

William Marinelli de Carvalho

Efeito do Roflumilaste no parênquima pulmonar distal de camundongos
obesos

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elnara Márcia Negri

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo
2022

William Marinelli de Carvalho

Efeito do Roflumilaste no parênquima pulmonar distal de camundongos
obesos

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elnara Márcia Negri

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, William Marinelli de
Efeito do roflumilaste no parênquima pulmonar
distal de camundongos obesos / William Marinelli de
Carvalho. -- São Paulo, 2022.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Elnara Márcia Negri.

Descritores: 1.Mediador inflamatório
2.Remodelamento 3.Inibidores da fosfodiesterase 4
4.Obesidade 5.Pulmão 6.Coração 7.Camundongos

USP/FM/DBD-347/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Roflumilaste e seu efeito protetor nos pulmões.....	7
1.2. Obesidade e Saúde.....	9
1.3. Síndrome metabólica e hipertensão pulmonar (HP).....	11
1.4. Endotelina e Pulmão.....	12
1.5. VCAM – Moléculas de Adesão de Células Vasculares	14
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo Geral	15
3. MATERIAL E MÉTODO	15
3.1. Modelo experimental	15
3.2. Desenho experimental	16
3.3. Obtenção de Roflumilaste e preparo para administração	16
3.4. Protocolo de pesagem e administração do medicamento	17
3.5. Coleta de material para análises por microscopia de luz	17
3.6. Histologia	18
3.6.1 Métodos de coloração	18
3.7. Imuno-histoquímica	19
3.8. Análises quantitativas em microscopia de luz – Morfometria	20
3.8.1. Obtenção das imagens digitais	20
3.9. Análise Estatística	21
4. RESULTADOS	21
4.1. Análise do Material Obtido	21
4.1.1. Análise morfológica qualitativa	21
4.1.2. Análise quantitativa dos pesos dos animais	23
4.1.3. Análise morfológica quantitativa	25
4.1.4. Análise quantitativa do remodelamento cardíaco	25
4.1.5. Análise quantitativa- marcações imuno-histoquímicas (VCAM/Endotelina)	27
4.1.5.1. VIAS AÉREAS – Análise imuno-histoquímica do VCAM	27
4.1.5.2. VIAS AÉREAS – Análise imuno-histoquímica da Endotelina	29
4.1.5.3. VASOS – Análises imuno-histoquímica do VCAM nas arteríolas	31
4.1.5.4. VASOS – Análises imuno-histoquímica de Endotelina nas arteríolas	33
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

Apêndice

RESUMO

Carvalho WM. Efeito do Roflumilaste no parênquima pulmonar distal de camundongos obesos [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A obesidade é uma doença que tem se tornado epidêmica. Na obesidade associada à síndrome metabólica, observa-se disfunção mitocondrial e aumento da resistência periférica à insulina, além de maior ação das adipocinas que estimulam o perfil inflamatório do organismo, agravando doenças cardiovasculares. O Roflumilaste – é um anti-inflamatório não esteroide, inibidor altamente seletivo da fosfodiesterase-4 (PDE4), que atua na inflamação pulmonar e sistêmica. Tendo em vista que a circulação pulmonar é um alvo importante nestes mecanismos de lesão e que o Roflumilaste demonstrou poder de proteção contra a instalação de lesões pulmonares em ratos expostos à inflamação provocada pelo tabagismo, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência do tratamento com Roflumilaste em camundongos ob/ob, predispostos geneticamente à Síndrome metabólica, na resposta inflamatória no parênquima pulmonar distal bem como suas possíveis repercussões na circulação pulmonar. Para o estudo foram analisados camundongos ob/ob, divididos em dois grupos experimentais: PSI: animais submetidos ao tratamento com Roflumilaste (PSI, n=6) e NT: animais que não receberam o tratamento (NT, n=6). Durante o período experimental, os animais foram pesados diariamente, sendo observado aumento de peso no grupo não tratado e estabilidade no peso no grupo tratado. Amostras do coração e pulmão de cada animal experimental, foram processadas e analisados por microscopia de luz para estudos morfológicos e imuno-histoquímicas para Endotelina e VCAM-1. Os dados obtidos nas análises do coração demonstraram que há diferença na porcentagem de área do coração total ($p=0,017$) e do ventrículo direito ($p=0,045$) entre os grupos experimentais, sendo a área cardíaca total e a área de ventrículo direito maiores no grupo não tratado (NT). Não houve diferença para a marcação pelo anticorpo VCAM em vias aéreas pequenas ou nos vasos do parênquima pulmonar distal. Nos vasos do parênquima distal observou-se maior marcação para endotelina no grupo não tratado (NT) ($p=0,032$). Concluímos que o roflumilaste foi capaz de inibir a expressão de endotelina nos vasos do parênquima pulmonar distal em um modelo animal de síndrome metabólica. Tal ação teve repercussão direta no remodelamento cardíaco com especial impacto ventrículo direito. Tal achado auxilia no entendimento da ação deste medicamento na prática clínica.

Descritores: Mediador inflamatório. Remodelamento. Inibidores de fosfodiesterase 4. Obesidade. Pulmão. Coração. Camundongos.

ABSTRACT

Carvalho WM. Effect of roflumilaste on the distal lung parenchyma of obese mice. [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Obesity is increasing all over the world. Adipokines interfere in the organism's inflammatory profile, aggravating cardiovascular diseases and stimulating the instalment of metabolic syndrome. Roflumilaste is a nonsteroidal anti-inflammatory, highly selective inhibitor of phosphodiesterase 4 (PED4), that acts at the systemic and pulmonary inflammation. Given that pulmonary circulation is an important target in metabolic syndrome injury mechanisms and that Roflumilast has demonstrated protective effect against pulmonary inflammation, this paper's objective is to address the influence of Roflumilast treatment on the distal lung parenchyma in ob/ob mice, genetically predisposed to Metabolic Syndrome. For this study, ob/ob mice were divided into two experimental groups: PSI: animals subjected to roflumilast treatment (PSI, n=6) and NT animals that didn't receive treatment (NT, n=6). During the experimental period, the animals were weighted daily and it was observed a weight increase at the non-treated group while the treated group remained stable. Heart and lung samples of each experimental animal, were processed and analyzed by light microscopy for morphological and immunohistochemical studies for Endothelin and VCAM-1. Data obtained from the heart analysis show a difference in the total heart area percentage ($p=0,017$) and right ventricle ($p=0,045$) between experimental groups, being that total heart and right ventricle areas are larger at the non-treated group (NT). There was no difference in VCAM expression in the airways or in the arterioles of distal lung parenchyma between groups. At the distal parenchyma vessels, it was observed a higher level of expression for endothelin in the non-treated group (NT)($p=0,032$). We concluded that roflumilast was capable of positively interfering on cardiac remodeling and distal pulmonary arterioles endothelin expression in an animal model of metabolic syndrome. These findings help better understanding roflumilast effects at clinical scenery.

Descriptors: Inflammatory mediator. Remodeling. Phosphodiesterase 4 inhibitors. Obesity Lung. Heart. Mice.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Roflumilaste e seu efeito protetor nos pulmões

DAXAS® – Roflumilaste – é um anti-inflamatório não esteroide, inibidor altamente seletivo da fosfodiesterase-4 (PDE4), que atua na inflamação pulmonar e sistêmica que se instala nos pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), melhorando a função pulmonar e reduzindo as exacerbações da DPOC. O mecanismo de ação é a inibição da PDE4, uma enzima primordial metabolizadora de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) encontrada em células estruturais e inflamatórias importantes para a patogênese da DPOC. O Roflumilaste tem como alvo as variantes PDE4A, 4B e 4D, com potência similar em ordem nanomolar. A afinidade para a variante PDE4C é 5 a 10 vezes mais baixa. Apresenta, ainda, preferência pela PDE4L e mínima atividade inibitória da PDE4H, o que se traduz em minimizar os efeitos adversos gastrintestinais¹.

Seu mecanismo de ação consiste em inibir a fosfodiesterase 4, uma proteína presente nas células, responsável pela promoção da resposta inflamatória. Quando esta proteína é inibida, a inflamação nos pulmões diminui, ajudando a atenuar a bronquite crônica e a instalação do enfisema ². É um medicamento anti-inflamatório ministrado por via oral, usado para tratamento de manutenção para pacientes que sofrem de bronquite crônica, em complementação ao tratamento com broncodiladores e corticosteroides. Os comprimidos de Roflumilaste contem 500 mcg cada um, são tomados por via oral uma vez por dia.

Reações adversas podem ocorrer durante as primeiras semanas de uso, sendo as mais comuns: diarreia, náusea, dor abdominal e cefaleia. O Roflumilaste não é recomendado para pacientes com doenças imunológicas graves, doenças infecciosas graves, pacientes com câncer em atividade e com insuficiência cardíaca.

O Roflumilaste também não é recomendado para pacientes com histórico de depressão associado a tendências suicidas. Como este medicamento possui lactose deve ser ministrado com cautela em pessoas que sofrem de intolerância, além disso, não pode ser usado em crianças ou adolescentes abaixo de 18 anos. Mulheres grávidas ou que estiverem amamentando também não devem tomar o medicamento.

Como o Roflumilaste possui ação anti-inflamatória e é usado para tratamento da DPOC, alguns estudos foram realizados em ratos expostos à fumaça do cigarro para avaliar seus efeitos. O Roflumilaste conseguiu reduzir o número de neutrófilos, macrófagos, linfócitos B, linfócitos T CD4 e CD 8, propiciando uma melhora nos sintomas respiratórios associados à DPOC e impedindo a instalação do enfisema ³.

O Roflumilaste e seu metabólito primário, Roflumilaste N-óxido (Figura 1), são potentes drogas anti-inflamatórias conhecidas pelo efeito inibitório (por competição) sobre a fosfodiesterase 4 (do inglês, phosphodiesterase-4 [PDE4]), família de enzimas que possui cerca de 50 variantes identificadas no corpo humano e que são sintetizadas por quatro genes: PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D ¹.



Figura 1 – Estrutura química do Roflumilaste e seu metabólito oxidado ¹.

As enzimas pertencentes à família da fosfodiesterase 4 possuem ação específica sobre o mensageiro secundário de adenosina monofosfato cíclico (do inglês, *cyclic adenosine monophosphate* [cAMP]), promovendo sua hidrólise e modulando sua expressão no cérebro, rim, fígado, coração, músculo liso, pulmão, células endoteliais e células do sistema imunológico.

Drogas como o Roflumilaste, por inibirem a ação da PDE4, mantém a atividade do cAMP, diminuindo a síntese de citosinas pró-inflamatórias, resultando em atividade anti-inflamatória e aumento do metabolismo basal ¹.

Entre as principais aplicações clínicas, o Roflumilaste tem sido utilizado para o tratamento de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Além disso, já foi reconhecido como indutor de aumento do metabolismo da glicose e aumento do gasto energético, reduzindo a resistência periférica a insulina ⁴.

A atividade do cAMP nos adipócitos do tecido adiposo marrom (do inglês, brown adipose tissue [BAT]) resulta em lipólise de triglicérides armazenados no meio

intracelular, provendo ácidos graxos livres (do inglês, free fatty acids [FFAs]), que servem como combustível para a cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias. Adicionalmente, longas cadeias de FFA aumentam a condutância de prótons pelo UCP1 (do inglês, uncoupling protein-1) para a membrana mitocondrial interna, aumentando a regeneração de ATP, bem como o consumo energético para a produção destas moléculas ^{4; 5}.

O BAT é considerado um sítio chave para a produção de calor, estando diretamente relacionado aos mecanismos biológicos de termogênese. O aumento de BAT está diretamente associado com a redução do peso corpóreo, uma vez que os adipócitos existentes neste tecido são ricos em mitocôndrias com ampla expressão de UCP1, que, quando ativadas, encurtam os circuitos de gradientes eletroquímicos que conduzem à síntese de ATP e estimulam a atividade de cadeia respiratória ^{6 5}.

Assim sendo, é possível que o aumento do consumo energético (metabolismo basal) originado pela ação do Roflumilaste, mediado pela ativação da via cAMP e consequente ativação de UCP1, resulte em perda de peso corpóreo.

Além disto, já foi descrito que o Roflumilaste melhora a infecção pulmonar aguda e crônica, bem como previne a destruição do parênquima induzida pelo cigarro em indivíduos fumantes ^{3; 7}.

Estudos mostram que o roflumilaste protege a apoptose induzida por NO através da via dependente de cAMP-PKA/CREB e Epac/Akt e sugerem a possibilidade do inibidor de PDE4 Roflumilaste como um potencial agente terapêutico contra a lesão de isquemia/reperfusão miocárdica (I/R) ⁸.

1.2. Obesidade e Saúde

A obesidade é uma doença que têm ganhado muita atenção nos últimos anos por ter se tornado epidêmica em muitas regiões do globo. O excesso de tecido adiposo branco secreta proteínas chamadas de adipocinas, o que aumenta o status inflamatório do organismo ⁹.

Obesidade pode levar a inflamação e destruição tecidual, agravando doenças cardiovasculares e estimulando a instalação da síndrome metabólica, provocando

problemas não só nos pulmões e no coração, mas também em outros órgãos vitais, como o fígado e o rim ^{10; 11; 12}.

Há mais de três décadas, a prevalência da obesidade é estudada em todo o mundo. Pessoas obesas podem sofrer com complicações respiratórias, como a asma, hiper responsividade da via aérea, DPOC e fibrose pulmonar ^{13; 14; 15}.

A influência da obesidade no pulmão é multifatorial, relacionada a injúria mecânica e produção de mediadores inflamatórios, como por exemplo citocinas, quimiocinas e adipocinas, tanto localmente como no sistema circulatório, e, assim, tornando o organismo mais susceptível a doenças respiratórias. A literatura mostra achados para a associação da fibrose pulmonar e obesidade em que os mediadores inflamatórios apresentam um papel importante. Mediadores inflamatórios induzidos por dieta rica em gordura (TNF- α , MCP-1 e TGF- β) de tecidos adiposos, envolvendo adipócitos e macrófagos, são importantes para o desenvolvimento da fibrose pulmonar ^{15; 16}.

A obesidade contribui para fibrose em diferentes órgãos, pulmão, fígado, coração, rim, incluindo o próprio tecido adiposo ^{17; 18}. A fibrose é progressiva, provocando remodelamento tecidual e levando ao mal funcionamento do órgão e de sua função.

A inflamação crônica é considerada importante na patogênese da fibrose pulmonar por meio da regulação da produção de citocinas e quimiocinas (Fator de Necrose Tumoral alfa -TNF- α , Interleucinas -ILs e Proteína Quimioatrativa de Monócitos-1 -MCP-1); de fatores de crescimento (Fator de Crescimento Transformador beta -TGF- β , Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas), de macrófagos e modulação da matriz (via MMP-2), vasculatura, receptor do fator de crescimento e do estresse oxidativo ^{19; 20; 21}.

