

FELIPE PEREIRA DE SOUZA

Estudo do impacto do tratamento com Roflumilaste no metabolismo de camundongos obesos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Programa: Ciências (Fisiopatologia Experimental)
Orientadora: Profa. Dra. Elia Tamasso Espin Garcia
Calzolari

São Paulo

2023

FELIPE PEREIRA DE SOUZA

Estudo do impacto do tratamento com Roflumilaste no metabolismo de camundongos obesos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Programa: Ciências (Fisiopatologia Experimental)
Orientadora: Profa. Dra. Elia Tamasso Espin Garcia
Calzolari

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Felipe Pereira de
Estudo do impacto do tratamento com Roflumilaste
no metabolismo de camundongos obesos / Felipe
Pereira de Souza. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Elia Tamaso Espin Garcia Calzolari.

Descritores: 1.Inibidores da Fosfodiesterase 4
2.Obesidade 3.Tomografia por emissão de pósitrons
4.Tecido adiposo marrom 5.Camundongo

USP/FM/DBD-278/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais, Ezilda e Inácio,
às minhas irmãs, Ana Caroline (in memoriam) e Gabriele Vitória,
família querida que fui agraciado em ter e conviver nessa existência.

Às memórias de Lurdes Guther e Miguel Pereira,
Dirce Silva e Herculano Souza,
que me apoiaram em todos os meus sonhos,
com muito carinho e amor.

Aos meus queridos amigos, carnis e espirituais,
que me deram forças para superar todas as dificuldades e
reencontrar uma luz ainda maior do que já existia em mim.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elia Tamaso Espin Garcia Calzolari, a quem tenho como um grande exemplo de vida, por sempre demonstrar tamanha competência, humanidade, carinho e respeito, principalmente, a nós, seus alunos. Muito obrigado por ter me concedido a honra de ser seu aluno, por sempre acreditar em mim e no meu potencial, por todos os ensinamentos, conselhos e, principalmente, pela sua amizade e acolhimento ao longo de todos estes anos. Saiba que tenho muito carinho e admiração pela senhora, sem a sua contribuição e dedicação, este trabalho não seria possível de ser realizado.

À Profa. Dra. Elnara Marcia Negri, por ter compartilhado sua genialidade e conhecimento conosco, permitindo o meu crescimento científico, técnico e, principalmente, humano, com sua simplicidade e bondade. Muito obrigado por ter me recebido como seu aluno e por ter contribuído com tanta dedicação para que este trabalho pudesse existir. Também a tenho como um dos grandes exemplos de minha vida, especialmente pela determinação em lutar pelos próprios sonhos.

À Profa. Dra. Nilsa Regina Damaceno Rodrigues por todo o auxílio no compartilhamento de técnicas laboratoriais, discussão de estratégias metodológicas e na execução prática do projeto. Obrigado pela paciência, dedicação e simplicidade com as quais você sempre me instruiu.

À William Marinelli de Carvalho, agradeço sua amizade e, especialmente, por ter aceitado o desafio de conduzir esse projeto junto comigo. Obrigado por todo o auxílio prático, por todas as horas de dedicação e cuidado para que a etapa experimental pudesse ocorrer. Fico extremamente feliz com todos os momentos compartilhados, especialmente por poder ter visto sua dissertação de mestrado nascer como um dos frutos deste trabalho.

À Marcelo Alves Ferreira por todo o apoio estatístico, filosófico e metodológico. Agradeço as discussões, contribuições realizadas e, especialmente, pela sua amizade.

À equipe do Laboratório de Biologia Celular (LIM-59) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), representados por Dra. Cláudia Battlehner, Sueli Bastos, Ires Amorim, Gildásio Rocha e Sandro Pinheiro, muito obrigado pela receptividade, apoio técnico, administrativo e, especialmente, pela amizade de cada um de vocês, pelos quais tenho muito carinho.

À Profa. Dra. Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira e ao técnico de laboratório, Sr. José Edson Pereira da Costa, do Lim 07, Laboratório de Gastroenterologia Clínica e Experimental, por gentilmente disponibilizar os animais utilizados neste trabalho e nos instruírem quanto às técnicas de manuseio e cuidados para com eles.

À Profa. Dra. Mariana Matera Veras e seus alunos Dunia Waked e Victor Yuji Yariwake, por cederem espaço no seu biotério e compartilharem seus conhecimentos técnicos quanto à experimentação com o modelo animal escolhido, além de nos auxiliarem na rotina de execução prática deste projeto. Sem a contribuição e dedicação de vocês esse trabalho não seria possível.

À Dra. Daniele de Paula Faria e equipe do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas FMUSP, agradeço o apoio e contribuição técnica para a execução, análise e interpretação dos resultados obtidos nos exames de Tomografia de Emissão de Póstrons.

Aos membros da banca do exame de qualificação, Profas. Dras. Lisete Ribeiro Teixeira e Maria Lucia Zaidan Dagli, agradeço pelos valiosos ensinamentos, correções e sugestões.

A todos os professores e professoras que contribuíram para minha formação até este momento, meu respeito, reconhecimento e agradecimento, especialmente às professoras doutoras Suzane Kioko Ono, que me orientou em meu mestrado; à Maria Aparecida Basile, que me acolheu nos momentos em que mais precisei e me ensinou verdadeiramente o que é humanidade e respeito à vida; Raquel Bagattini e Ana Paula de Melo Loureiro, as quais me iniciaram na carreira científica com suas supervisões e orientações; e à Profa. Regina, responsável pela minha alfabetização: sem sua dedicação e carinho nenhuma palavra contida neste trabalho seria possível de ser escrita.

À Divisão de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, representada por Valéria de Vilhena Lombardi, Erinalva da Conceição Batista e Cinthia Vieira, agradeço pelo auxílio e atenção dispensada na etapa de formatação, padronização da dissertação e emissão da ficha catalográfica.

Meu especial agradecimento à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (processo 1807376) pelo auxílio financeiro, sem o qual esse trabalho não seria possível.

*“Um dos segredos do sucesso é se recusar a deixar que
reveses temporários nos derrotem.”*

Mary Kay Ash (1918-2001)

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Anna Eleanor Roosevelt (1884-1962)

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

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Obesidade	19
1.2	Roflumilaste - Inibidor de Fosfodiesterase 4.....	21
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo primário.....	25
2.2	Objetivos secundários	25
3	MATERIAL E MÉTODO.....	26
3.1	Local	26
3.2	Aspectos Éticos	26
3.3	Modelo Experimental.....	26
3.4	Desenho Experimental	27
3.5	Obtenção do PSI e preparo para administração.....	27
3.6	Pesagem e tratamento com o PSI.....	28
3.7	Metabolômica / Tomografia de Emissão de Póstrons - PET.....	29
3.8	Análise Estatística	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Peso Corporal.....	33
4.2	Glicemia.....	37
4.3	Correlação entre variação do peso corporal e glicemia.....	38
4.4	Captção radioativa na Tomografia de Emissão de Póstrons	40
4.4.1	Comparação entre valores absolutos	40
4.4.2	Comparação entre valores relativos: fator de captção.....	44
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES.....	53
7	ANEXOS.....	54
7.1	Anexo A – Aprovação do projeto pelo CEUA	54

7.2	Anexo B – Valores Absolutos - PET - Baseline	55
7.3	Anexo C – Valores SUV - PET – Baseline.....	56
7.4	Anexo D – Valores Absolutos - PET - Pós tratamento.....	57
7.5	Anexo E – Valores SUV - PET - Pós tratamento	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

±	Mais ou menos
%	Por cento
µg	Micro gramas
=	Igual
¹⁸ F-FDG	Do inglês, <i>2-deoxy-2-[18F] fluoro-D-glucose</i>
NT	Grupo: não tratado
PSI	Grupo: tratado com PSI
ATP	Adenosina trifosfato
BAT	Do inglês, <i>brown adipose tissue</i>
BDNF	Do inglês, <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
cAMP	Do inglês, <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CL 316,243	Do inglês, <i>Disodium 5-[(2R)-2-[[[(2R)-2-(3-Chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate hydrate</i>
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
FFA	Do inglês, <i>free fatty acids</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Gramas
GLUT-1	Transportador de glicose-1
HEPA	Do inglês, <i>High Efficiency Particulate Air</i>
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IL-1	Interleucina 1
IL-1B	Interleucina 1B
IL-6	Interleucina 6
<u>kBq</u>	Kilobecquerel
kg	Kilograma
LIM-59	Laboratório de Investigação Médica 59
MBq	Mili Becquerel
mCi	Milicurie

