sugere que o consumo de dieta hiperlipídica em longo prazo não modificou a capacidade antioxidante hepática dos ratos. Entretanto, não se descarta o possível aumento de espécies reativas, como foi observado semelhantemente por Speranza e colaboradores (2008), tendo em vista que o marcador TBARS para peroxidação lipídica é uma medida indireta. Somando-se a isso, dados do nosso grupo (ainda não publicados) indicam possivelmente um quadro de esteatohepatite induzida dieteticamente com possível participação da via inflamatória. No presente trabalho a elevada expressão gênica do CD68, marcador inflamatório para macrófagos (ALISI,

et al., 2017), sugere um processo inflamatório hepático, o qual foi diminuído após inibição da PDE5 com o sildenafil, demonstrando um papel importante e ainda pouco explorado de prejuízo na via de sinalização NO/cGMP no processo inflamatório e progressão da DHGNA. Nessa direção, Lutz e colaboradores (2011) demonstraram que a deleção genética da proteína cinase tipo I dependente de cGMP (cGKI) afeta o metabolismo hepático causando inflamação por infiltração aumentada de macrófagos e aumento da sinalização de IL-6, bem como prejuízo na ação da insulina, destacando o importante papel do NO/cGMP/cGKI no metabolismo hepático.

É importante frisar, embora não faça parte dos resultados deste trabalho, que em um estudo PIBIC-2021 ainda não publicado do nosso Grupo (SILVA L.B.H *et al.*, 2021) neste mesmo modelo animal observou-se a diminuição do tamanho dos adipócitos associado ao aumento de genes lipolíticos após tratamento com sildenafil. Além disso, ocorreu a diminuição de expressão gênica para um marcador da via inflamatória no tecido adiposo destes grupos tratados. Em conjunto, esses dados sugerem que o provável aumento da sinalização do cGMP no tecido adiposo promoveu uma expansão saudável deste, assim como observado por Mitschke e colaboradores (2013); melhorou o fenótipo metabólico de obesidade e o perfil inflamatório do tecido adiposo induzido por dieta hiperlipídica, tal como demonstraram Hoffmann e colaboradores (2015) e Handa e colaboradores (2011), respectivamente.

A melhora do perfil metabólico do tecido adiposo branco, após a inibição da PDE5 e provável aumento da disponibilidade de cGMP, pode ser explicado pelo efeito anti-hipertrófico do cGMP, via PKGI, por meio da inibição da via RhoA/ROCK como demonstrado por Mitschke e colaboradores (2013). Esse efeito extra-hepático possivelmente refletiu na atenuação da progressão da DHGNA associada à obesidade, tanto por diminuir a captação lipídica hepática, como também por modular aspectos do metabolismo lipídico e inflamatório em função do provável aumento da sinalização do cGMP *in locu*. Desta forma, estratégias terapêuticas que aumentem esta sinalização podem ser importantes na prevenção e/ou tratamento da obesidade e de doenças associadas a esta, como a DHGNA.

7 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados do presente trabalho demonstram que, em ratos, a inibição da PDE5 com o sildenafil parece melhorar o desarranjo na arquitetura dos hepatócitos e a deposição qualitativa de macrovesículas lipídicas induzidos dieteticamente, possivelmente por diminuir a captação lipídica e atenuar vias inflamatórias.

REFERÊNCIAS

AHMED, W. S.; GEETHAKUMARI, A. M.; BISWAS, K. H. Phosphodiesterase 5 (PDE5): Structure-function regulation and therapeutic applications of inhibitors. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 134, p. 111128, 2021.

ALBERTI, K. G. M. M. et al. Harmonizing the Metabolic Syndrome. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640–1645, 20 out. 2009.

ALISI, A. et al. The Role of Tissue Macrophage-Mediated Inflammation on NAFLD Pathogenesis and Its Clinical Implications. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 1–15, 2017.

ARAÚJO, A. R. et al. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. **Liver International**, v. 38, n. November 2017, p. 47–51, 2018.

AYALA, J. E. et al. Chronic Treatment With Sildenafil Improves Energy Balance and Insulin Action in High Fat-Fed Conscious Mice. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1025–1033, 1 abr. 2007.

AYDIN, S. et al. Today's and yesterday's of pathophysiology: biochemistry of metabolic syndrome and animal models. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 30, n. 1, p. 1–9, jan. 2014.

BELLIGOLI, A. et al. Characterization of subcutaneous and omental adipose tissue in patients with obesity and with different degrees of glucose impairment. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11333, 5 dez. 2019.

BERLANGA, A. et al. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. **Clinical and Experimental Gastroenterology Dove Medical Press Ltd**, 5 jul. 2014.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, maio 1976.

BRUCKBAUER, A. et al. A Combination of Leucine, Metformin, and Sildenafil Treats Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Steatohepatitis in Mice. **International Journal of Hepatology**, v. 2016, p. 1–16, 2016.

BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic fatty liver disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 15080, 17 dez. 2015.

BYRNE, C. D.; TARGHER, G. Ectopic Fat, Insulin Resistance, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 6, p. 1155–1161, jun. 2014.

CHEN, C. W. et al. Nitric Oxide Mobilizes Intracellular Zn²⁺ via the GC/cGMP/PKG Signaling Pathway and Stimulates Adipocyte Differentiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, 2022.

COLOMBO, G. et al. Phosphodiesterase 5 as target for adipose tissue disorders. **Nitric Oxide**, v. 35, p. 186–192, nov. 2013.

DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 1 jan. 2002.

DULAI, P. S. et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. **Hepatology**, v. 65, n. 5, p. 1557–1565, 2017.

DURANTE, W.; JOHNSON, F. K.; JOHNSON, R. A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 34, n.9, p. 906–911, set. 2007.

ENERBÄCK, S. Human Brown Adipose Tissue. **Cell Metabolism**, v. 11, n. 4, p. 248–252, 2010.

ENGIN, A. B.; ENGIN, A. **Obesity and Lipotoxicity**. v. 960, 2017.

FARAH, C.; MICHEL, L. Y. M.; BALLIGAND, J.-L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 5, p. 292–316, 2018.

FONSECA, L. J. S. Da et al. Oxidative Status Imbalance in Patients with Metabolic Syndrome: Role of the Myeloperoxidase/Hydrogen Peroxide Axis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–14, 2014.

FRANCO, L. P.; MORAIS, C. C.; COMINETTI, C. Normal-weight obesity syndrome: diagnosis, prevalence, and clinical implications. **Nutrition Reviews**, v. 74, n. 9, p. 558–570, set. 2016.

GHABEN ,A. L. ; SCHERE, P. E. Adipogenesis and metabolic health. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2019.

Giuseppe Paradies, Valeria Paradies, Francesca M Ruggiero, Giuseppe Petrosillo. **World J Gastroenterol**, 2014.

GLADWIN, M. T. et al. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. **American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 5, p. H2026–H2035, nov. 2006.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017.

GORDON, C. J. et al. Active vs. sedentary lifestyle from weaning to adulthood and susceptibility to ozone in rats. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 1, p. L100–L109, 1 jan. 2017.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593–604, 2010.

GRUZDEVA, O. et al. Localization of fat depots and cardiovascular risk. **Lipids Health Dis**, v. 17, p. 218, 2018.

HANDA, P. et al. Reduced Vascular Nitric Oxide–cGMP Signaling Contributes to Adipose Tissue Inflammation During High-Fat Feeding. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 12, p. 2827–2835, dez. 2011.

HASHIMOTO, E.; TOKUSHIGE, K.; LUDWIG, J. Diagnosis and classification of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Current concepts and remaining challenges. **Hepatology Research**, v. 45, n. 1, p. 20–28, jan. 2015.

HOFFMANN, L. S. et al. Stimulation of soluble guanylyl cyclase protects against obesity by recruiting brown adipose tissue. **Nature Communications**, v. 6, n. May, p. 1–9, 2015.

INFANTE, T.; COSTA, D.; NAPOLI, C. Novel Insights Regarding Nitric Oxide and Cardiovascular Diseases. **Angiology**, v. 72, n. 5, p. 411–425, 2021.

IWAKIRI, Y.; Trebicka, J. Portal hypertension in cirrhosis: Pathophysiological mechanisms and therapy. **JHEP Rep.** 2021.

IWAKIRI, Y. Nitric oxide in liver fibrosis: The role of inducible nitric oxide synthase. **Clin. Mol. Hepatol**, 2015.

JOHNSON, F. K. et al. Arginase promotes endothelial dysfunction and hypertension in obese rats. **Obesity**, v. 23, n. 2, p. 383–390, 2015.

JULIBERT, A. et al. Total and Subtypes of Dietary Fat Intake and Its Association with Components of the Metabolic Syndrome in a Mediterranean Population at High Cardiovascular Risk. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1493, 29 jun. 2019.

K. J. Livak and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.

KREISEL, W. et al. Phosphodiesterases in the liver as potential therapeutic targets of cirrhotic portal hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–28, 2020.

LUO L, LIU M. Adipose tissue in control of metabolism. **J Endocrinol**. 2016.

LUTZ, S. Z. et al. Genetic ablation of cGMP-dependent protein kinase type I causes

liver inflammation and fasting hyperglycemia. **Diabetes**, v. 60, n. 5, p. 1566–1576, 2011.

M. E. MIQUILENA-COLINA, E. Lima-Cabello, S. Sanchez-Campos et al. Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. **Gut**, vol. 60, no. 10, pp. 1394–1402, 2011.