As interleucinas são um tipo de citocinas cruciais para modular a resposta inflamatória e as funções imunológicas derivadas de vários tipos de células, incluindo macrófagos, linfócitos, mastócitos, fibroblastos e células epiteliais ²². Na obesidade, tanto os adipócitos quanto as células inflamatórias infiltradas liberam interleucinas no tecido adiposo e na corrente sanguínea ^{23; 24}. A interleucina-26 está associada ao nível de inflamação sistêmica e funções pulmonares em pacientes com asma moderada a

grave obesos e não obesos ²⁵. Existe um papel potencial das interleucinas no desenvolvimento da fibrose pulmonar idiopática associada à obesidade ¹⁵.

O aumento de citocinas inflamatórias e de linfócitos T leva ao desenvolvimento de inflamação vascular, lesão endotelial e aumento de citocinas anti-angiogênicas, de modo a estabelecer um quadro de disfunção endotelial. Como consequência, surgem fenômenos de descontrole da pressão arterial, mecanismos trombogênicos e aterogênicos que levam à disfunção cardiovascular com acentuada mortalidade, como a síndrome coronariana aguda ^{26; 27; 28}.

O estresse oxidativo resulta em peroxidação lipídica das membranas celulares (com morte celular), depleção de antioxidantes e ativação da sinalização pró-inflamatória, desencadeando uma cascata de eventos biológicos que afetam órgãos à distância, inclusive, causando distúrbios metabólicos da homeostase da glicose e insulina: a entrada da glicose nas células é dificultada e se acumula no sangue, caracterizando um quadro de diabetes mellitus. Além disso, alteram a concentração de lipídeos no sangue, propiciando o desenvolvimento de síndrome metabólica e obesidade ^{6; 29}.

Devido à adesão crescente ao estilo de vida sedentário e ao consumo excessivo de calorias, potencializado pela “neocultura do fast-food”, uma epidemia de obesidade está ameaçando a saúde pública em nível global ⁸. A poluição atmosférica agrava a situação adversa para indivíduos obesos ou geneticamente pré-dispostos à obesidade, uma vez que estes são mais suscetíveis aos efeitos inflamatórios dos poluentes atmosféricos, com piora metabólica geral, bem como do quadro de obesidade e outras comorbidades cardiovasculares de elevada mortalidade ³⁰.

1.3. Síndrome metabólica e hipertensão pulmonar (HP)

A Síndrome metabólica é definida como aumento da circunferência abdominal associada a dislipidemia com aumento de triglicérides circulantes e redução da fração HDL do colesterol, hipertensão arterial sistêmica e aumento da resistência periférica à insulina, levando à hiperglicemia³¹. As consequências destas condições orgânicas para a circulação sistêmica já foram bastante estudadas, no entanto, a repercussão da síndrome metabólica na circulação pulmonar ainda permanece pouco conhecida.

Zamanian e colaboradores (2009)³² demonstraram maior incidência de diabetes mellitus em pacientes portadores de hipertensão pulmonar quando comparados a uma população com os mesmos fatores de risco, mas sem HP e desde então vários estudos têm tentado elucidar este tema³³. Aparentemente, o maior fator que associa a HP à síndrome metabólica é a hiperglicemia e os mecanismos de resistência à ação da insulina nos tecidos. Níveis elevados de glicose sanguínea mantidos cronicamente são altamente lesivos ao endotélio e nutrem um ambiente inflamatório sistêmico permanente. A função mitocondrial e o metabolismo do AMPc estão intrinsecamente envolvidos neste quadro³⁴.

A quantidade de tecido adiposo corpórea parece também ser importante. Adipocinas, que são citocinas secretadas pelas células adiposas, tem sido também envolvida no desenvolvimento da HP. As mais estudadas são a adiponectina e a leptina e ambas podem modular o desenvolvimento de HP, estimulando mecanismos de stress oxidativo e lesão endotelial³⁵.

A disfunção do ventrículo direito que se desenvolve em alguns casos de HP é indicativa de maior mortalidade. Estudos das evidências da influência da Síndrome metabólica sobre o endotélio pulmonar também corroboram com efeitos sobre o miocárdio do ventrículo direito. Tais estudos mostram alterações no metabolismo de lipídeos e glicose nos cardiomiócitos, culminando com disfunção celular e aumento de inflamação e apoptose³⁶.

1.4. Endotelina e pulmão

O endotélio exerce funções anticoagulante, vasodilatadora e anti-inflamatória que são essenciais para a manutenção da homeostasia. O endotélio normal tem função protetora contra o desenvolvimento de lesões vasculares mantendo a vasodilatação, inibindo a agregação plaquetária, a adesão leucocitária e a proliferação das células musculares lisas. Essas ações são exercidas principalmente pelo óxido nítrico, considerado o mais importante fator endotelial, ou EDRF (*Endothelial-Derived Relaxing Factor*), ao lado da prostaciclina e do fator hiperpolarizante derivado do endotélio. O endotélio pode também gerar fatores contráteis como as endotelinas, a angiotensina II, as prostaglandinas vasoconstritoras e espécies reativas de oxigênio.

O endotélio não apenas controla o tráfego de pequenas e grandes moléculas, e mesmo células inteiras, também mantém a estrutura da parede vascular.

Endotelinas (ETs) são peptídeos de 21 aminoácidos produzidos por vários tecidos. Foram inicialmente descritas por Hickey et al. que demonstraram a presença de uma substância vasoconstritora no sobrenadante de células endoteliais em cultura ³⁷ e, a seguir, caracterizadas por Yanagisawa et al. ³⁸. Três diferentes isoformas de ETs estão identificadas, ET-1, ET-2, ET-3, e vários são os estímulos que aumentam os níveis de RNAm do pré-própeptídeo ET-1 pelas células endoteliais: trombina, adrenalina, Ang II, bradicinina, hipóxia, lipoproteínas de alta e baixa densidade, insulina, isquemia, tensão de cisalhamento e fatores de crescimento ³⁹.

Goldie, RG, demonstrou que as proporções do subtipo de ligação diferem nos tecidos. Por exemplo, no músculo liso brônquico periférico porcino, os sítios ETA aparentemente predominam, enquanto os sítios ETB constituem o principal subtipo detectado na parede alveolar nesta espécie. Esses dados sugerem mudanças significativas na expressão do subtipo do receptor ET em diferentes níveis no trato respiratório⁴⁰.

A ET-1 é considerada um mitógeno fraco em vários tipos celulares, mas é um potente agente indutor de crescimento/mitogênese em condições específicas ou em associação com fatores de crescimento ⁴¹. ET-1 estimula a transição da fase G0 para G1 no ciclo celular, aumentando a síntese de DNA. Entre os mecanismos intracelulares ativados pela ET-1 podemos citar a estimulação de várias quinases, incluindo a quinase S6 que fosforila uma das subunidades ribossomais; a proteína tirosina quinase pp60c-src, e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). A ET-1 também influencia a deposição de matriz extracelular por estimular a síntese de colágeno, por diminuir a atividade de colagenases e metaloproteinases e por regular a migração e adesão celular através da indução de moléculas de adesão ⁴².

A endotelina-1 é um peptídeo com atividade biológica diversa que tem sido implicado em inúmeras doenças. A ET-1 é um potente mitógeno regulador do tônus do músculo liso e mediador inflamatório que pode desempenhar um papel fundamental em doenças das vias aéreas, circulação pulmonar e doenças inflamatórias pulmonares, tanto agudas quanto crônicas⁴³.

1.5. VCAM - Moléculas de Adesão de Células Vasculares

VCAM-1 é uma glicoproteína transmembrana KD-90 expressa pelas células endoteliais ativadas, células musculares lisas da parede vascular e algumas células dendríticas. Também pode ser expressa em células do endotélio vascular em resposta ao fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ou citocinas ⁴⁴.

A expressão da forma solúvel de VCAM-1 (sVCAM-1) é induzida por citocinas pró-inflamatórias no endotélio dos vasos sanguíneos para o recrutamento, adesão e transmigração de monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos ^{45; 46}. A inflamação é a resposta protetora do sistema imunológico. Sangue, vasos e mediadores como quimiocinas e moléculas de adesão são implicados na eliminação da ameaça externa e na prevenção de lesões.

Uma vez que o VCAM-1 é expresso na superfície da célula endotelial, ele interage com integrina $\alpha 1\beta 4$ presente na superfície dos leucócitos circulantes, permitindo seu aprisionamento, rolamento e ativação de sinalização. Isso leva à ruptura das junções das células endoteliais e da actina. remodelação, facilitando a transmigração de leucócitos da circulação para as zonas de lesão⁴⁷.

Estudos demonstram que VCAM-1, pode ser um biomarcador de doenças cardiovasculares, é uma molécula de adesão que é regulada positivamente em diferentes contextos de doença cardiovascular, incluindo hipertensão, aterosclerose, doença isquêmica e acidente vascular cerebral. O papel do VCAM-1 tem sido amplamente descrito na aterosclerose e na doença vascular ⁴⁸.

Estudos em poluição descreveram que na presença de polimorfonucleares inatos, a inalação de PM2.5 aumentou a expressão de mRNA e proteína de VCAM-1. VCAM-1 em células endoteliais ativadas, medeia a adesão leucócito-endotélio e facilita a infiltração de leucócitos ⁴⁹.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

O presente estudo tem como hipótese que o Roflumilaste pode modular a atividade inflamatória no parênquima pulmonar distal de animais geneticamente pré-

dispostos à Síndrome Metabólica e Obesidade com possíveis repercussões ao fluxo aéreo e sanguíneo. ⁵.

2.1. Objetivo Geral

Investigar o possível efeito protetor do Roflumilaste na resposta inflamatória nos vasos e vias aéreas do parênquima pulmonar distal e avaliar e seu possível impacto no remodelamento do ventrículo direito de camundongos ob/ob modificados geneticamente (modelo animal de Síndrome Metabólica).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular (LIM-59) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.1. Modelo experimental

Foram utilizados doze camundongos ob/ob, machos, pesando cerca de 60 gramas (Figura 2), cedidos pelo Departamento de Gastroenterologia Clínica e Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



Figura 2 - Camundongo ob/ob

Os animais experimentais foram mantidos em estantes ventiladas com ar filtrado (Filtro HEPA – High Efficiency Particulate Air), com temperatura controlada

entre 22-25°C e ciclo claro/escuro de 12 horas, com o ciclo iniciando-se às 7 horas, durante todo o seguimento do protocolo de pesquisa. Os animais foram alimentados com ração padrão (NUVILAB) e a água fornecida *ad libitum*.

3.2. Desenho experimental

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: PSI: animais submetidos ao tratamento com o produto sob investigação (PSI), o Roflumilaste (PSI, n=6) e NT: animais que não receberam o tratamento com o PSI (NT, n=4). O número inicial de animais no grupo controle foi n=6, porém durante o período experimental, dois animais morreram antes da finalização do tempo de estudo.

Os animais do grupo PSI foram tratados com o Roflumilaste na posologia de 1 mg/kg por dia, durante 12 semanas, com administrações realizadas 7 vezes por semana. Os animais do grupo controle passaram pelo mesmo processo, substituindo o Roflumilaste por água.

3.3. Obtenção do Roflumilaste e preparo para administração

O Roflumilaste foi obtido em redes de farmácias privadas, em sua apresentação comercial denominada Daxas (comprimidos revestidos de Roflumilaste 500 µg - com indicação para uso oral), fabricado por Takeda GmbH - Oranienburg – Alemanha; e importado por AstraZeneca do Brasil Ltda. – Cotia - SP.

Cada comprimido foi liofilizado individualmente e ressuspenso em 1 ml de água de consumo dos animais, resultando em uma solução padrão do Roflumilaste na concentração de 500 µg/ml.

A solução final de administração diária aos animais, apresentou um volume calculado em função do peso do animal, para a dosagem final de 1 mg/kg do animal. Para determinação da dose diária baseou-se em estudos sobre atividade anti-inflamatória e farmacocinética do Roflumilaste mostrando que, devido ao metabolismo acelerado da droga em roedores, é necessário administrar doses 200 a 1000 vezes

mais concentradas para atingir níveis sanguíneos terapeuticamente relevantes e equivalentes à dose de 500 µg diárias em humanos⁵⁰.

3.4. Protocolo de pesagem e administração do medicamento

Diariamente, todos os animais foram pesados e os valores obtidos foram registrados para o acompanhamento da evolução de peso dos mesmos e cálculo do volume da solução padrão de Roflumilaste a ser administrada.

No momento do tratamento, cada animal foi colocado em uma gaiola individual, na qual receberam o tratamento como PSI na dose calculada a partir do peso do dia, por gavagem (Figura 3).

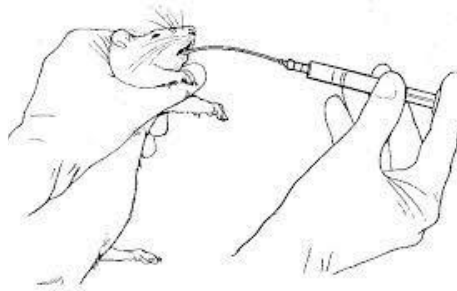


Figura 3 - Desenho representando o processo de administração de soluções por gavagem.

Os animais do grupo não tratado com o Roflumilaste, receberam água por gavagem, para que fossem submetidos ao mesmo procedimento do grupo tratado. E então, eram colocados em suas gaiolas originais.

3.5. Coleta de material para análises por microscopia de luz

Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados pelo método inalatório, com o uso de Isoflurano, seguindo recomendações do Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia em Animais.

Após a eutanásia, foram coletadas amostras do coração e pulmão de cada animal experimental. Os fragmentos coletados para análises por microscopia de luz

e imuno-histoquímica, foram imediatamente imersos em solução de paraformaldeído 4% em PBS, para fixação por 24h.

3.6. Histologia

Após a fixação, as amostras foram desidratadas em gradiente alcoólico nas seguintes concentrações (70%, 96% e 100%), e diafanizados em xilol (3 banhos seguidos de 30 minutos). Os tecidos passaram por 2 banhos de parafina a 62°C, com duração de 1 hora por banho e então foram incluídos em blocos de parafina que foram mantidos em temperatura ambiente. No dia anterior ao corte, os blocos com os tecidos foram armazenados em geladeira. Os blocos foram cortados com a utilização de micrótomo e os cortes de 5 µm foram colhidos em lâminas de vidro comum para as análises morfológicas e em lâminas sinalizadas para as análises por imuno-histoquímica.