Mg	Miligrama
mL	Militro
MP	Material particulado concentrado
NF-kB p 65	Do inglês, <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NT	Não tratado
<i>p</i>	Probabilidade calculada / aproximada
p-CREB	Do inglês, <i>cAMP response element-binding protein</i>
<i>PDE4</i>	Do inglês, <i>phosphodiesterase-4</i>
PET	Do inglês, <i>Positron Emission Tomography</i>
PET-FDG	Exame PET com a utilização do marcador FDG
PKA	Do inglês, <i>Protein Kinase A</i>
PM	Do inglês, <i>particulate matter</i>
PSI	Produto sob investigação
ROI	Do inglês, <i>regions of interest</i>
SO ₂	Dióxido de enxofre
SP	São Paulo [Estado]
SUV	Do inglês, <i>Standardized Uptake Value</i>
TLR3	Do inglês, <i>Toll-like receptor 3</i>
TLR4	Do inglês, <i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-a	Do inglês, tumor necrosis fator – a
UCP1	Do inglês, <i>uncoupling protein-1</i>
vs.	Do inglês, <i>versus</i>
WAT	Do inglês, <i>White Adipose Tissue</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do Roflumilaste e seu metabólito oxidado. Adaptado de Giembycz 2010.	22
Figura 2 - Camundongo <i>ob/ob</i>	26
Figura 3 - Esquema representativo da divisão por grupos experimentais	27
Figura 5 – Fotografia da confecção de Daxas (comprimidos revestidos de Roflumilaste 500 µg; Takeda GmbH - Oranienburg – Alemanha; Importado por AstraZeneca do Brasil Ltda) adquirida em farmácias.	28
Figura 6 - Representação do processo de administração de soluções por gavagem.....	29
Figura 7 – Processo de anestesia (Isoflurano 2-3% em oxigênio 100%) para aquisição de imagens PET.....	29
Figura 8 - Injeção endovenosa de ¹⁸ F-FDG pela veia peniana.	30
Figura 9 - Aquisição de imagens PET	31
Figura 10 – Box-plot descritivo do peso corporal inicial (em gramas) dos grupos NT e PSI.: O Teste <i>t</i> de <i>Student</i> mostra que não há diferença estatisticamente significativa.....	33
Figura 11 - Dispersão dos pesos corporais dos animais pertencentes ao grupo NT em função do tempo de estudo.	34
Figura 12 - Dispersão dos pesos corporais dos animais pertencentes ao grupo PSI em função do tempo de estudo.	35
Figura 13 – Variação de peso (em %) dos animais pertencentes ao grupo PSI. A variação zero está marcada com a linha vermelha. O Teste <i>t</i> de <i>Student</i> mostra que não há diferença estatisticamente significativa em relação à variação zero.	36
Figura 14 – Box-plot descritivo da variação de peso corporal dos grupos NT e PSI: O Teste <i>t</i> de <i>Student</i> mostra que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.	37
Figura 15 – Variação da glicemia dos camundongos <i>Ob/Ob</i> do grupo controle (NT) e tratados com Roflumilaste (PSI). A diferença entre os grupos não é estatisticamente significativa (Teste <i>t</i> de <i>Student</i>).	38

Figura 16 – Correlação entre os fatores de mudança de peso e glicemia dos animais pertencentes ao grupo NT ao final do experimento. Método comparativo: Coeficiente r de <i>Pearson</i>	39
Figura 17 - Correlação entre os fatores de mudança de peso e glicemia dos animais pertencentes ao grupo PSI ao final do experimento. Método comparativo: Coeficiente r de <i>Pearson</i>	39
Figura 18 – Box plot descritivo dos valores de captação de SUV absolutos entre o tempo inicial e final para o grupo NT. A comparação entre os tempos final e inicial é estatisticamente significativa para todas as áreas descritas na figura.	41
Figura 19 - Box plot descritivo dos valores de captação de SUV (obtidos a partir dos exames de PET) no tempo inicial e final para os animais pertencentes ao grupo PSI. Não há diferenças estatisticamente significativas entre inicial e final para nenhuma das áreas analisadas.	43
Figura 20 - Box plot descritivo dos valores de SUV no tempo inicial e final para os animais pertencentes ao grupo PSI. Versão alternativa considerando a exclusão dos dados de gordura marrom referentes ao animal PSI 5 (<i>outlier</i>). Há uma diferença significativa de SUV para área de gordura marrom (máxima e Média). Significância $p < 0,05$	44
Figura 21 - Comparação dos fatores de captação (SUV PET) após 12 semanas de tratamento dos animais pertencentes ao grupo NT versus PSI. A comparação entre os grupos é estatisticamente significativa para todas as áreas descritas na figura. Significância $p < 0,05$	45
Figura 22 - Comparação dos fatores de captação (SUV PET) após 12 semanas de tratamento dos animais pertencentes ao grupo NT versus PSI. Versão alternativa considerando a exclusão dos dados de gordura marrom referentes ao animal PSI 5 (<i>outlier</i>). A comparação entre os grupos é estatisticamente significativa para todas as áreas descritas na figura. Significância $p < 0,05$	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Medidas do peso corporal dos camundongos <i>Ob/Ob</i> do grupo controle (NT) e tratados com Roflumilaste (PSI).....	33
Tabela 2 – Medidas do índice glicêmico dos camundongos <i>Ob/Ob</i> do grupo controle (NT) e tratados com Roflumilaste (PSI).	37
Tabela 3 - Comparação dos valores absolutos de captação (SUV) entre o tempo inicial e final para o grupo NT.....	40
Tabela 4 - Comparação dos valores absolutos de captação (SUV) entre o tempo inicial e final para o grupo PSI.....	42
Tabela 5 – Análise comparativa dos fatores de captação de SUV (variação de SUV dos animais pertencentes ao grupo NT <i>versus</i> PSI.....	46

RESUMO

Souza FP. Estudo do impacto do tratamento com Roflumilaste no metabolismo de camundongos obesos [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: O Roflumilaste é um fármaco inibidor de fosfodiesterase 4 (do inglês, phosphodiesterase-4 [PDE4]), que auxilia na manutenção da atividade do mensageiro secundário de adenosina monofosfato cíclico (do inglês, cyclic adenosine monophosphate [cAMP]), diminuindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias e, desta forma, resultando em atividade anti-inflamatória. Além disso, o roflumilaste já é reconhecido como indutor do aumento do metabolismo da glicose e aumento do metabolismo basal. Tendo em vista o acima exposto, é importante investigar se o Roflumilaste pode modular a atividade inflamatória e aumentar o metabolismo basal de uma população de animais geneticamente predispostos à Síndrome Metabólica e Obesidade. Este estudo tem por objetivo estudar a influência do tratamento com Roflumilaste em camundongos obesos (ob/ob), do ponto de vista metabólico e inflamatório, descrevendo sua atuação sob a manutenção do peso corpóreo a partir da modulação do metabolismo basal e controle da inflamação sistêmica em sítios-alvo distintos. **Métodos:** Os animais foram divididos em dois grupos (n=6 por grupo), sendo um deles tratado com o Roflumilaste 1 mg/kg/dia por 12 semanas (PSI) e outro recebeu somente água (controle) (NT), administrados por gavagem. Os animais foram pesados diariamente. No tempo inicial e final foram submetidos à tomografia por emissão de pósitrons (PET) com a utilização do traçador FDG (PET-FDG) para avaliação metabólica. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R; com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) em todos os testes. **Resultados/Discussão:** Nosso estudo demonstrou o efeito anti-inflamatório *in vivo* do Roflumilaste após doze semanas de tratamento, ao impedir o ganho significativo de peso no grupo PSI, sendo esse efeito não relacionado à influência inibitória do tratamento na secreção ou ação de leptina, uma vez que os animais são knockout para leptina. A manutenção do peso corpóreo dos animais do grupo PSI, ao longo do tempo pode ter relação direta com o aumento de atividade no tecido adiposo marrom (conforme dados do PET), aliado ao consequente aumento do metabolismo basal desses animais. Além disso, a administração de Roflumilaste resultou em diminuição de captação do traçador FDG em todas regiões-alvo cerebrais, exceto Corpo Estriado Esquerdo e Bulbo Olfatório, no grupo PSI, quando comparado com o grupo controle (NT). **Considerações Finais:** É possível afirmar que o Roflumilaste tem se mostrado uma droga promissora, validando, as hipóteses elencadas durante a elaboração do projeto de pesquisa. Estudos futuros sobre seus mecanismos de ação deverão investigar a ativação de cAMP, PKA e UCP1 nesse modelo experimental, abrindo a possibilidade para a realização de futuros estudos clínicos em humanos para avaliar o provável efeito anti-inflamatório benéfico do Roflumilaste no controle do peso corpóreo na obesidade assim como também no controle de degenerações neurológicas desencadeadas por processos inflamatórios associados ao envelhecimento.