F. SHEEDFAR, M. M. Y. Sung, M. Aparicio-Vergara et al. Increased hepatic CD36 expression with age is associated with enhanced susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. **Aging**, vol. 6, no. 4, pp. 281–295, 2014.

MITSCHKE, M. M. et al. Increased cGMP promotes healthy expansion and browning of white adipose tissue. **FASEB Journal**, v. 27, n. 4, p. 1621–1630, 2013.

MORENO-FERNÁNDEZ, S. et al. High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. **Nutrients**, v. 10, n. 10, out. 2018.

NUNES-SOUZA, V. et al. CD36/Sirtuin 1 Axis Impairment Contributes to Hepatic Steatosis in ACE2-Deficient Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–11, 2016.

OUCHI N, PARKER JL, LUGUS JJ, WALSH K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, 2011.

Hammarstedt A, Gogg S, Hedjazifar S, Nerstedt A, Smith U. Impaired Adipogenesis and Dysfunctional Adipose Tissue in Human Hypertrophic Obesity. **Physiol Rev**. 2018.

PARADIES, G. et al. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology**, v. 20, n. 39, p. 14205–14218, out. 2014.

PETROVIC, N. et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocy. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7153–7164, mar. 2010.

POWELL-WILEY, T. M. et al. Obesity and Cardiovascular Disease A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 143, n. 21, p. E984–E1010, 2021.

RUIZ-CANELA, M. et al. Dietary inflammatory index and anthropometric measures of obesity in a population sample at high cardiovascular risk from the PREDIMED (Prevención Con Dieta Mediterránea) trial. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. 6, p. 984–995, 28 mar. 2015.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Berlin, Heidelberg: Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 715–748, 20 jun. 2017.

SILVA, L.B.H. et al. Avaliação das alterações sistêmicas e no tecido adiposo branco de ratos obesos induzido por dieta “high fat” após inibição da fosfodiesterase 5. **PIBIC-UFPE**, 2021.

SJÖSTRÖM, L. et al. Lifestyle, Diabetes, and Cardiovascular Risk Factors 10 Years after Bariatric Surgery. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 26, p. 2683–2693, 23 dez. 2004.

SPEED, M. S. et al. Investigating the association between body fat and depression via Mendelian randomization. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 184, 5 dez. 2019.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836–1846, nov. 2010.

TULSIAN, N. K. et al. Development of phosphodiesterase–protein-kinase complexes as novel targets for discovery of inhibitors with enhanced specificity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 10, 2021.

UNAMUNO, X. et al. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. **Eur J Clin Invest**, v 48, p. 12997, 2018.

WALKER, D. K. et al. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man, **Xenobiotica**, v. 29, n.3, p 297–310,1999.

WALLIN, B. et al. Lipoprotein Oxidation and Measurement of Thiobarbituric Acid Reacting Substances Formation in a Single Microtiter Plate: Its Use for Evaluation of Antioxidants. **Analytical Biochemistry**, v. 208, n. 1, p. 10–15, jan. 1993.

WANG, J. et al. Ginger prevents obesity through regulation of energy metabolism and activation of browning in high-fat diet-induced obese mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 70, n. 17, p. 105–115, ago. 2019.

WHO. Obesity and Overweight factsheet from the World Health Organization. **WHO Fact Sheet**, 2018.

WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organization technical report series**, v. 894, p. i–xii, 1–253, 2000.

WOLIN, M. S. Reactive oxygen species and the control of vascular function. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, n. 3, p. H539–H549, 2009.

WOOLF, A. D.; PFLEGER, B. Burden of major musculoskeletal conditions. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, n. 9, p. 646–656, 2003.

World Health Organization. Obesity and overweight. **WHO** <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (2021).

XU, P. et al. Endothelial Dysfunction and Elevated Blood Pressure in Mas Gene-Deleted Mice. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 574–580, fev. 2008.

YANOVSKI, J. A. Obesity: Trends in underweight and obesity - scale of the problem. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 5–6, jan. 2018.

YUVARAJ, S. et al. Chrysin attenuates high-fat-diet-induced myocardial oxidative stress via upregulating eNOS and Nrf2 target genes in rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 476, n.7, p. 2719–2727, 2021.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fone: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 10 de setembro de 2020

Ofício nº 49/20

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: Prof. Valéria Nunes de Souza

Departamento de Fisiologia e Farmacologia/CB

processo nº0039/2020

Certificamos que a proposta intitulada "Alterações metabólicas e cardiovasculares em ratos obesos induzido por dieta "high fat": papel da fosfodiesterase 5", registrado com o nº0039/2020 sob a responsabilidade da Prof. Valéria Nunes de Souza que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/08/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	agosto de 2020 A agosto de 2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus albinus</i> , linhagem Wistar
Nº de animais	64
Peso/Idade	250 - 300 g / 8 semanas
Sexo	Machos (64)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CB, UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CB, UFPE

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
 -Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691