3.6.1. Métodos de coloração

Hematoxilina-Eosina

Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em gradiente alcoólico (100°, 95° e 70°) e lavados em água corrente. A coloração foi feita pela Hematoxilina de Harris por 1 minutos a temperatura ambiente e lavagem em água corrente. Em seguida os fragmentos foram corados em eosina por 1 minuto e lavados em água corrente. Após a coloração os cortes foram desidratados em gradiente alcoólico (70°, 95° e 100°), diafanizados em xilol e montados com entellan e lamínula.

Picrossírius-hematoxilina

Princípio do método de coloração: o corante Sirius Red é uma molécula alongada, de PM 1372Da, com seis grupamentos sulfônicos ácidos e quatro grupamentos cromofóricos diazócicos. Demonstrou-se que os grupamentos sulfônicos do corante interagem fortemente com os aminoácidos básicos das moléculas dos

diferentes tipos de colágeno, conferindo-lhe intensa cor vermelha, sendo assim muito apropriado para sua identificação em cortes histológicos de rotina⁵¹.

Procedimento técnico: os cortes histológicos foram desparafinados em xilol, hidratados em gradiente alcoólico (100° a 70°) e água e corados durante uma hora em uma solução 0,1% de Sirius Red dissolvido em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Os cortes foram então lavados em água corrente e contra corados com hematoxilina de Harris fresca durante dois minutos; a seguir, lavados em água corrente, desidratados em gradiente alcoólico (70° a 100°), diafanizados em xilol e montados com lamínula e entellan para análise microscópica.

3.7. Imuno-histoquímica

As amostras de pulmão foram submetidas ao método descrito abaixo para avaliar a expressão de Endotelina 1 (ET1) e das Moléculas de Adesão de Células Vasculares-1 (VCAM-1) nos vasos pulmonares.

As lâminas foram desparafinizadas em xilol, realizando-se 3 banhos de 10 minutos e, em seguida, hidratadas com 4 banhos de 1 minuto em série decrescente de álcool (100%, 100%, 95% e 70%). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e deionizada. As lâminas foram colocadas em água oxigenada (H₂O₂ de 10 volumes) durante 5 minutos, sendo este processo repetido de 5 a 7 vezes. Em seguida, foram lavadas em água corrente, água deionizada e PBS. Em prosseguimento, as lâminas foram expostas à solução de tripsina por 10 minutos, a 37°C, em câmara úmida e lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas com Citrato 10mM, pH 6,0 à alta temperatura. Em seguida, lavadas 3 vezes com PBS, por 5 minutos. As reações inespecíficas foram bloqueadas pela incubação das lâminas com leite desnatado a 6%, por 30 minutos.

Os anticorpos primários previamente titulados foram diluídos em BSA. A solução de anticorpos diluída foi pipetada sobre os cortes, utilizando-se uma micropipeta; e as lâminas foram então incubadas em câmara úmida por 18 a 20 horas, em geladeira. Após a incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS, por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário em câmara úmida,

durante 1 hora à 37°C e então lavadas 3 vezes com PBS, por 5 minutos. Foram incubadas com complexo conjugado com peroxidase em câmara úmida, por 30 minutos, a 37° C. Após a incubação, lavadas 3 vezes com PBS, por 5 minutos e incubadas em solução de cromógeno (70mg de DAB em 70ml de PBS + 3ml de H₂O₂). Após 5 minutos para a revelação e, foram lavadas em água corrente por 10 minutos.

As lâminas foram contra-coradas em Hematoxilina de Harris, por 30 segundos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a montagem da lâmina com lamínula e foi realizada a análise do material por microscopia de luz.

3.8. Análises quantitativas em Microscopia de luz – Morfometria

3.8.1. Obtenção das imagens digitais

As imagens digitais foram obtidas com o auxílio do programa de análises de imagens digitais NIS Elements F 3.0 acoplado a um microscópio de luz Nikon Optiphot-2 e uma câmera de vídeo digital Nikon DXM1200F. Estas imagens foram utilizadas para a morfometria nos tecidos experimentais através do programa *Image J* (Programa para processamento de imagens, desenvolvido no *National Institutes of Health*).

Para estudo da área total do coração de todos os animais experimentais, foram obtidas imagens sob objetiva de 2,5x. Utilizando o programa *Image J*, acessou-se as imagens e com o auxílio de um retículo de pontos, onde a área do ponto equivale a 200.000 μm^2 , foram contados os pontos que incidiram sobre cada região do coração: ventrículo direito, ventrículo esquerdo e septo interventricular, a fim de determinar a área de cada compartimento.

Para análise de remodelamento dos vasos, as imagens foram obtidas das lâminas coradas pelo picrossirius hematoxilina, sob objetiva de 20x. As mesmas foram acessadas pelo Programa *Image J*, sobre cada imagem colocou-se um retículo de pontos, onde a área do ponto equivale a 80 μm^2 e foram contados os pontos incidentes

sobre: a luz, a parede vascular e as fibras do sistema colágeno perivascular. Foi medido também o diâmetro arterial.

Para quantificação das marcações imuno-histoquímicas: Endotelina I e VCAM no pulmão dos animais em estudo, foram obtidas imagens sob objetiva de 40x. Com o auxílio do programa Image J, as áreas com marcação por cada anticorpo, foram quantificadas em todos os animais experimentais.

3.9. Análise estatística

Para as análises estatísticas foi usado R: *A Language and Environment for Statistical Computing*, versão 4.1.1 (2021-08-10) -- "*Kick Things*".

Dados paramétricos foram comparados pelo teste t de Student, com ou sem a modificação de Welch após teste de homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene.

A análise estatística do peso mostrou que os animais do grupo PSI eram 8,89% maiores que os do grupo Controle.

4. RESULTADOS

4.1. Análise do material obtido

4.1.1. Análise morfológica qualitativa

As amostras coradas com hematoxilina-eosina foram avaliadas quanto à descrição morfológica. O coração e os pulmões dos camundongos ob/ob foram analisados, sendo 6 do grupo PSI e 4 do grupo Controle.

Em ambos os grupos estudados, o aspecto estrutural dos corações e pulmões dos camundongos experimentais está de acordo com a descrição morfológica desses órgãos em camundongos encontrada na literatura.

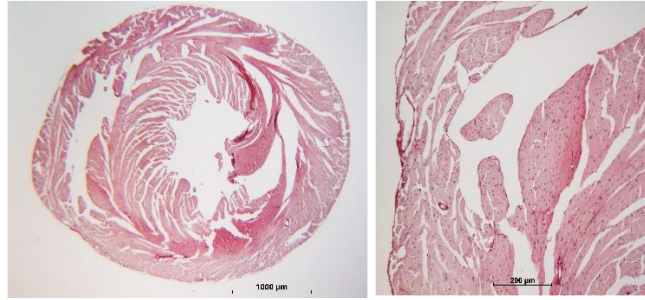


Figura 4 - Fotomicrografia do corte histológico do coração de camundongos ob/ob.
Coloração: Picrosirius-Hematoxilina

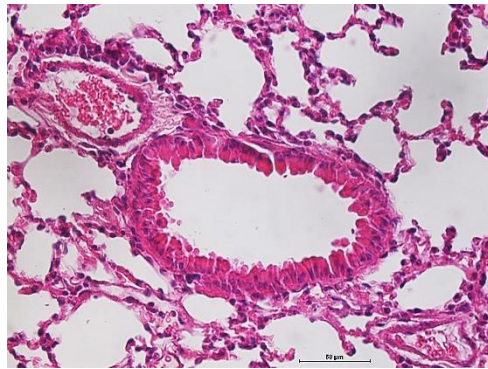


Figura 5 – Fotomicrografia de um corte histológico do pulmão dos camundongos ob/ob mostrando uma via aérea e arteríola no parênquima pulmonar distal. Coloração: Hematoxilina e Eosina.

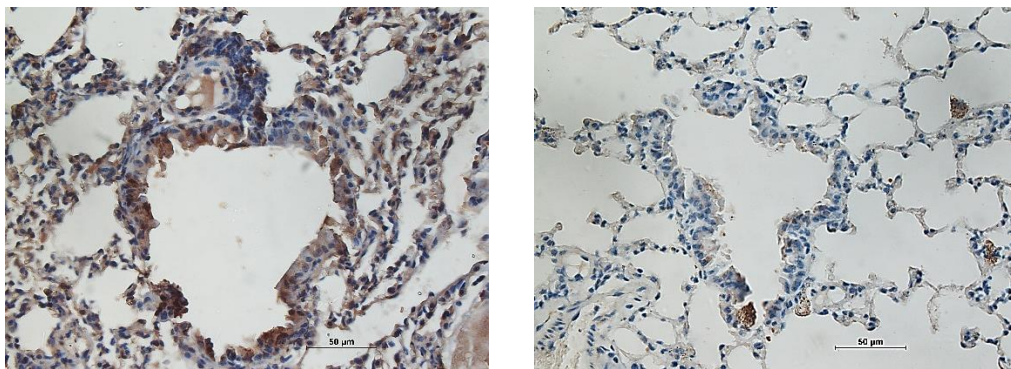


Figura 6 – Fotomicrografia de um corte histológico do pulmão de camundongos ob/ob. Marcadores imuno-histoquímicos: Endotelina. Controle e PSI.

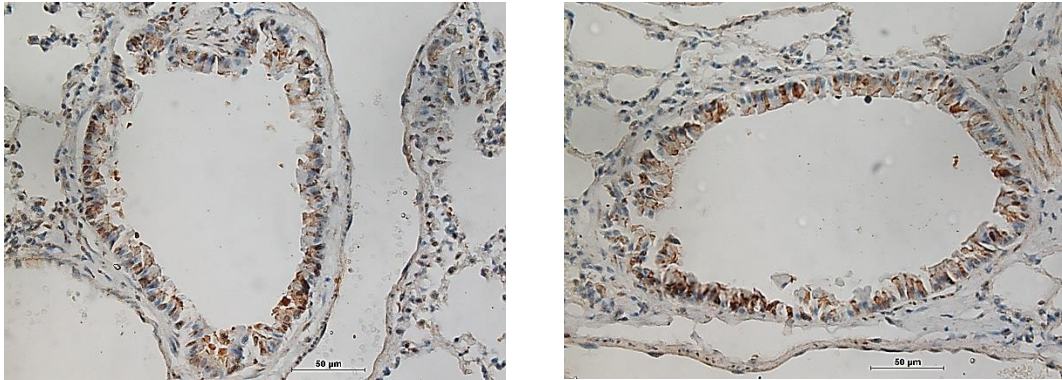


Figura 7 – Fotomicrografia de um corte histológico do pulmão de camundongos ob/ob. Marcadores imuno-histoquímicos: VCM. Controle e PSI.

4.1.2. Análise quantitativa do peso dos animais

Todos os animais foram pesados diariamente durante o período experimental. A análise estatística do peso do animal mostrou que a variância do grupo Roflumilaste foi menor do que o grupo Controle (Gráfico 1).

Há diferença entre os pesos do grupo controle no momento inicial para o final ($p=0,03125$) e não há diferença entre os tempos inicial e final no grupo Roflumilaste ($p=0,2188$). Há diferença entre os grupos quanto à variação percentual dos pesos ($p=0,00002616$). Assim, o Roflumilaste foi capaz de interromper o ganho de peso natural dos animais ob/ob durante o período de estudo. A Gráfico 1 e as Tabelas 1 e 2 ilustram esses dados e o valor médio e desvio padrão do peso em gramas dos animais dos grupos experimentais.

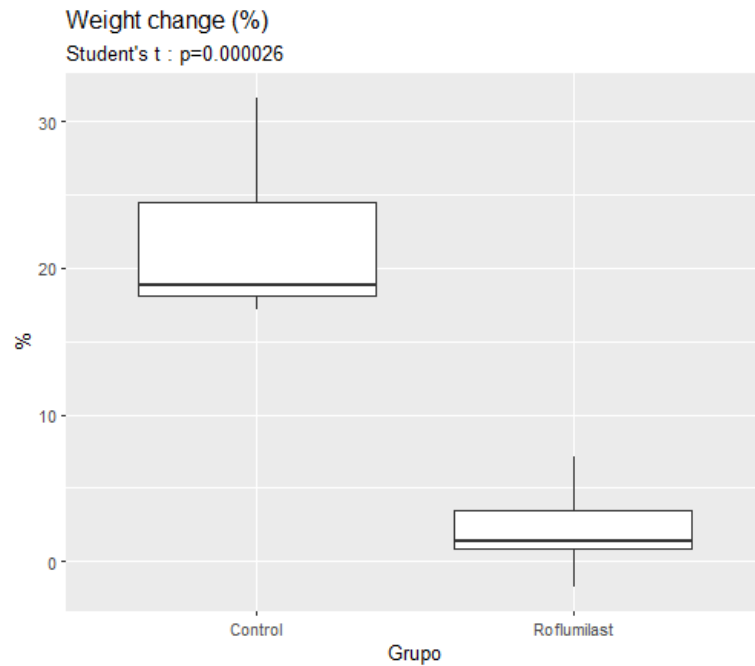


Gráfico 1 – Box Plot do peso dos animais dos grupos Controle (NT) e Roflumilaste (PSI), antes e após o período experimental.

Tabela 1 – Valores médios e desvio padrão dos pesos dos animais nos grupos Controle (NT) e Roflumilaste (PSI), antes e após o período experimental.

Grupo	tempo	média	Desv. Padr.
NT	pré	46,10	6,01
NT	pós	56,00	5,85
PSI	pré	50,20	3,35
PSI	pós	51,30	2,97

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão das variações dos pesos dos animais nos grupos Controle (NT) e Roflumilaste (PSI).

Variação de peso dos animais (%)			
Grupo	Média	Desvio-padrão	IC 95%
PSI	2,17955	3,062817	(-1,03; 5,39)
NT	21,79966	5,832389	(15,68; 27,92)

4.1.3. Análise morfológica quantitativa

As amostras histológicas do coração e pulmão dos animais de cada grupo experimental, foram analisadas por métodos morfométricos para determinar a área do tecido e as áreas que estavam marcadas por imuno-histoquímica.

As análises foram realizadas com o auxílio de um retículo de pontos, que incidiram sobre os órgãos estudados e seus compartimentos, conforme descrito nos materiais e métodos. Os valores foram anotados em planilhas e após as contagens, foram aplicadas as fórmulas para cálculo da porcentagem de área para cada item avaliado. Por fim foram realizadas as análises estatísticas.

4.1.4. Análise quantitativa do remodelamento cardíaco

As análises estatísticas do coração e do ventrículo direito demonstraram que há diferença na porcentagem de área do coração total ($p= 0,017$) e do ventrículo direito ($p=0,045$) entre os grupos experimentais. Estes dados podem ser observados nos gráficos 3 e 4.