Palavras-chave: Inibidores da Fosfodiesterase 4. Obesidade. Tomografia por Emissão de Pósitrons. Tecido Adiposo Marrom. Camundongo.

ABSTRACT

Souza FP. Study of the impact of Roflumilast treatment on the metabolism of obese mice [Thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo; 2023.

Introduction: Roflumilast is a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor drug that helps maintain the activity of the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) secondary messenger, decreasing the synthesis of pro-inflammatory cytokines and thus resulting in anti-inflammatory activity. In addition, roflumilast is already recognized as an inducer of increased glucose metabolism and increased basal metabolism. In view of the above, it is important to investigate whether Roflumilast can modulate the inflammatory activity and increase the basal metabolism of a population of animals genetically predisposed to the Metabolic Syndrome and Obesity. This study aims to study the influence of treatment with Roflumilast in obese mice (ob/ob), from the metabolic and inflammatory point of view, describing its performance in the maintenance of body weight from the modulation of basal metabolism and control of systemic inflammation in different target sites.

Methods: The animals were divided into two groups (n=6 per group), one of which was treated with Roflumilast 1 mg/kg/day for 12 weeks (PSI) and the other received only water (control) (NT), administered by gavage. The animals were weighed daily. At the initial and final time, they were submitted to positron emission tomography (PET) with the use of the FDG tracer (PET-FDG) for metabolic evaluation. All statistical analyzes were performed using the R software; with a significance level of 5% ($p < 0.05$) in all tests.

Results / Discussion: Our study demonstrated the in vivo anti-inflammatory effect of Roflumilast after twelve weeks of treatment, by preventing significant weight gain in the PSI group, and this effect is not related to the inhibitory influence of the treatment on leptin secretion or action, since the animals are knockout for leptin. The maintenance of the body weight of the animals in the PSI group, over time, may be directly related to the increase in activity in the brown adipose tissue (according to PET data), together with the consequent increase in the basal metabolism of these animals. Furthermore, administration of Roflumilast resulted in decreased FDG tracer uptake in all brain target regions, except the Left Corpus Striatum and Olfactory Bulb, in the PSI group when compared to the control group (NT). **Final Considerations:** It is possible to affirm that Roflumilast has shown to be a promising drug, validating the hypotheses listed during the elaboration of the research project. Future studies on its mechanisms of action should investigate the activation of cAMP, PKA and UCP1 in this experimental model, opening the possibility for future clinical studies in humans to evaluate the probable beneficial anti-inflammatory effect of Roflumilast in controlling body weight in obesity as well as in the control of neurological degeneration triggered by inflammatory processes associated with aging.

Keywords: Phosphodiesterase 4 inhibitors. Obesity. Positron emission tomography. Brown adipose tissue. Mice.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade

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, acometendo cerca de 2 bilhões de indivíduos (aproximadamente 30% da população global) (CABALLERO, 2019; MOLLMANN; KAHLES; LEBHERZ; KAPPEL *et al.*, 2017).

A obesidade é o contraponto da desnutrição, e hoje há mais pessoas obesas do que abaixo do peso em todas as regiões, exceto na África Subsaariana e na Ásia. Antes considerados um problema apenas em países de alta renda, o sobrepeso e a obesidade estão aumentando drasticamente em países de baixa e média renda, particularmente nos centros urbanos. A maioria das crianças com sobrepeso ou obesas vive em países em desenvolvimento, onde a taxa de aumento foi 30% maior do que em países desenvolvidos (DANQUAH *et al.*, 2019)

A obesidade é caracterizada principalmente pelo excesso de distribuição de gordura visceral, acompanhada por severas alterações hormonais, inflamatórias e vasculares, que, por sua vez, estimulam uma série de outros mecanismos como o aumento da resistência à insulina, estimulação do sistema renina-angiotensina e sistema nervoso simpático, comprometimento no controle cardiovascular baro e quimiorreflexo, disfunção endotelial, aumento na retenção de sódio, aumento de pressão arterial, entre outros mecanismos, que contribuem para o desenvolvimento de comorbidades associadas à obesidade, como diabetes mellitus tipo 2, esteatose hepática, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, dislipidemia, hipertensão, problemas da vesícula biliar, osteoartrite, apneia do sono e outros problemas respiratórios e certos tipos de câncer (endométrio, mama, ovário, próstata, fígado, vesícula biliar, rim e cólon), resultando em aumento do risco de mortalidade em função das comorbidades relacionadas (MAYORAL; ANDRADE; MAYORAL; HUERTA *et al.*, 2020; SERAVALLE; GRASSI, 2017).

A obesidade na infância está associada a uma ampla gama de complicações graves de saúde e a um risco aumentado de aparecimento prematuro de doenças relacionadas. Estudos descobriram que, sem intervenção, crianças e adolescentes com obesidade provavelmente continuarão obesos na idade adulta (WEIHRAUCH-BLUHER, WIEGAND, 2018; MORALES, et al. 2019; GRANT-GUIMARAES, et al. 2016).

A obesidade é classificada, principalmente, pelo índice de massa corporal (IMC) (calculado pela equação peso [em kg] dividido pelo quadrado da altura [em metros] [kg/m²]), quando este se encontra superior à 30. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a obesidade é dividida em: grau I (moderado excesso de peso) com IMC entre 30 e 34,99; grau II (obesidade leve ou moderada) com IMC entre 35 e 39,99; e grau III (obesidade mórbida), com IMC acima de 40 (PICHÉ; POIRIER; LEMIEUX; DESPRÉS, 2018).

As taxas de sobrepeso e obesidade continuam a crescer em adultos e crianças. De 1975 a 2016, a prevalência de crianças e adolescentes com sobrepeso ou obesidade de 5 a 19 anos aumentou mais de quatro vezes, de 4% para 18% em todo o mundo (HALES, et al. 2017). Avaliando-se o IMC em adultos com o sobrepeso (IMC>25), nas últimas décadas, houve o aumento do IMC tanto em homens quanto em mulheres: partindo de 28,8% (homens) e 29,8% (mulheres) em 1980; para 36,9% (homens) e 38% (mulheres) em 2013; o que impacta diretamente em políticas públicas e no aumento significativo de custos para a prevenção e tratamento dessas condições (SERAVALLE; GRASSI, 2017).

Muitas das causas de sobrepeso e obesidade são evitáveis e reversíveis. No entanto, nenhum país ainda conseguiu reverter o crescimento dessa epidemia. Embora outros fatores estejam envolvidos, a causa fundamental da obesidade é um desequilíbrio entre as calorias consumidas e as calorias gastas. Como as dietas globais mudaram nas últimas décadas, houve um aumento no consumo de alimentos ricos em calorias, ricos em gorduras e açúcares livres. Aliado a isso, também houve uma diminuição na atividade física devido aos novos padrões de trabalho, especialmente os realizados em escritórios, mais acesso ao transporte e aumento da urbanização (SERAVALLE; GRASSI, 2017).

Em 2012, a Associação Europeia para o Estudo de Obesidade e a Sociedade Europeia de Hipertensão publicaram diretrizes para o manejo da obesidade, focando na atuação em três etapas:

Primeiro, intervenção e mudança no estilo de vida, buscando a redução de peso corpóreo por vias não farmacológicas, incluindo aumentar a porção diária de frutas, verduras, legumes, grãos integrais e nozes e praticar atividade física regular (60 minutos por dia para crianças e 150 minutos por semana para adultos). Para bebês, incentivar a amamentação até no mínimo 6 meses de idade (SERAVALLE; GRASSI, 2017).

Segundo, intervenção em regime de dieta, incluindo a realização de dietas restritivas em calorias, macronutrientes e alimentos específicos, especialmente os ricos em gorduras e açúcares. (SERAVALLE; GRASSI, 2017; BALES, PORTER, 2018; CHAO, QUIGLEY, WADDEN, 2021).

Terceiro, intervenção com o uso de drogas (via farmacológica). Contudo, atualmente, apenas algumas poucas opções farmacológicas encontram-se aprovadas para uso: orlistate, sibutramina, rimonabanto, fentermina e topiramato, indicando a relevância da realização de estudos com novos fármacos, que originem resultados com potencial para auxiliar no manejo desta doença, especialmente pelo fato das drogas atuais serem associadas à ocorrência de diversos efeitos adversos ao longo do uso do medicamento, diminuindo a aderência ao tratamento. (SERAVALLE; GRASSI, 2017; BAYS, 2004).

1.2 Roflumilaste - Inibidor de Fosfodiesterase 4

Trata-se de uma benzamida (3-cyclopropylmethoxy-4-difluoromethoxy-N-[3,5-dichloropyrid-4-yl]-benzamide) rapidamente metabolizada por meio de reações de fase I (citocromo P450) e de fase II (conjugação) no organismo animal, dando origem ao seu metabólito N-óxido (Figura 1) que aparece no plasma humano em concentrações dez vezes maiores que a molécula não oxidada. Assim, o N-óxido de Roflumilaste é considerado o principal contribuinte para o total da atividade anti-inflamatória, in vivo (RABE, 2011).

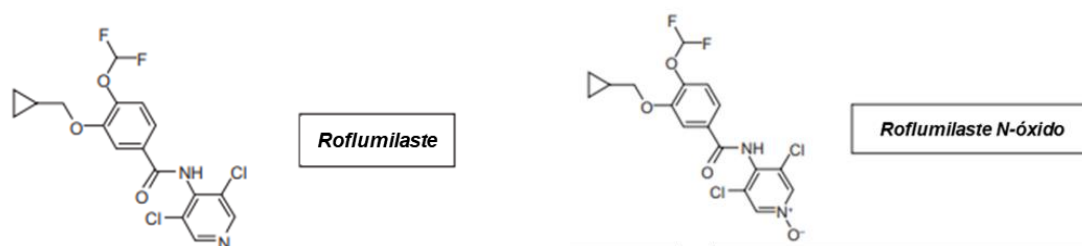


Figura 1 – Estrutura química do Roflumilaste e seu metabólito oxidado. Adaptado de Giembycz 2010 (GIEMBYCZ; FIELD, 2010).

As fosfodiesterases (do inglês, phosphodiesterase, PDEs) são uma grande família de enzimas cujo principal papel é hidrolisar o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e monofosfato guanosina cíclico (GMPc), ambos conhecidos mensageiros secundários envolvidos em vias intracelulares de transdução de sinal. Assim sendo, as PDEs possuem uma contribuição crítica na função celular por meio do ajuste dos níveis de AMPc e GMPc. Conseqüentemente, a grande família PDE tem sido um alvo multipotencial atraente para pesquisadores. Sendo um grupo enorme de enzimas, as PDEs consistem em 11 famílias que abrigam mais de 40 isoformas de isoenzimas (PDE1 a PDE11) cujas diferenças são baseadas em especificidades e afinidades de substratos, propriedades cinéticas, distribuições teciduais e subcelulares e mecanismos regulatórios. Algumas são específicas para hidrolisar AMPc (como as PDE4, PDE7 e PDE8), outras para GMPc (como PDE5, PDE6 e PDE9), enquanto outras ainda podem atuar tanto sobre o AMPc e como no GMPc (PDE1, PDE2, PDE3 e PDE11) (RABE 2011).

As fosfodiesterase-4 (PDE4) constituem uma família de enzimas sintetizadas por quatro genes: PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D (GIEMBYCZ; FIELD, 2010). São cerca de 20 variantes de PDE4 presentes principalmente no cérebro, mas também no sistema cardiovascular, músculo liso e células inflamatórias. A PDE4 está envolvida nos mecanismos de desempenho da memória e na fisiopatologia da depressão, sendo que a inibição da PDE4 pode reduzir significativamente a neuroinflamação (GURNEY et al., 2015). A PDE4 participa da modulação da sinalização simpática nas células miocárdicas e no músculo liso da árvore respiratória, modula a permeabilidade vascular e estimula as respostas inflamatórias (FERTIG; BAILLIE, 2018).

A inibição da PDE4 conduz a elevados níveis intracelulares de AMPc e melhora as disfunções dos leucócitos, das células musculares lisas vasculares das vias aéreas e pulmonares, das células epiteliais endoteliais e das vias respiratórias, bem como dos fibroblastos relacionadas à DPOC (SALVATOR et al., 2000). Após a estimulação *in vitro* de neutrófilos, monócitos, macrófagos ou linfócitos humanos, o Roflumilaste e o N-óxido de Roflumilaste suprimem a liberação de mediadores inflamatórios, como por exemplo, leucotrieno B₄, espécies reativas ao oxigênio, fator de necrose tumoral alfa, gama interferona e granzima B (HATZELMANN et al., 2010).

Com base neste mecanismo, Roflumilaste suprimiu, em estudos com animais, a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas e espécies reativas de oxigênio) das células e tecidos pulmonares *in vitro* e *in vivo*. Em complemento, Roflumilaste inibiu a infiltração de leucócitos (particularmente de neutrófilos) nos pulmões dos animais do estudo. Roflumilaste também reduziu a destruição do parênquima pulmonar induzida pelo fumo e preveniu o remodelamento fibrótico e vascular do pulmão em modelos animais *in vivo*. Estimulou a atividade ciliar brônquica *in vitro* e inibiu a formação de MUC5AC, uma mucina formadora de gel derivada das células caliciformes, em células epiteliais das vias respiratórias em humanos e em experimentos animais (GIEMBYCZ; FIELD, 2010; MOLLMANN et al., 2017).

Estes efeitos se aplicam, ainda, ao N-óxido de Roflumilaste. Os respectivos dados *in vitro* e *in vivo* dão suporte à sua potência inibitória de PDE4. Em pacientes com DPOC, Roflumilaste reduziu os neutrófilos do escarro e atenuou o influxo de neutrófilos e eosinófilos nas vias aéreas de voluntários saudáveis com provocação por endotoxinas. Em resumo, Roflumilaste apresenta propriedades anti-inflamatórias, imunomodulatórias e broncodilatadoras (GIEMBYCZ; FIELD, 2010; MOLLMANN et al., 2017).

Drogas como o roflumilaste, por inibirem a ação da PDE4, mantêm a atividade do cAMP, diminuindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias, resultando em atividade anti-inflamatória (GIEMBYCZ; FIELD, 2010; MOLLMANN et al., 2017).

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 (metabolismo basal) (MOLLMANN et al., 2017).

A atividade do AMPc 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 (BETZ; ENERBACK, 2018);

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 (HARMS; SEALE, 2013).

Assim sendo, é possível que o aumento do consumo energético (metabolismo basal) originado pela ação do Roflumilaste, mediado pela ativação da via AMPc e consequente ativação de UCP1, aliado à redução de resistência à insulina, resulte em perda de peso corpóreo. Além disso, os efeitos anti-inflamatórios do Roflumilaste podem contribuir para o manejo do quadro de síndrome metabólica relacionado à obesidade.

Desta forma, o presente estudo apresenta a hipótese de que o Roflumilaste pode modular a atividade inflamatória e aumentar o metabolismo basal de uma população de animais geneticamente predispostos à Síndrome Metabólica e Obesidade, contribuindo para a redução do peso corpóreo e da inflamação sistêmica destes animais, reproduzindo uma situação de vida real em condições controladas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do tratamento com Roflumilaste em camundongos ob/ob, do ponto de vista metabólico e inflamatório, descrevendo sua atuação sob a manutenção do peso corpóreo a partir da modulação do metabolismo basal e controle da inflamação sistêmica em sítios-alvo distintos.

2.2 Objetivos secundários

- Avaliar a variação do peso corpóreo de camundongos ob/ob tratados com roflumilaste, comparando-os com animais não tratados.
- Avaliar o efeito da administração de roflumilaste em camundongos ob/ob sobre a distribuição e ativação metabólica da gordura marrom a partir da captação de FDG no exame de tomografia de emissão de pósitrons (PET); comparando os resultados com animais não tratados.
- Avaliar o efeito anti-inflamatório da administração de roflumilaste em camundongos ob/ob sobre o sistema nervoso central a partir da captação de FDG no exame de tomografia de emissão de pósitrons (PET), comparando os resultados com animais não tratados.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular (LIM-59) do Departamento de Fisiopatologia Experimental, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.2 Aspectos Éticos

O protocolo de pesquisa nº 1376/2019, intitulado “Estudo do impacto do tratamento com Roflumilaste no metabolismo de camundongos obesos”, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo no dia 23 de outubro de 2019 (Anexo A).