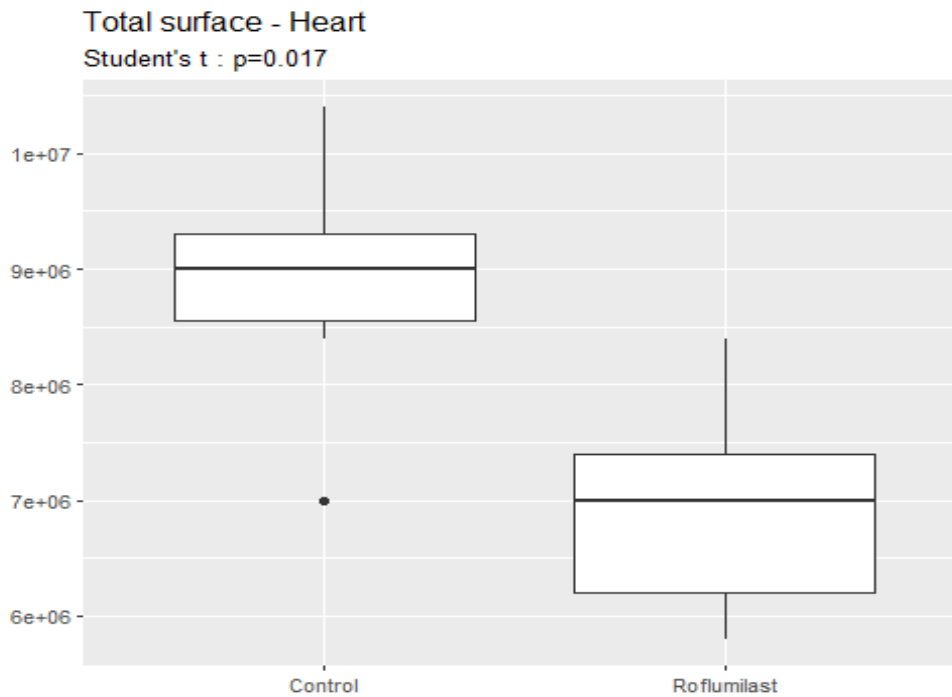


Gráfico 2 – Box Plot da porcentagem de área total do coração dos animais dos grupos Controle (NT) e Roflumilaste (PSI).

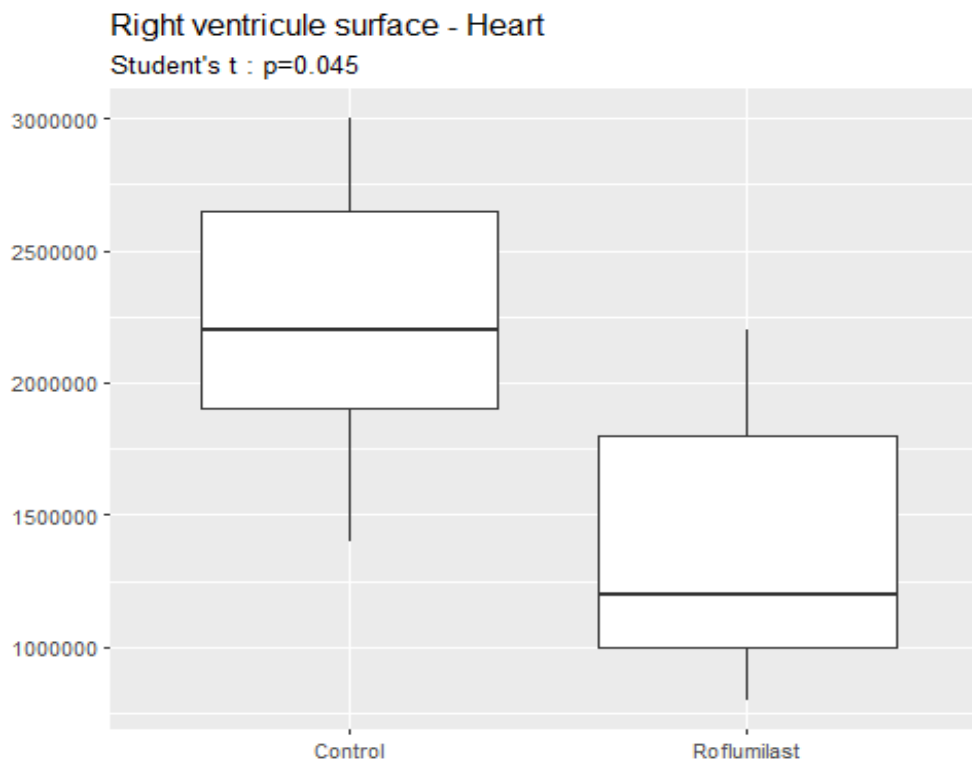


Gráfico 3 – Box Plot da porcentagem de área do ventrículo direito do coração dos animais dos grupos Controle (NT) e Roflumilaste (PSI).

4.1.5. Análise quantitativa das marcações imuno-histoquímicas – VCAM e Endotelina

4.1.5.1. VIAS AÉREAS - Análise imuno-histoquímica do VCAM

Nós analisamos a área relativa Das marcações imuno-histoquímicas do VCAM nas vias aéreas do parênquima pulmonar distal e dividimos as vias aéreas de acordo com seus diâmetros em grandes (206,7 μm 15,9 SD) e pequenas (108,4 μm – 9,5 SD). Não houve diferença estatística dentre os grupos no total ($p=0,792$), grandes ($p=0,257$) ou pequenas ($p=0,672$). Gráficos 4, 5 e 6 demonstram estes resultados.

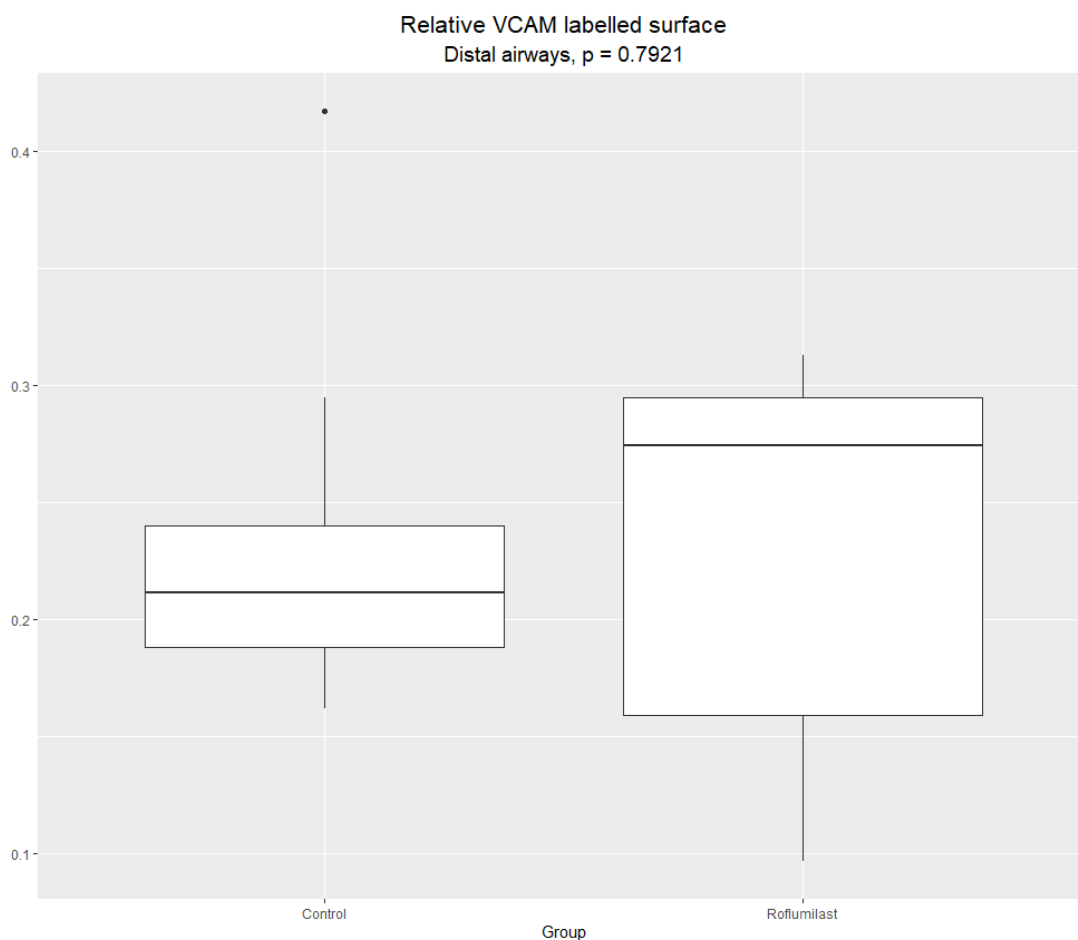


Gráfico 4 - Área relativa das marcações imuno-histoquímicas de VCAM nas vias aéreas do parênquima pulmonar distal. Nenhuma diferença foi observada ($p=0,792$).

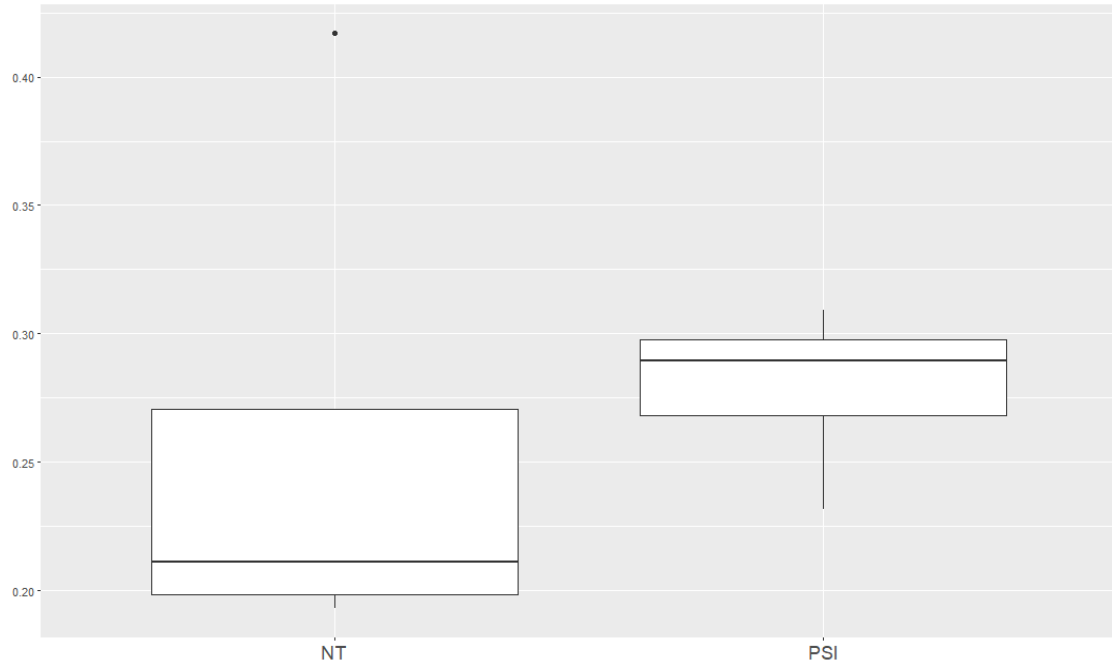


Gráfico 5 - Área relativa das marcações imuno-histoquímicas de VCAM nas vias aéreas grandes do parênquima pulmonar distal. Nenhuma diferença foi observada ($p=0,257$).

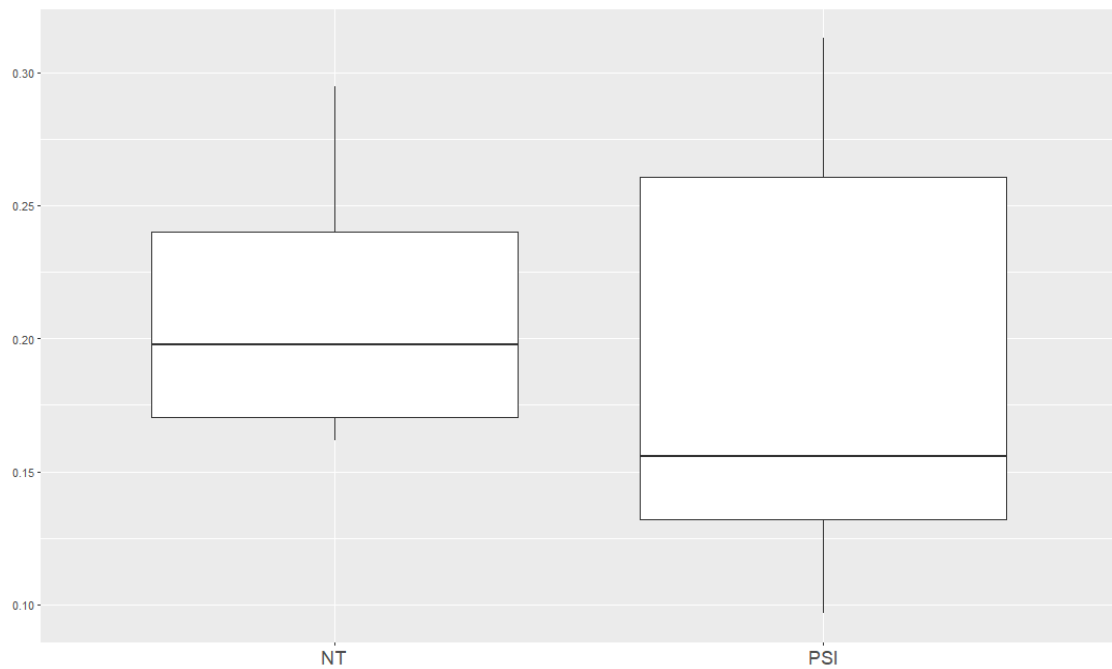


Gráfico 6 - Área relativa das marcações imuno-histoquímicas de VCAM nas vias aéreas pequenas do parênquima pulmonar distal. Nenhuma diferença foi observada ($p=0,672$).

4.1.5.2. VIAS AÉREAS - Análise imuno-histoquímica da Endotelina

Nos também analisamos a área relativa das marcações imuno-histoquímicas nas vias aéreas do parênquima pulmonar distal e dividimos as vias aéreas de acordo com seus diâmetros em grande ($206,7\mu\text{m}$ 15,9 SD) e pequenos ($106,4\mu\text{m}$ 9,5 SD). Nenhuma diferença estatística foi observada dentre os grupos no total ($p=0,069$), grandes ($p=0,155$) ou pequenos ($p=0,061$). Ainda assim, foi observada a tendência de um valor menor no grupo Roflumilaste.