3.3 Modelo Experimental

Para o estudo foram utilizados doze camundongos *ob/ob* (Figura 2), machos, com 8 semanas de idade, cedidos pelo Departamento de Gastroenterologia Clínica e Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



Figura 2 - Camundongo *ob/ob*

Os animais foram alimentados com ração padrão (NUVILAB) e água fornecida *ad libitum* durante todo o seguimento do protocolo de pesquisa.

Os animais 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.

3.4 Desenho Experimental

O desenho experimental deste estudo foi desenvolvido a partir da combinação das seguintes variáveis experimentais: tratamento com o produto sob investigação (PSI) ou não (NT).

Os animais foram divididos em 2 grupos, sendo 6 animais por grupo. Uma representação esquemática do protocolo esta apresentada na figura 3:

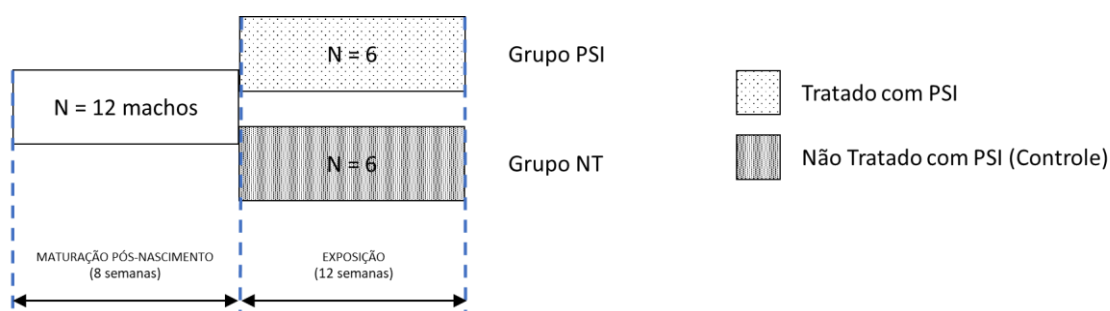


Figura 3 - Esquema representativo da divisão por grupos experimentais

- **Grupo PSI:** Animais tratados com o PSI;
- **Grupo NT:** Animais não tratados com o PSI – grupo controle.

3.5 Obtenção do PSI e preparo para administração

O PSI foi obtido em redes de farmácias privadas, em sua apresentação comercial denominada *Daxas* (comprimidos revestidos de Roflumilaste 500 µg - com indicação para uso oral – Figura 4), fabricado por *Takeda GmbH* - Oranienburg – Alemanha; e importado por *AstraZeneca do Brasil Ltda.* – Cotia - SP.



Figura 4 – Fotografia da confecção de Daxas (comprimidos revestidos de Roflumilaste 500 µg; Takeda GmbH - Oranienburg – Alemanha; Importado por AstraZeneca do Brasil Ltda) adquirida em farmácias.

Cada comprimido do PSI foi processado individualmente, até que se tornasse pó. Todo o conteúdo de cada comprimido foi ressuspenso em 1 mL de água de consumo dos animais, resultando em uma solução padrão do PSI na concentração de 500 µg/mL.

3.6 Pesagem e tratamento com o PSI

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 PSI a ser administrada.

De acordo com o peso diário do animal, foram administrados (por gavagem – Figura 5) volumes da solução padrão de PSI até que fosse atingida a dosagem de 1 mg/kg/dia. Para os animais não tratados, foram administrados, também por gavagem, volumes equivalentes de água de consumo. Esta dose baseou-se em estudos prévios 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 se atingir níveis sanguíneos terapeuticamente relevantes e equivalentes à dose de 500 µg diárias em humanos (BARSIG; LEUNG; BUNDSCHUH; WOLLIN *et al.*, 2001; KUMAR; HERBERT; THOMAS; WOLLIN *et al.*, 2003).

Os animais foram tratados diariamente durante 12 semanas (84 dias).



Figura 5 - Representação do processo de administração de soluções por gavagem

3.7 Metabolômica / Tomografia de Emissão de Pósitrons - PET

No tempo zero do estudo (antes do início do tratamento com o PSI) e no tempo final do estudo (após as 12 semanas de tratamento com o PSI) os animais foram submetidos a análises metabolômicas por meio de Tomografia de Emissão de Pósitrons - PET (do inglês, *Positron Emission Tomography*).

As imagens PET com o radiofármaco traçador ^{18}F -FDG ($n=x/\text{grupo}$) foram adquiridas em um equipamento específico para pequenos animais (Triumph® II Trimodality System Gamma Medica Ideas) localizado no Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do HC-FMUSP. Durante todos os procedimentos os animais foram anestesiados (isoflurano 2-3% em oxigênio 100%), figura 6.



Figura 6 – Processo de anestesia (Isoflurano 2-3% em oxigênio 100%) para aquisição de imagens PET.

Os animais foram mantidos em jejum por 2 horas. Após este período, 1 mg/Kg do agonista beta-adrenérgico CL 316,243 foi administrado por via endovenosa para ativação da gordura marrom. Após 30 minutos, foi administrada uma injeção endovenosa, na veia peniana, do traçador ^{18}F -FDG a 1 mCi (37 MBq).

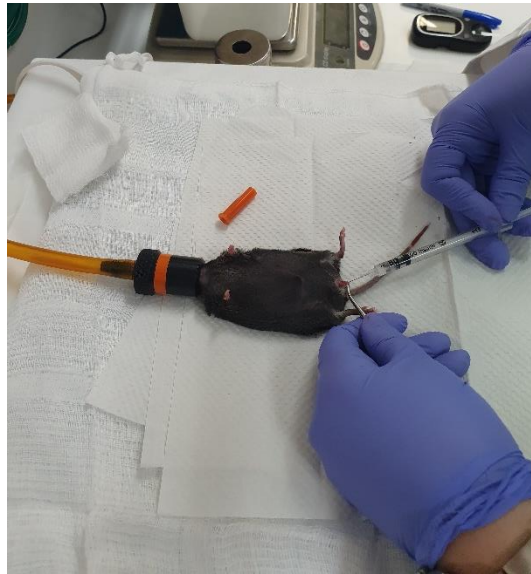


Figura 7 - Injeção endovenosa de ^{18}F -FDG pela veia peniana.

A aquisição das imagens (figura 8) foi iniciada 45 minutos após a administração do ^{18}F -FDG, e cada aquisição teve uma duração de 30 minutos. As áreas de interesse (gordura marrom e encéfalo) foram posicionadas no centro do campo de visão do equipamento PET.