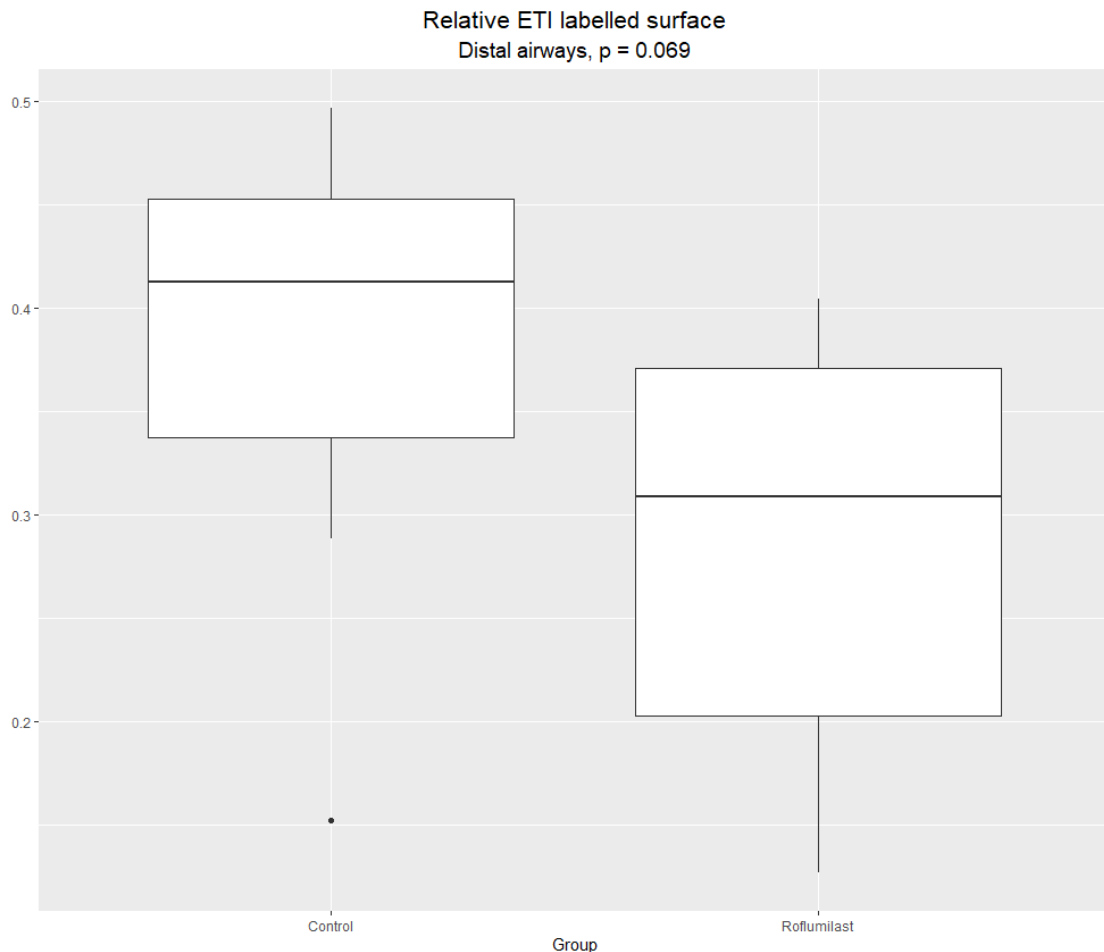


Gráfico 7 - Área relativa das marcações imuno-histoquímicas de Endotelina nas vias aéreas do parênquima pulmonar distal. Nenhuma diferença foi observada ($p= 0,069$).

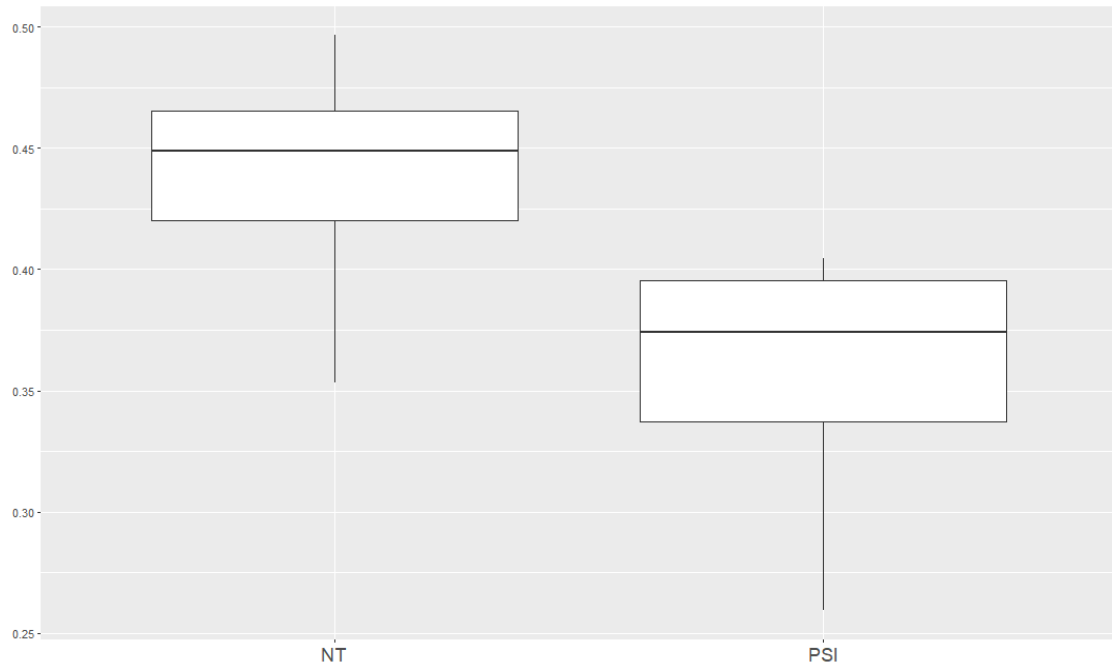


Gráfico 8 - Área relativa das marcações imuno-histoquímicas de Endotelina nas vias aéreas grandes do parênquima pulmonar distal. Nenhuma diferença foi observada ($p= 0,155$).

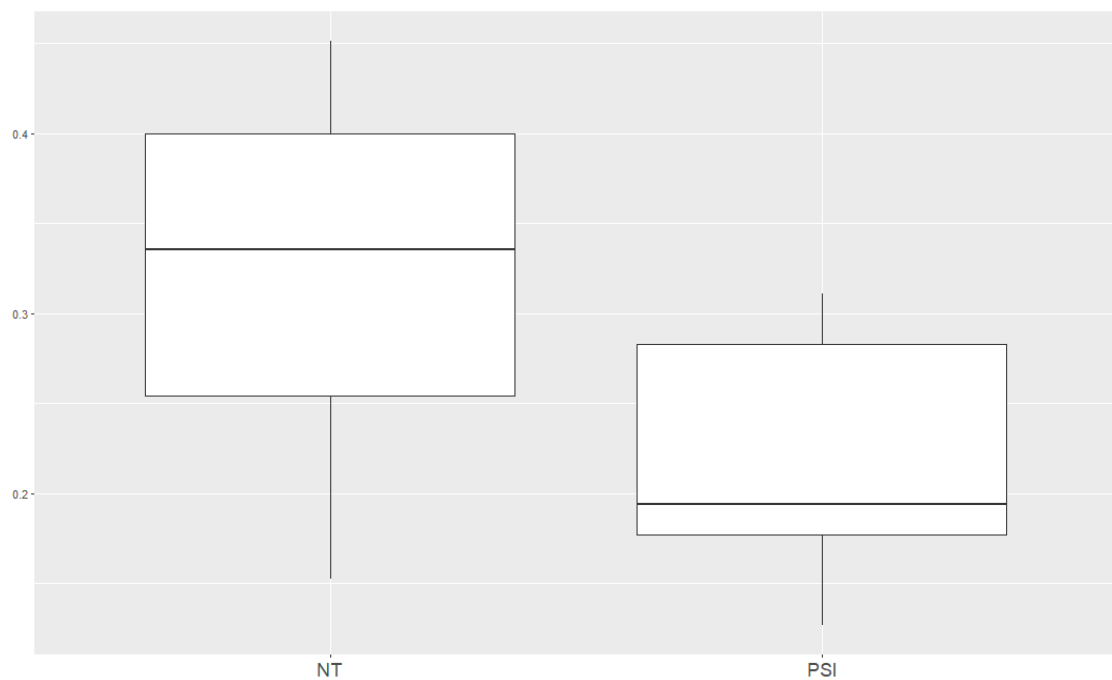


Gráfico 9 - Área relativa das marcações imuno-histoquímicas de Endotelina nas vias aéreas pequenas do parênquima pulmonar distal. Nenhuma diferença foi observada ($p= 0,061$).

4.1.5.3. VASOS - Análises imuno-histoquímicas do VCAM nas arteríolas

Nós analisamos a área relativa das marcações imuno-histoquímicas de VCAM nas vias aéreas do parênquima pulmonar distal e dividimos as arteríolas de acordo com seu diâmetro em grandes ($50,7\mu\text{m}$ SD 9,6) e pequenas ($24,4\mu\text{m}$ SD 1,3). Nós não observamos nenhuma diferença significativa entre os grupos Controle e Roflumilaste. Gráficos 10, 11 e 12 mostram estes resultados.

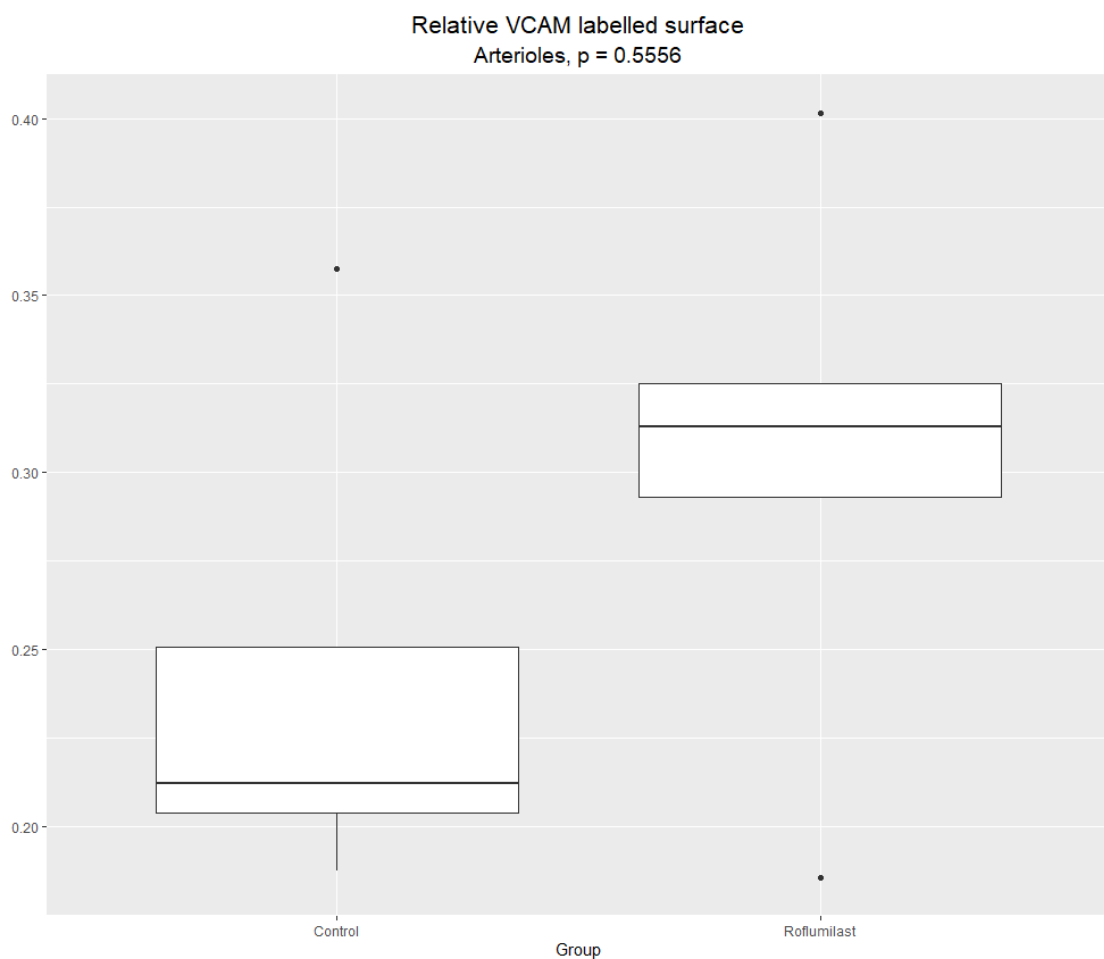


Gráfico 10 - Área relativa das marcações imuno-histoquímicas de VCAM em todas as arteríolas analisadas do parênquima pulmonar distal. Nenhuma diferença foi observada ($p = 0,555$).

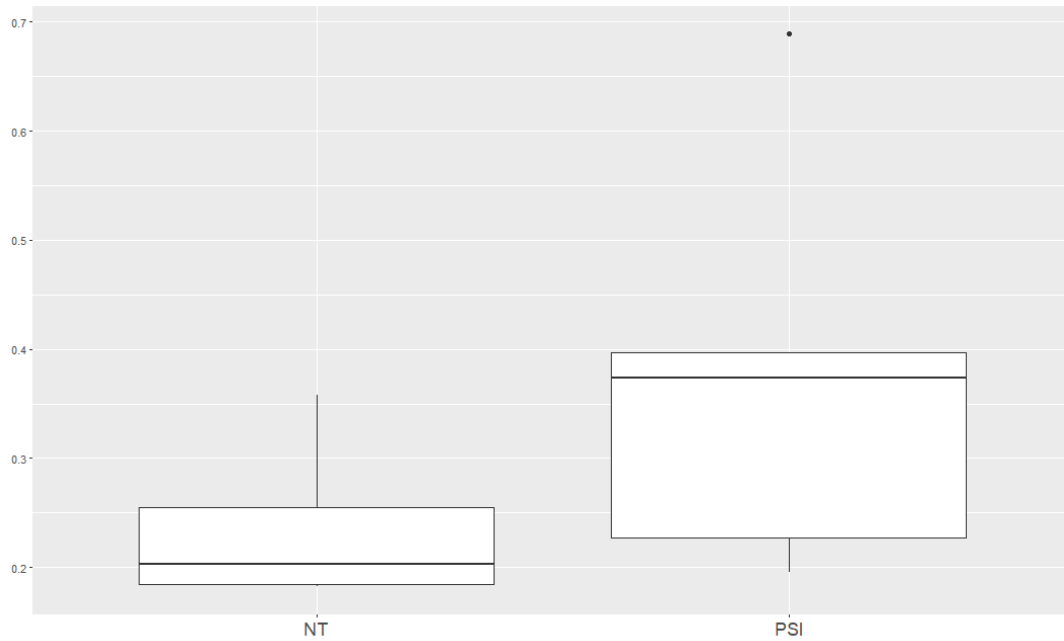


Gráfico 11 - Área relativa das marcações imuno-histoquímicas de VCAM nas arteríolas grandes do parênquima pulmonar distal. Nenhuma diferença foi observada ($p=0,226$).