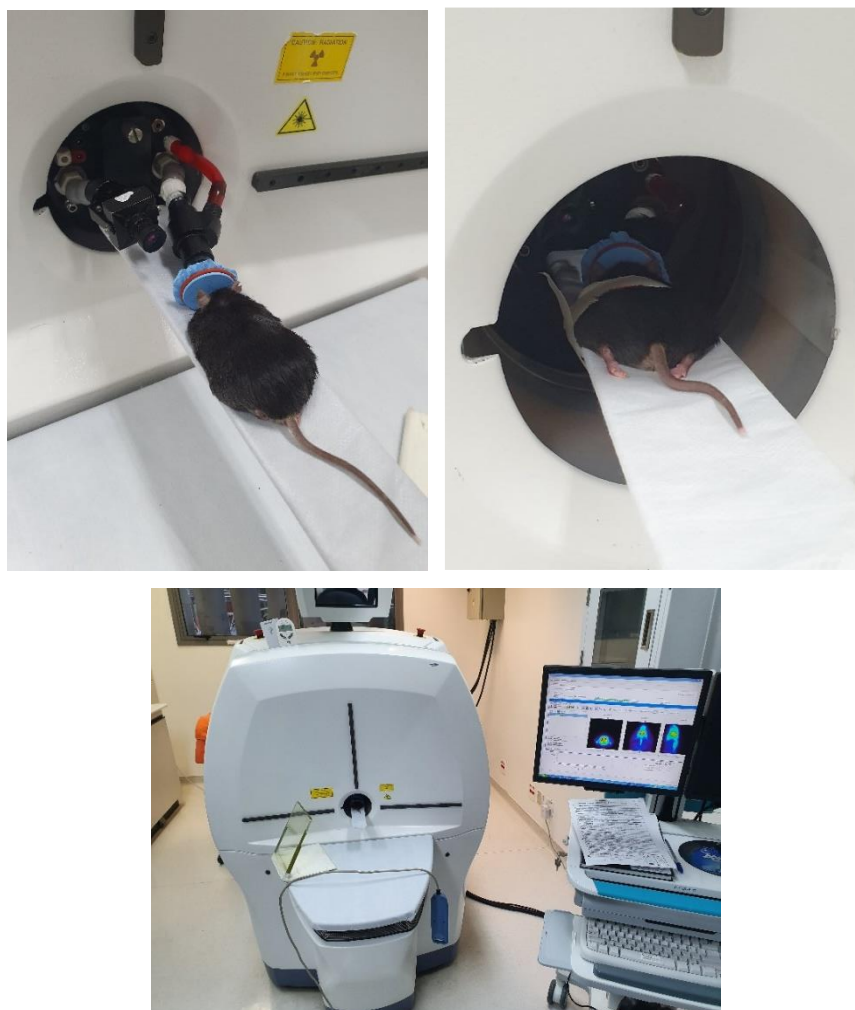


Figura 8 - Aquisição de imagens PET

As imagens foram reconstruídas com algoritmo OSEM 3D, 20 interações e 4 subgrupos. As imagens PET foram analisadas no software PMOD™. Regiões de interesse (ROIs) incluindo a gordura marrom foram desenhadas manualmente. Para análise do cérebro, um mapa de ressonância magnética disponível no software foi utilizado como referência anatômica e as ROIs foram delimitadas automaticamente com o uso de um atlas, também disponível no software.

Resultados foram apresentados em SUV (valor padronizado de captação, do inglês, *Standardized Uptake Value*), calculado como a concentração de radioatividade do tecido, em um determinado tempo, dividida pela razão entre dose injetada e peso corporal:

$$\text{SUV} = \frac{\text{Concentração radioativa (kBq/cc)}}{\text{Dose Injetada (kBq)} / \text{Peso do animal (g)}}$$

3.8 Análise Estatística

O perfil da amostra foi descrito por estatísticas descritivas com valores de média, desvio padrão e mediana.

Os dados contínuos foram avaliados pelo Teste de *Shapiro-Wilk* para aferição da normalidade de sua distribuição e pelo Teste de *Levene* para aferição da homogeneidade de variâncias, quando necessário.

As comparações das variáveis em função das categorias experimentais foram feitas pelo Teste do *t* de *Student* (original ou com a modificação de *Welch*) ou pelo Teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*, conforme os tipos de distribuição dos dados.

A avaliação de correlação entre as variáveis foi feita pelos testes de *Pearson* ou *Spearman*, conforme a normalidade ou não normalidade da distribuição dos dados.

Foram calculados fatores de mudança das medidas de peso, de glicemia e das quantificações oriundas das análises de PET. Esses fatores resultaram da divisão dos valores finais (pós-tratamento ou por tempo equivalente) pelos valores iniciais.

No caso da variação do peso, em que havia disponibilidade de valores intermediários no tempo, a evolução dessa variável foi descrita (de modo apenas exploratório) por modelos lineares simples ou por modelos não lineares polinomiais de segunda ordem. Essa descrição exploratória demonstrou que o cálculo do fator de mudança refletia uma medida de tendência consistente na quase totalidade dos indivíduos.

Todas as análises foram realizadas utilizando o *software R - Platform for Statistical Computing* versão 4.0.2 (2020-06-22) -- "*Taking Off Again*"⁸⁶.

O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$) em todos os testes.

4 RESULTADOS

4.1 Peso Corporal

Os dados iniciais e finais, bem como a variação de peso corpóreo dos animais de ambos os grupos, assim como o resultado da análise estatística (valor de p) para esse parâmetro estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Medidas do peso corporal dos camundongos *Ob/Ob* do grupo controle (NT) e tratados com Roflumilaste (PSI).

	Peso Inicial (g) (Média ± DP)	Peso Final (g) (Média ± DP)	Variação (%)		p -valor Inicial vs. Final
			(Média ± DP)	IC 95%	
NT	46,09 ±6,01	55,96 ±5,85	21,8 ±5,83	(15,68 ; 27,92)	0,0054
PSI	50,23 ±3,35	51,29 ±2,97	2,18 ±3,06	(-1,03 ; 5,39)	0,1453
p -valor NT vs. PSI	0,1796	0,1220	0,0001	0,0001	

DP: desvio padrão; IC: Intervalo de Confiança

Ao início do estudo não houve diferença estatisticamente significativa no peso entre o grupo PSI e o grupo NT [$p=0,1796$] (Figura 9).

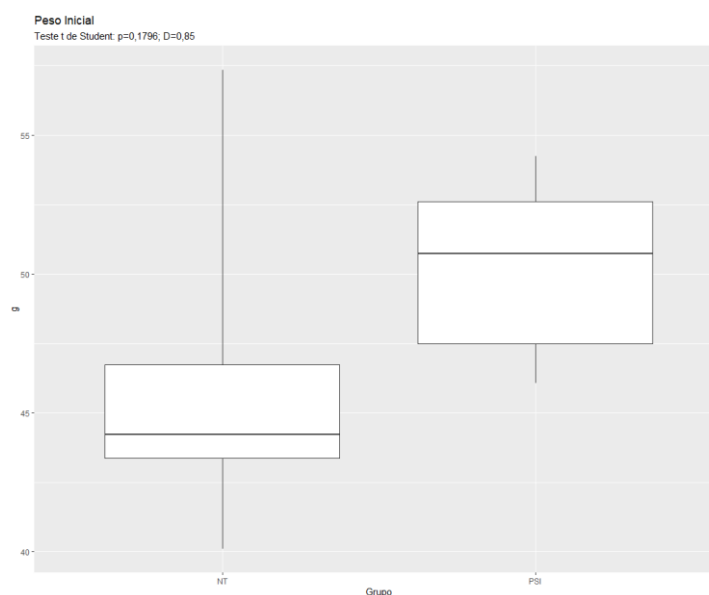


Figura 9 – Box-plot descritivo do peso corporal inicial (em gramas) dos grupos NT e PSI.: O Teste t de Student mostra que não há diferença estatisticamente significativa.

Ao analisar a dispersão dos pesos dos animais ao longo das 12 semanas, observou-se que ambos os grupos possuem tendência ao ganho (aumento) de peso; contudo, os animais do grupo NT apresentam padrão não linear (polinomial) de ganho de peso (Figura 10), enquanto os animais pertencentes ao grupo PSI apresentam padrão linear de ganho de peso (Figura 11).