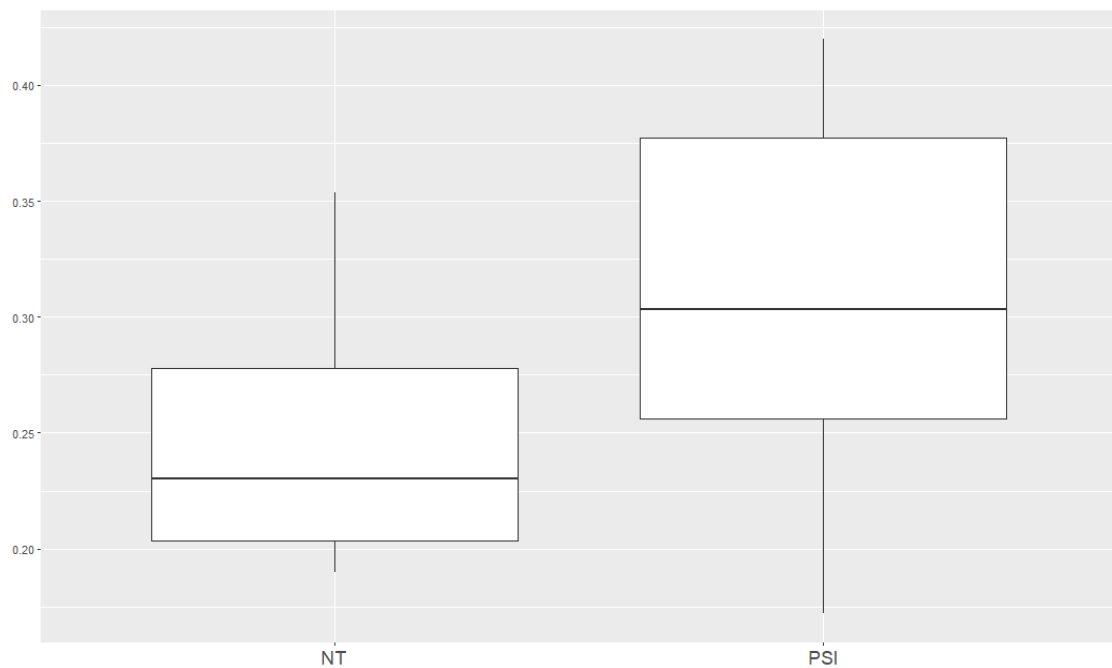


Gráfico 12 - Área relativa das marcações imuno-histoquímicas de VCAM nas arteríolas pequenas do parênquima pulmonar distal. Nenhuma diferença foi observada ($p=0,387$).

4.1.5.4. VASOS - Análises imuno-histoquímicas de Endotelina nas arteríolas

Análise estatística para as marcações imuno-histoquímicas no parênquima distal, mostram que há diferença na marcação pelo anticorpo endotelina entre os grupos Controle e Roflumilaste no total das arteríolas analisadas ($p=0,037$) e a mesma diferença foi observada quando as arteríolas foram separadas em grandes ($p=0,032$) e pequenas ($p=0,037$) em diâmetro. Os dados são exibidos nos gráficos 13, 14 e 15.

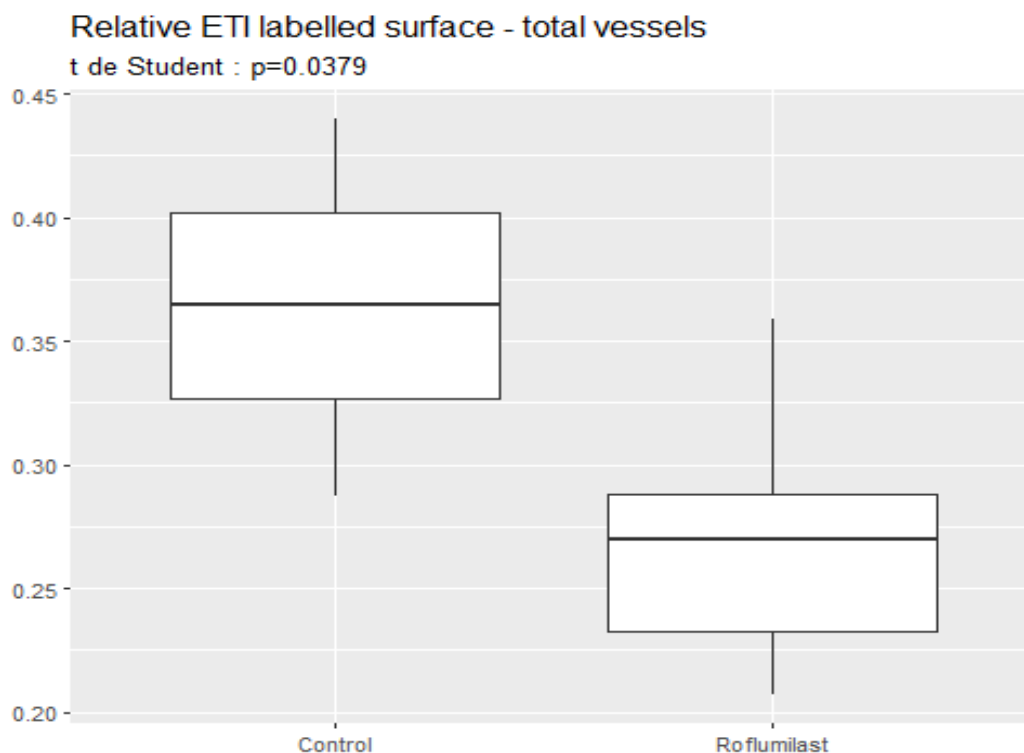


Gráfico 13 – Box Plot da área marcada pela endotelina pela área da parede na totalidade de arteríolas analisadas, dos animais dos grupos Controle e Roflumilaste. ($p=0,037$)

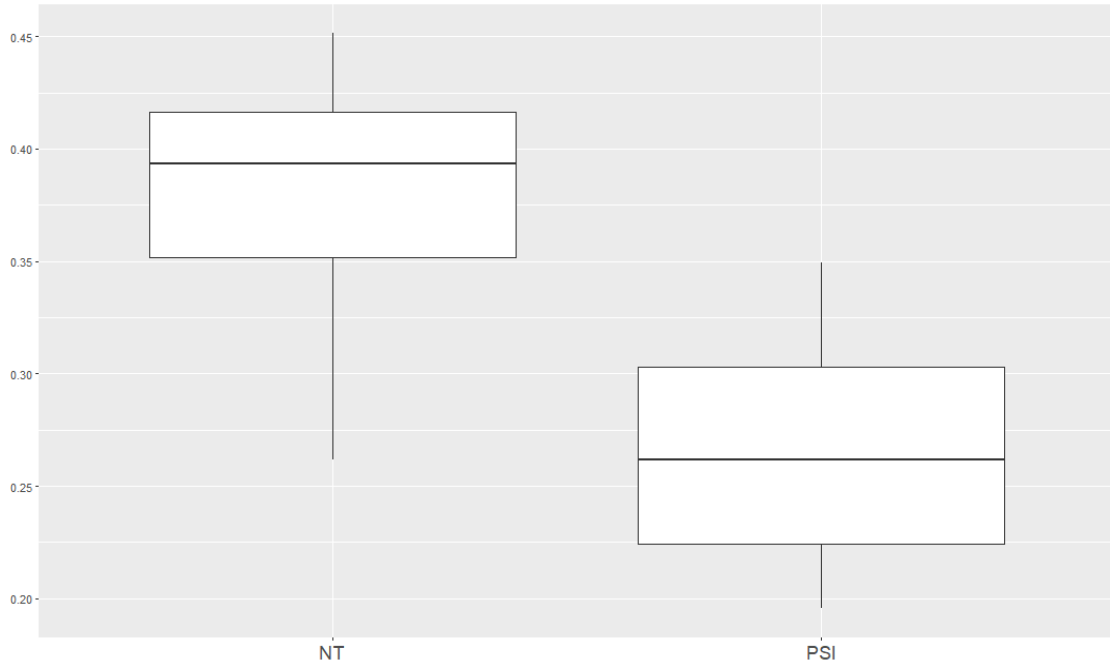
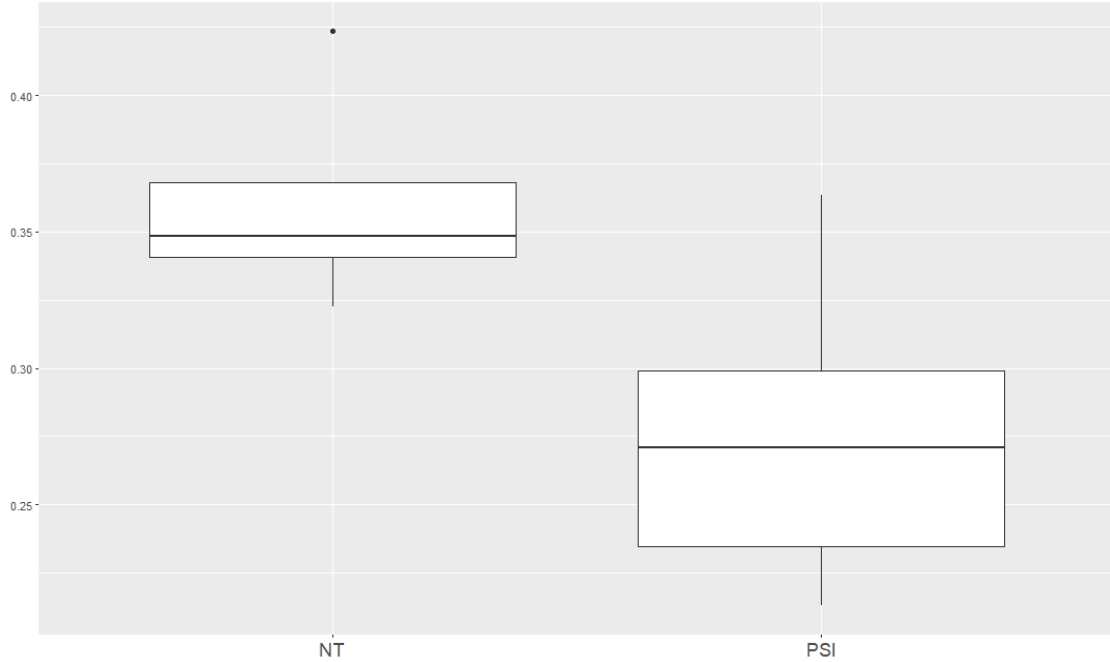


Gráfico 14 – Box Plot da área marcada por endotelina pela área da parede nas arteríolas grandes do parênquima pulmonar distal, dos grupos Controle e Roflumilaste. ($p=0,032$)



Graphic 15 – Box Plot da área marcada pela endotelina pela área da parede nas arteríolas pequenas do parênquima pulmonar distal, dos grupos Controle e Roflumilaste. ($p=0,037$)

5. DISCUSSÃO

O presente estudo estuda pela primeira vez a resposta combinada ao Roflumilaste de vias aéreas e circulação pulmonar distal em um modelo animal de síndrome metabólica. De forma interessante, observamos uma diminuição da expressão de endotelina no componente circulatório e um sinal não significativo no mesmo sentido nas vias aéreas distais. Conseguimos também demonstrar a repercussão deste tratamento no remodelamento cardíaco global e em particular do ventrículo direito nesse cenário. Não observamos diferença na expressão de VCAM 1 nas vias aéreas ou vasos pulmonares nos grupos estudados. O VCAM1 é uma molécula de adesão que auxilia principalmente na migração transendotelial leucocitária e linfocitária⁵². O Roflumilaste no presente modelo não parece interferir neste mecanismo. Tal achado ajuda a entender melhor as propriedades potenciais do tratamento com Roflumilaste em pacientes obesos, especialmente os portadores de Síndrome metabólica associada, com limitação ao fluxo aéreo e com fatores predisponentes à hipertensão pulmonar secundária.

Também interessante notar que o parênquima pulmonar distal deve ser entendido como um microambiente integrado, onde não é cabível isolar vias aéreas e alvéolos do componente vascular. Nesse microambiente, células inflamatórias, epiteliais e endoteliais, além de células neuroendócrinas e musculares lisas estão em constante diálogo, respondendo a estímulos de maneira integrada. Tal observação mais atenta nos permite entender os potenciais impactos de tratamentos e intervenções nesse território.

Dentro do pulmão, a endotelina (ET)-1 é sintetizada e liberada por células epiteliais e endoteliais, bem como por células inflamatórias, como macrófagos. Após a liberação, a endotelina pode modular as atividades de uma ampla gama de tipos de células diferentes dentro do pulmão através da estimulação de receptores ETA e ETB específicos. As maiores densidades de receptores de endotelina dentro do pulmão parecem estar associadas com o músculo liso das vias aéreas e do septo alveolar. Os efeitos induzidos pela endotelina dentro do pulmão incluem contração e proliferação de músculo liso das vias aéreas, facilitação da neurotransmissão colinérgica, hipersecreção da glândula mucosa, aumento da permeabilidade microvascular e

influxo e ativação de células inflamatórias. Evidências sugerem que mudanças no teor de endotelina dentro da parede das vias aéreas, associadas a patologias pulmonares, podem ter efeitos profundos na inflamação e remodelamento do parênquima pulmonar distal. Tal observação tem impacto direto na circulação pulmonar e interfere no remodelamento cardíaco.

A Síndrome metabólica é definida como uma combinação de fatores, entre eles: aumento da gordura visceral, intolerância à glicose, dislipidemia e em geral associada à hipertensão arterial. Em associação com esses fatores, observa-se ativação do sistema nervoso simpático, sistema renina-angiotensina e aumento dos níveis de adipocinas proinflamatórias e citocinas que posteriormente contribuem para o aumento da frequência cardíaca, volume sanguíneo circulante e resistência vascular periférica. Este fenótipo hemodinâmico está associado ao risco de doenças cardiovasculares com disfunção microvascular, comprometimento do equilíbrio entre oferta/demanda de oxigênio, disfunção cardíaca (diastólica) e hipertrofia cardíaca concêntrica, as adipocinas têm sido sugeridas como importantes agentes mantenedores deste ambiente pro inflamatório instalado no organismo do paciente portador da síndrome metabólica. Neste cenário o Roflumilaste pode exercer seu papel anti-inflamatório e auxiliar ao retorno à homeostase.

Em nosso estudo fomos capazes de observar diferenças entre os grupos no que diz respeito ao remodelamento cardíaco, em especial no remodelamento do ventrículo direito. Os animais tratados apresentaram valores menores de área de músculo cardíaco total e particularmente de músculo do ventrículo direito. Tais medidas histológicas são prováveis reflexos da melhora da circulação pulmonar nos animais tratados com conseqüente redução do trabalho cardíaco e menos sobrecarga das câmaras direitas, além de prováveis efeitos diretos no metabolismo celular do cardiomiócito.

6. CONCLUSÕES

Concluimos que o roflumilaste foi capaz de inibir a expressão de endotelina nos vasos do parênquima pulmonar distal em um modelo animal de síndrome metabólica. Tal ação teve repercussão direta no remodelamento cardíaco com especial impacto ventrículo direito. Tal achado auxilia no entendimento da ação deste medicamento na prática clínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 GIEMBYCZ, M. A.; FIELD, S. K. Roflumilaste: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD. **Drug Des Devel Ther**, v. 4, p. 147-58, Jul 21 2010. ISSN 1177-8881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689641> >.
- 2 ZHANG, X. et al. Pharmacological mechanism of roflumilaste in the treatment of asthma-COPD overlap. **Drug Des Devel Ther**, v. 12, p. 2371-2379, 2018. ISSN 1177-8881. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30122895> >.
- 3 MARTORANA, P. A. et al. Effect of roflumilaste on inflammatory cells in the lungs of cigarette smoke-exposed mice. **BMC Pulm Med**, v. 8, p. 17, Aug 28 2008. ISSN 1471-2466. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18755021> >.
- 4 MÖLLMANN, J. et al. The PDE4 inhibitor roflumilaste reduces weight gain by increasing energy expenditure and leads to improved glucose metabolism. **Diabetes Obes Metab**, v. 19, n. 4, p. 496-508, 04 2017. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27917591> >.
- 5 BETZ, M. J.; ENERBÄCK, S. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. **Nat Rev Endocrinol**, v. 14, n. 2, p. 77-87, 02 2018. ISSN 1759-5037. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29052591> >.
- 6 HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**, v. 19, n. 10, p. 1252-63, Oct 2013. ISSN 1546-170X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24100998> >.

- 7 MARTORANA, P. A. et al. Roflumilaste fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 172, n. 7, p. 848-53, Oct 01 2005. ISSN 1073-449X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961691> >.
- 8 KWAK, H. J. et al. PDE4 inhibitor, roflumilaste protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways. **Cell Signal**, v. 20, n. 5, p. 803-14, May 2008. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276108> >.
- 9 BENN, M. et al. Obesity increases heart failure incidence and mortality: observational and Mendelian randomisation studies totalling over 1 million individuals. **Cardiovasc Res**, Dec 25 2021. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34954789> >.
- 10 HEIANZA, Y.; QI, L. Impact of Genes and Environment on Obesity and Cardiovascular Disease. **Endocrinology**, v. 160, n. 1, p. 81-100, 01 2019. ISSN 1945-7170. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30517623> >.
- 11 MOREIRA, A. D. et al. Association between Adiposity Indexes and Kidney Disease: Findings from the Longitudinal Study of Adult Health (Elsa-Brazil). **J Am Coll Nutr**, p. 1-7, Feb 2021. ISSN 1541-1087. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33605838> >.
- 12 APOVIAN, C. M.; ISTFAN, N. W. Obesity: Guidelines, Best Practices, New Research. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 45, n. 3, p. xvii-xviii, 09 2016. ISSN 1558-4410. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27519142> >.
- 13 HSU, Y. E. et al. Obesity-Related Indices Are Associated with Longitudinal Changes in Lung Function: A Large Taiwanese Population Follow-Up Study. **Nutrients**, v. 13, n. 11, Nov 12 2021. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34836307> >.
- 14 WONG, M. et al. Persistent overweight or obesity, lung function, and asthma exacerbations in Puerto Rican Youth. **Ann Allergy Asthma Immunol**, Jan 08 2022. ISSN 1534-4436. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35017083> >.
- 15 GUO, X.; SUNIL, C.; QIAN, G. Obesity and the Development of Lung Fibrosis. **Front Pharmacol**, v. 12, p. 812166, 2021. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35082682> >.
- 16 BURAS, E. D. et al. Fibro-Adipogenic Remodeling of the Diaphragm in Obesity-Associated Respiratory Dysfunction. **Diabetes**, v. 68, n. 1, p. 45-56, 01 2019. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30361289> >.
- 17 BUECHLER, C.; KRAUTBAUER, S.; EISINGER, K. Adipose tissue fibrosis. **World J Diabetes**, v. 6, n. 4, p. 548-53, May 15 2015. ISSN 1948-9358. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25987952> >.

- 18 MARCELIN, G. et al. Deciphering the cellular interplays underlying obesity-induced adipose tissue fibrosis. **J Clin Invest**, v. 129, n. 10, p. 4032-4040, 10 01 2019. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31498150> >.
- 19 BRINGARDNER, B. D. et al. The role of inflammation in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 2, p. 287-301, Feb 2008. ISSN 1523-0864. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961066> >.
- 20 SGALLA, G. et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. **Respir Res**, v. 19, n. 1, p. 32, 02 22 2018. ISSN 1465-993X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29471816> >.
- 21 _____. Update in Pulmonary Fibrosis 2018. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 200, n. 3, p. 292-300, 08 01 2019. ISSN 1535-4970. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31022351> >.
- 22 AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 138, n. 4, p. 984-1010, 10 2016. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27577879> >.
- 23 BASTARD, B.; CHASTONAY, P. [Giving blood and human rights]. **Transfus Clin Biol**, v. 13, n. 3, p. 179-80, Sep 2006. ISSN 1246-7820. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16979361> >.
- 24 TATEYA, S.; KIM, F.; TAMORI, Y. Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 93, 2013. ISSN 1664-2392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23964268> >.
- 25 AVRAMENKO, Y. et al. Interleukin-26 is associated with the level of systemic inflammation and lung functions in obese and non-obese moderate-to-severe asthmatic patients. **Adv Respir Med**, Jan 27 2022. ISSN 2543-6031. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35084725> >.
- 26 ENGIN, A. Endothelial Dysfunction in Obesity. **Adv Exp Med Biol**, v. 960, p. 345-379, 2017. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28585207> >.
- 27 MAZZONE, T. Adipose tissue and the vessel wall. **Curr Drug Targets**, v. 8, n. 11, p. 1190-5, Nov 2007. ISSN 1873-5592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18045097> >.
- 28 TADA, H.; TAKAMURA, M.; KAWASHIRI, M. A. The Effect of Diet on Cardiovascular Disease, Heart Disease, and Blood Vessels. **Nutrients**, v. 14, n. 2, Jan 07 2022. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35057427> >.

- 29 ENGIN, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. **Adv Exp Med Biol**, v. 960, p. 1-17, 2017. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28585193> >.
- 30 APOVIAN, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. **Am J Manag Care**, v. 22, n. 7 Suppl, p. s176-85, Jun 2016. ISSN 1936-2692. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27356115> >.
- 31 ALBERTI, K. G. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-5, Oct 20 2009. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19805654> >.
- 32 ZAMANIAN, R. T. et al. Insulin resistance in pulmonary arterial hypertension. **Eur Respir J**, v. 33, n. 2, p. 318-24, Feb 2009. ISSN 1399-3003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19047320> >.
- 33 MARON, B. A.; LEOPOLD, J. A.; HEMNES, A. R. Metabolic syndrome, neurohumoral modulation, and pulmonary arterial hypertension. **Br J Pharmacol**, v. 177, n. 7, p. 1457-1471, 04 2020. ISSN 1476-5381. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31881099> >.
- 34 WEST, J. et al. A potential role for insulin resistance in experimental pulmonary hypertension. **Eur Respir J**, v. 41, n. 4, p. 861-71, Apr 2013. ISSN 1399-3003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22936709> >.
- 35 HUERTAS, A. et al. Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. **Eur Respir J**, v. 40, n. 4, p. 895-904, Oct 2012. ISSN 1399-3003. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22362850> >.
- 36 LOPASCHUK, G. D. et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. **Physiol Rev**, v. 90, n. 1, p. 207-58, Jan 2010. ISSN 1522-1210. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20086077> >.
- 37 HICKEY, K. A. et al. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. **Am J Physiol**, v. 248, n. 5 Pt 1, p. C550-6, May 1985. ISSN 0002-9513. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3993773> >.
- 38 YANAGISAWA, M. et al. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. **J Hypertens Suppl**, v. 6, n. 4, p. S188-91, Dec 1988. ISSN 0952-1178. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2853725> >.

- 39 RUBANYI, G. M.; POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 3, p. 325-415, Sep 1994. ISSN 0031-6997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7831383> >.
- 40 GOLDIE, R. G. et al. The distribution and density of receptor subtypes for endothelin-1 in peripheral lung of the rat, guinea-pig and pig. **Br J Pharmacol**, v. 117, n. 4, p. 729-35, Feb 1996. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8646421> >.
- 41 HAFIZI, S. et al. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors. **Atherosclerosis**, v. 146, n. 2, p. 351-9, Oct 1999. ISSN 0021-9150. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10532691> >.
- 42 SCHIFFRIN, E. L.; TOUYZ, R. M. Vascular biology of endothelin. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 32 Suppl 3, p. S2-13, 1998. ISSN 0160-2446. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9883741> >.
- 43 FAGAN, K. A.; MCMURTRY, I. F.; RODMAN, D. M. Role of endothelin-1 in lung disease. **Respir Res**, v. 2, n. 2, p. 90-101, 2001. ISSN 1465-9921. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11686871> >.
- 44 OSBORN, L. et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. **Cell**, v. 59, n. 6, p. 1203-11, Dec 22 1989. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2688898> >.
- 45 MEIGS, J. B. et al. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 291, n. 16, p. 1978-86, Apr 28 2004. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113816> >.
- 46 DESSEIN, P. H.; JOFFE, B. I.; SINGH, S. Biomarkers of endothelial dysfunction, cardiovascular risk factors and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 7, n. 3, p. R634-43, 2005. ISSN 1478-6362. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899050> >.
- 47 ZHONG, L.; SIMARD, M. J.; HUOT, J. Endothelial microRNAs regulating the NF-κB pathway and cell adhesion molecules during inflammation. **FASEB J**, v. 32, n. 8, p. 4070-4084, 08 2018. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29565737> >.
- 48 TRONCOSO, M. F. et al. VCAM-1 as a predictor biomarker in cardiovascular disease. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1867, n. 9, p. 166170, 09 01 2021. ISSN 1879-260X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34000374> >.
- 49 CUI, A. et al. VCAM-1-mediated neutrophil infiltration exacerbates ambient fine particle-induced lung injury. **Toxicol Lett**, v. 302, p. 60-74, Mar 01 2019. ISSN 1879-3169. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30447258> >.

- ⁵⁰ KUMAR, R. K. et al. Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilaste and dexamethasone in murine chronic asthma. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 307, n. 1, p. 349-55, Oct 2003. ISSN 0022-3565. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954795> >.
- ⁵¹ JUNQUEIRA, L. C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, v. 41, n. 3, p. 267-74, Jun 1978. ISSN 0004-0681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/82432> >.
- ⁵² KONG, D. H. et al. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 4, Apr 02 2018. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29614819> >.

APÊNDICE

Tabela descritiva geral segundo os grupos

variavel	Grupo	n	mediana	Int. Interquartil	média	Desvio padrão	IC95%inf	IC95%sup
Area_col_periarterialCOR	NT	6	780	510	784,444	504,234	255,283	1313,605
Area_col_periarterialCOR	PSI	5	160	253,333	266,667	253,158	-47,67	581,004
Area_luzCOR	NT	6	800	470	813,333	581,125	203,479	1423,187
Area_luzCOR	PSI	5	160	240	282,667	253,579	-32,193	597,527
Area_paredeCOR	NT	6	580	390	611,111	280,75	316,482	905,74
Area_paredeCOR	PSI	5	240	293,333	322,667	216,107	54,335	590,999
Area_SeptoCOR	NT	6	230000	350000	2466666,667	500666,223	1941249,689	2992083,645
Area_SeptoCOR	PSI	5	220000	400000	2320000	540370,243	1649041,723	2990958,277
Area_TOTALCOR	NT	6	900000	750000	8866666,667	1129011,367	7681841,901	10051491,43
Area_TOTALCOR	PSI	5	700000	1200000	6960000	1023718,711	5688885,332	8231114,668
Area_VDCOR	NT	6	220000	750000	2233333,333	598887,858	1604839,07	2861827,596
Area_VDCOR	PSI	5	120000	800000	1400000	583095,189	675991,696	2124008,304
Area_VECOR	NT	6	410000	1500000	4166666,667	1127238,514	2983702,396	5349630,938
Area_VECOR	PSI	5	320000	200000	3240000	167332,005	3032229,873	3447770,127
ColLuzCOR	NT	6	0,939	0,544	1,028	0,482	0,522	1,534
ColLuzCOR	PSI	5	1	0,833	1,041	0,594	0,303	1,779
ColParCOR	NT	6	1,088	0,522	1,249	0,734	0,479	2,019
ColParCOR	PSI	5	0,8	0,324	0,788	0,31	0,403	1,173
ColVDCOR	NT	6	0	0	0	0	0	0
ColVDCOR	PSI	5	0	0	0	0	0	0
D_luzCOR	NT	6	22,676	11,142	21,844	10,332	11,001	32,687
D_luzCOR	PSI	5	9,759	3,141	10,467	5,553	3,571	17,363
LuzParCOR	NT	6	1,158	0,525	1,23	0,469	0,738	1,722
LuzParCOR	PSI	5	0,6	0,805	0,988	0,694	0,126	1,85
Varição percentual do Peso	NT	6	18,882	6,381	21,8	5,832	15,679	27,921
Varição percentual do Peso	PSI	6	1,423	2,662	2,18	3,063	-1,034	5,394
Peso Final	NT	6	54,329	3,424	55,958	5,846	49,823	62,093
Peso Final	PSI	6	51,27	2,906	51,287	2,969	48,171	54,403
Peso Inicial	NT	6	44,216	3,364	46,094	6,012	39,785	52,403
Peso Inicial	PSI	6	50,733	5,109	50,234	3,347	46,722	53,746

variavel	Grupo	n	mediana	Int. Interquartil	média	Desvio padrão	IC95%inf	IC95%sup
AreaMarcETI_va_tot	NT	4	47541,935	18517,058	58788,8	26244,068	17028,632	100548,968
AreaMarcETI_va_tot	PSI	6	39269,519	25254,707	44728,066	18952,728	24838,398	64617,734
AreaMarcVCAM_va_tot	NT	4	32875,239	8612,948	31093,324	6839,404	20210,305	41976,343
AreaMarcVCAM_va_tot	PSI	6	25817,304	7825,438	24910,917	6120,024	18488,346	31333,488