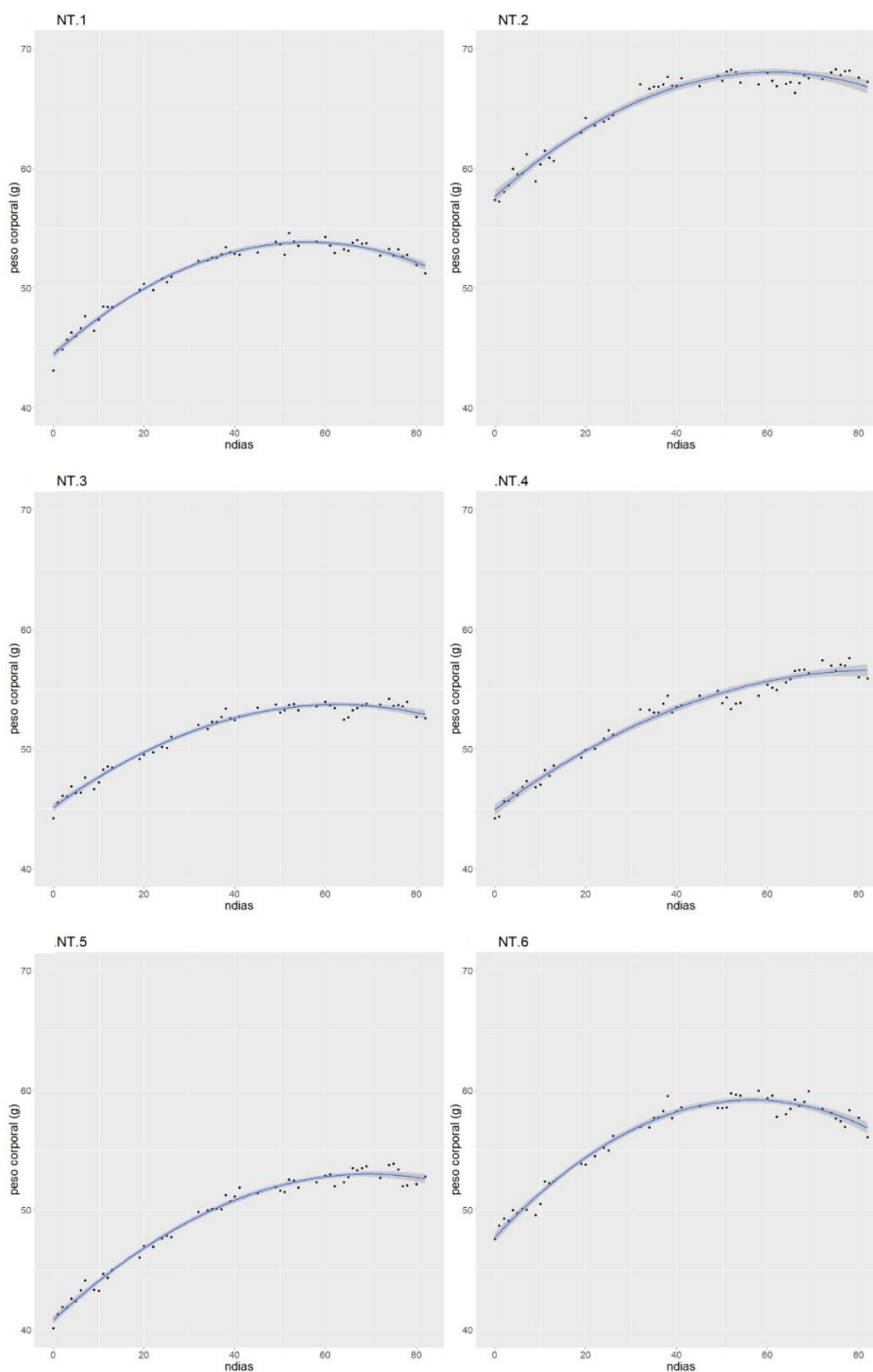


Figura 10 - Dispersão dos pesos corporais dos animais pertencentes ao grupo NT em função do tempo de estudo.

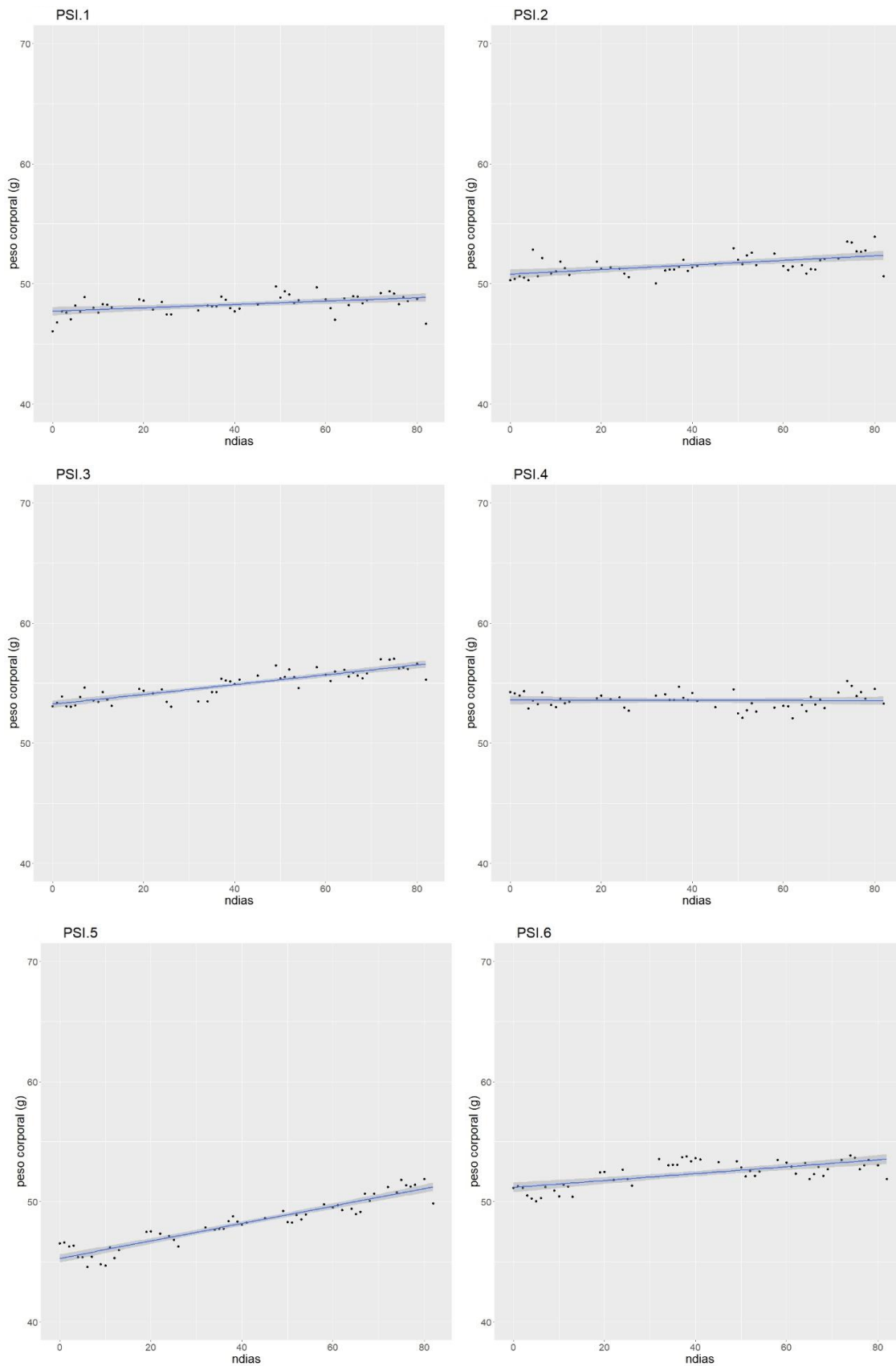


Figura 11 - Dispersão dos pesos corporais dos animais pertencentes ao grupo PSI em função do tempo de estudo.

A variação média de peso corporal entre o tempo inicial e final foi de 21,80% para o grupo NT e 2,18% para o grupo PSI (Tabela 1).

Embora ambos os grupos tenham a tendência ao ganho (aumento) de peso corporal (conforme demonstrado nas figuras 10 e 11), a variação média de peso corporal do grupo PSI (2,18%) não foi significativa ($p=0,1418$) quando comparada, pelo Teste t de *Student*, ao valor zero de variação (situação em que não haveria variação alguma de peso); esta comparação está ilustrada na Figura 12.