AreaPared_e_ETIvasosGd	NT	4	3916,618	555,692	4087,911	506,407	3282,105	4893,717
AreaPared_e_ETIvasosGd	PSI	6	3953,416	2019,801	4661,672	1556,74	3027,974	6295,37
AreaPared_e_ETIvasosPq	NT	4	3723,911	350,454	3814,184	423,024	3141,059	4487,309
AreaPared_e_ETIvasosPq	PSI	6	2673,849	1416,722	2981,093	959,488	1974,172	3988,014
AreaPared_e_ETIvasosTot	NT	4	3794,556	409,412	3965,13	490,873	3184,041	4746,219
AreaPared_e_ETIvasosTot	PSI	6	3694,069	1102,421	3714,427	840,033	2832,867	4595,987
AreaPared_e_vaETI_Gd	NT	4	14603,107	2765,241	13820,669	2561,885	9744,138	17897,2
AreaPared_e_vaETI_Gd	PSI	6	12945,604	1908,916	12550,448	2102,857	10343,635	14757,261
AreaPared_e_vaETI_Pq	NT	4	11929,703	2229,49	11685,575	1797,924	8824,676	14546,474
AreaPared_e_vaETI_Pq	PSI	6	9219,98	1672,633	9798,529	1291,628	8443,048	11154,01
AreaPared_e_vaVCAM_Gd	NT	4	13781,217	3161,952	13476,495	2176,091	10013,848	16939,142
AreaPared_e_vaVCAM_Gd	PSI	6	11829,867	1790,259	12334,498	2033,459	10200,514	14468,482
AreaPared_e_vaVCAM_Pq	NT	4	11962,556	2139,695	12139,394	2202,766	8634,301	15644,487
AreaPared_e_vaVCAM_Pq	PSI	6	11194,841	1110,569	10935,089	1268,159	9604,238	12265,94
AreaPared_e_VCAMvasosGd	NT	4	4635,251	3174,708	4724,669	1935,456	1644,927	7804,411
AreaPared_e_VCAMvasosGd	PSI	5	4742,429	1451,98	4590,086	979,022	3374,469	5805,703
AreaPared_e_VCAMvasosPq	NT	4	3620,186	1147,836	4075,066	1396,458	1852,99	6297,142
AreaPared_e_VCAMvasosPq	PSI	5	1934,499	103,816	1941,48	317,933	1546,714	2336,246
AreaParETI_va_tot	NT	4	151123,924	82495,177	160469,133	59588,148	65651,092	255287,174
AreaParETI_va_tot	PSI	6	159915,037	53700,475	156203,978	57968,924	95369,323	217038,633
AreaParVCAM_va_tot	NT	4	144739,986	37524,216	144479,549	33202,835	91646,429	197312,669
AreaParVCAM_va_tot	PSI	6	101843,31	23394,886	104382,61	16367,447	87206,028	121559,192
diam_ETIvasosGd	PSI	6	46,557	6,207	47,398	6,253	40,835	53,961
diam_ETIvasosPq	NT	4	23,954	0,951	23,538	1,072	21,832	25,244
diam_ETIvasosPq	PSI	6	25,469	1,623	24,994	1,152	23,786	26,202
diam_ETIvasosTot	NT	4	40,637	12,886	42,184	11,378	24,078	60,29
diam_ETIvasosTot	PSI	6	34,303	3,207	34,458	3,426	30,863	38,053
diam_vaETI_Gd	NT	4	211,611	14,35	210,953	12,882	190,455	231,451
diam_vaETI_Gd	PSI	6	203,456	23,43	203,863	18,223	184,739	222,987
diam_vaETI_Pq	NT	4	115,867	12,179	115,279	9,859	99,591	130,967
diam_vaETI_Pq	PSI	6	106,739	9,212	103,901	6,584	96,992	110,81
diam_vaVCAM_Gd	NT	4	216,871	12,483	218,425	11,767	199,701	237,149
diam_vaVCAM_Gd	PSI	6	211,753	22,5	210,921	19,969	189,965	231,877
diam_vaVCAM_Pq	NT	4	120,607	7,8	122,078	11,948	103,066	141,09
diam_vaVCAM_Pq	PSI	6	118,795	9,633	114,875	23,501	90,212	139,538
diam_VCAMvasosGd	NT	4	49,844	12,795	49,641	9,206	34,993	64,289
diam_VCAMvasosGd	PSI	5	57,227	13,852	55,782	14,476	37,808	73,756
diam_VCAMvasosPq	NT	4	21,978	4,799	22,123	6,301	12,097	32,149
diam_VCAMvasosPq	PSI	5	24,394	1,611	24,234	2,432	21,214	27,254
MarcETI_vaETI_Gd	NT	4	5871,873	2539,941	5924,307	1542,883	3469,236	8379,378
MarcETI_vaETI_Gd	PSI	6	4543,525	762,677	4267,153	671,069	3562,909	4971,397
MarcETI_vaETI_Pq	NT	4	3546,692	2319,03	3748,198	1880,771	755,471	6740,925

MarcETI_vaETI_Pq	PSI	6	1725,643	973,149	2121,322	924,321	1151,307	3091,337
MarcETIvasosGd	NT	4	1422,116	160,511	1403,182	130,17	1196,052	1610,312
MarcETIvasosGd	PSI	6	1256,882	214,181	1155,463	241,481	902,045	1408,881
MarcETIvasosPq	NT	4	1326,408	395,591	1261	290,045	799,473	1722,527
MarcETIvasosPq	PSI	6	685,204	196,788	794,89	368,847	407,809	1181,971
MarcETIvasosTot	NT	4	1351,772	177,504	1313,717	203,845	989,354	1638,08
MarcETIvasosTot	PSI	6	917,652	201,619	950,108	260,574	676,652	1223,564
MarcPorParETI_va_tot	NT	4	0,39	0,103	0,374	0,101	0,214	0,534
MarcPorParETI_va_tot	PSI	6	0,295	0,046	0,289	0,053	0,234	0,344
MarcPorParVCAM_va_tot	NT	4	0,194	0,053	0,224	0,081	0,096	0,352
MarcPorParVCAM_va_tot	PSI	6	0,239	0,08	0,239	0,054	0,183	0,295
MarcRelat_vaETI_Gd	NT	4	0,449	0,045	0,437	0,06	0,341	0,533
MarcRelat_vaETI_Gd	PSI	6	0,374	0,058	0,357	0,055	0,299	0,415
MarcRelat_vaETI_Pq	NT	4	0,336	0,146	0,319	0,13	0,113	0,525
MarcRelat_vaETI_Pq	PSI	6	0,194	0,106	0,218	0,075	0,139	0,297
MarcRelat_vaVCAM_Gd	NT	4	0,211	0,072	0,258	0,107	0,088	0,428
MarcRelat_vaVCAM_Gd	PSI	6	0,289	0,03	0,28	0,029	0,25	0,31
MarcRelat_vaVCAM_Pq	NT	4	0,198	0,07	0,213	0,06	0,117	0,309
MarcRelat_vaVCAM_Pq	PSI	6	0,156	0,129	0,19	0,09	0,095	0,285
MarcRelatETIvasosGd	NT	4	0,393	0,065	0,375	0,081	0,246	0,504
MarcRelatETIvasosGd	PSI	6	0,262	0,079	0,266	0,058	0,205	0,327
MarcRelatETIvasosPq	NT	4	0,348	0,027	0,361	0,044	0,292	0,43
MarcRelatETIvasosPq	PSI	6	0,271	0,064	0,275	0,055	0,217	0,333
MarcRelatETIvasosTot	NT	4	0,365	0,075	0,364	0,065	0,26	0,468
MarcRelatETIvasosTot	PSI	6	0,27	0,055	0,27	0,054	0,213	0,327
MarcRelatVCAMvasosGd	NT	4	0,203	0,07	0,236	0,083	0,104	0,368
MarcRelatVCAMvasosGd	PSI	5	0,374	0,17	0,377	0,196	0,134	0,62
MarcRelatVCAMvasosPq	NT	4	0,23	0,075	0,251	0,073	0,134	0,368
MarcRelatVCAMvasosPq	PSI	5	0,304	0,121	0,306	0,098	0,184	0,428
MarcVCAM_vaVCAM_Gd	NT	4	2852,12	1914,488	3307,758	1864,959	340,192	6275,324
MarcVCAM_vaVCAM_Gd	PSI	6	3520,034	602,252	3451,635	668,913	2749,654	4153,616
MarcVCAM_vaVCAM_Pq	NT	4	2280,487	975,383	2545,167	1205,137	627,525	4462,809
MarcVCAM_vaVCAM_Pq	PSI	6	1714,434	718,069	2088,704	1012,253	1026,41	3150,998
MarcVCAMvasosGd	NT	4	991,785	748,269	1117,074	684,514	27,859	2206,289
MarcVCAMvasosGd	PSI	5	1477,326	1311,58	1949,647	954,261	764,775	3134,519
MarcVCAMvasosPq	NT	4	794,522	382,664	1109,649	699,841	-3,955	2223,253
MarcVCAMvasosPq	PSI	5	533,817	401,518	626,559	305,238	247,555	1005,563

Tabela dos testes de comparação de médias:

Variável	Shapiro-Wilk-NT	Shapiro-Wilk-PSI	Levene	Teste	p(dif. de médias)	significância
Area_col_periarterialCOR	0,955	0,128	0,287	t de Student	0,067758	não significativo
Area_luzCOR	0,350	0,173	0,308	t de Student	0,092098	não significativo
Area_paredeCOR	0,660	0,584	0,622	t de Student	0,093555	não significativo

Area_SeptoCOR	0,148	0,427	0,912	t de Student	0,651619	não significativo
Area_TOTALCOR	0,779	0,883	0,952	t de Student	0,017420	significativo
Area_VDCOR	0,790	0,585	0,977	t de Student	0,045116	significativo
Area_VECOR	0,916	0,314	0,013	Welch	0,100716	não significativo
ColLuzCOR	0,385	0,500	0,643	t de Student	0,968853	não significativo
ColParCOR	0,294	0,874	0,329	t de Student	0,225362	não significativo
ColVDCOR	0,175	0,035	0,624	Mann-Whitney	0,428571	não significativo
D_luzCOR	0,995	0,345	0,165	t de Student	0,055456	não significativo
LuzParCOR	0,276	0,307	0,645	t de Student	0,508281	não significativo
Variação percentual do Peso	0,053	0,718	0,464	t de Student	0,000026	significativo
Peso Final	0,038	0,993	0,449	Mann-Whitney	0,093074	não significativo
Peso Inicial	0,138	0,490	0,645	t de Student	0,171299	não significativo

Variável	Shapiro-Wilk-NT	Shapiro-Wilk-PSI	Levene	Teste	p(dif. de médias)	significância
AreaMarcETI_va_tot	0,033	0,355	0,894	Mann-Whitney	0,257143	não significativo
AreaMarcVCAM_va_tot	0,325	0,321	0,917	t de Student	0,172844	não significativo
AreaParede_ETIvasosGd	0,191	0,149	0,266	t de Student	0,503565	não significativo
AreaParede_ETIvasosPq	0,592	0,199	0,263	t de Student	0,146033	não significativo
AreaParede_ETIvasosTot	0,181	0,935	0,171	t de Student	0,608654	não significativo
AreaParede_vaETI_Gd	0,298	0,797	0,772	t de Student	0,414359	não significativo
AreaParede_vaETI_Pq	0,746	0,126	0,466	t de Student	0,087421	não significativo
AreaParede_vaVCAM_Gd	0,366	0,271	0,595	t de Student	0,421467	não significativo
AreaParede_vaVCAM_Pq	0,960	0,218	0,303	t de Student	0,299213	não significativo
AreaParede_VCAMvasosGd	0,113	0,740	0,015	Welch	0,904981	não significativo
AreaParede_VCAMvasosPq	0,235	0,682	0,186	t de Student	0,012006	significativo
AreaParETI_va_tot	0,461	0,967	0,771	t de Student	0,912974	não significativo
AreaParVCAM_va_tot	0,985	0,678	0,134	t de Student	0,032747	significativo
diam_ETIvasosGd	0,982	0,839	0,135	t de Student	0,197151	não significativo
diam_ETIvasosPq	0,100	0,108	0,713	t de Student	0,079272	não significativo
diam_ETIvasosTot	0,841	0,499	0,038	Welch	0,269768	não significativo
diam_vaETI_Gd	0,975	0,771	0,265	t de Student	0,522475	não significativo
diam_vaETI_Pq	0,886	0,084	0,338	t de Student	0,057974	não significativo
diam_vaVCAM_Gd	0,878	0,910	0,308	t de Student	0,521750	não significativo
diam_vaVCAM_Pq	0,633	0,237	0,473	t de Student	0,591554	não significativo
diam_VCAMvasosGd	0,667	0,390	0,636	t de Student	0,487490	não significativo
diam_VCAMvasosPq	0,875	0,937	0,242	t de Student	0,508434	não significativo
MarcETI_vaETI_Gd	0,108	0,262	0,014	Welch	0,117255	não significativo

MarcETI_vaETI_Pq	0,818	0,165	0,130	t de Student	0,101824	não significativo
MarcETlvasosGd	0,729	0,174	0,581	t de Student	0,100700	não significativo
MarcETlvasosPq	0,303	0,016	0,970	Mann-Whitney	0,114286	não significativo
MarcETlvasosTot	0,700	0,453	0,757	t de Student	0,047520	significativo
MarcPorParETI_va_tot	0,812	0,388	0,226	t de Student	0,116510	não significativo
MarcPorParVCAM_va_tot	0,080	0,460	0,828	t de Student	0,731802	não significativo
MarcRelat_vaETI_Gd	0,578	0,219	0,992	t de Student	0,061545	não significativo
MarcRelat_vaETI_Pq	0,859	0,285	0,288	t de Student	0,155143	não significativo
MarcRelat_vaVCAM_Gd	0,024	0,406	0,326	Mann-Whitney	0,257143	não significativo
MarcRelat_vaVCAM_Pq	0,445	0,172	0,582	t de Student	0,672384	não significativo
MarcRelatETlvasosGd	0,527	0,900	0,803	t de Student	0,037349	significativo
MarcRelatETlvasosPq	0,239	0,768	0,512	t de Student	0,032107	significativo
MarcRelatETlvasosTot	0,980	0,681	0,576	t de Student	0,037861	significativo
MarcRelatVCAMvasosGd	0,070	0,353	0,299	t de Student	0,225553	não significativo
MarcRelatVCAMvasosPq	0,397	0,920	0,549	t de Student	0,386705	não significativo
MarcVCAM_vaVCAM_Gd	0,536	0,390	0,126	t de Student	0,863828	não significativo
MarcVCAM_vaVCAM_Pq	0,559	0,189	0,803	t de Student	0,534155	não significativo
MarcVCAMvasosGd	0,730	0,329	0,651	t de Student	0,187266	não significativo
MarcVCAMvasosPq	0,010	0,374	0,648	Mann-Whitney	0,412698	não significativo