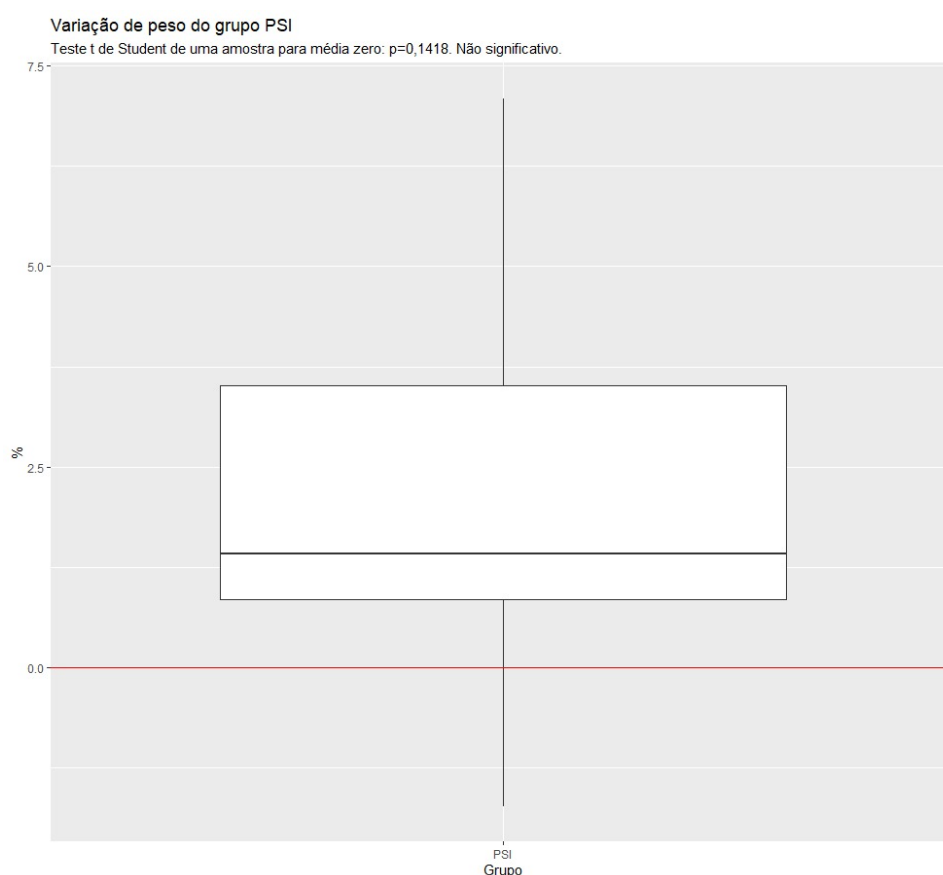


Figura 12 – Varição de peso (em %) dos animais pertencentes ao grupo PSI. A variação zero está marcada com a linha vermelha. O Teste t de *Student* mostra que não há diferença estatisticamente significativa em relação à variação zero.

Ao comparar as variações médias de peso corporal (em %) dos animais pertencentes ao grupo NT *versus* PSI (21,8% *vs.* 2,18%), observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,00002616$), sendo o ganho relativo de peso corporal maior nos animais não tratados (NT) (Figura 13).

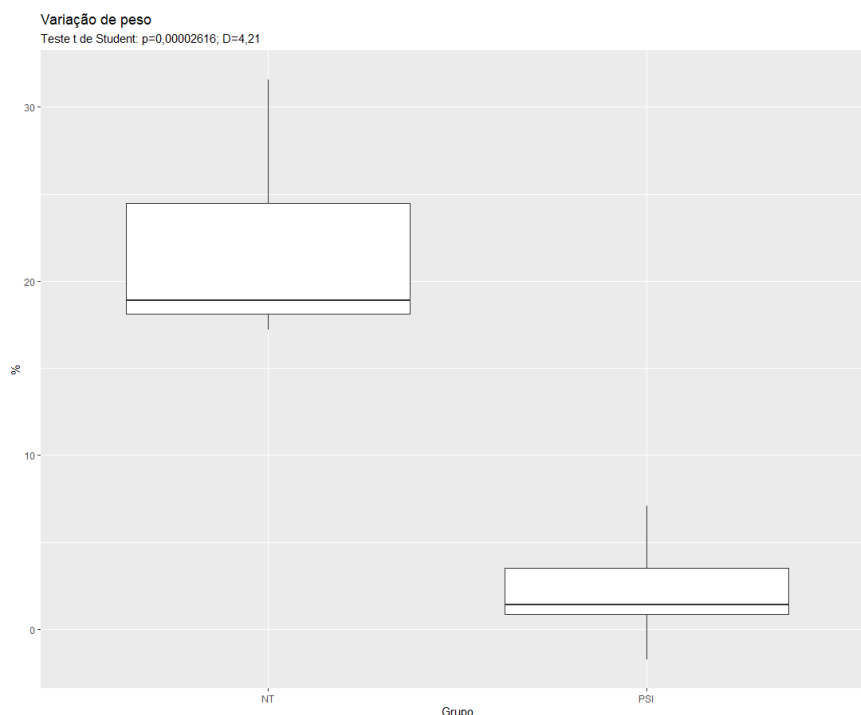


Figura 13 – Box-plot descritivo da variação de peso corporal dos grupos NT e PSI: O Teste *t* de Student mostra que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.2 Glicemia

Ao comparar a variação dos índices glicêmicos entre os grupos, não se observaram diferenças estatisticamente significativas, $p=0,2397$. Contudo, observou-se tendência à diminuição dos valores em ambos os grupos (NT = -29,64%; PSI = -14,01%) (Tabela 2 e Figura 14).

Tabela 2 – Medidas do índice glicêmico dos camundongos Ob/Ob do grupo controle (NT) e tratados com Roflumilaste (PSI).

	Glicemia Inicial (g) (Média ± DP)	Glicemia Final (g) (Média ± DP)	Variação (%)		<i>p</i> -valor Inicial vs. Final
			(Média ± DP)	IC 95%	
NT	344,33 ±55,61	235,67 ±55,69	-29,64 ±20,83	(51,51; -7,78)	0,0242
PSI	217,67 ±43,48	181,5 ±29,79	-14,01 ±22,46	(-37,58; 9,57)	0,1453
<i>p</i> -valor NT vs. PSI	0,0015	0,0620	0,2397	0,2397	

DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança

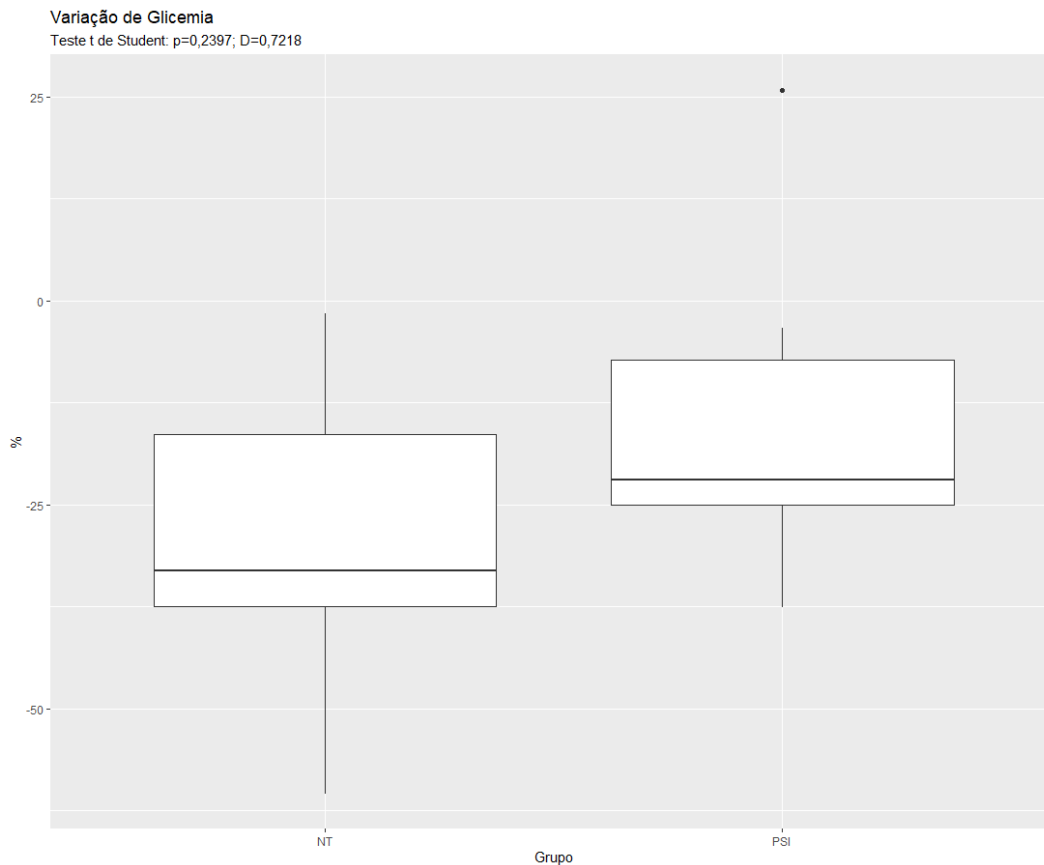


Figura 14 – Variação da glicemia dos camundongos *Ob/Ob* do grupo controle (NT) e tratados com Roflumilaste (PSI). A diferença entre os grupos não é estatisticamente significativa (Teste *t* de Student).

4.3 Correlação entre variação do peso corporal e glicemia

Em ambos os grupos, não se observaram correlações entre os fatores de mudança de peso e os fatores de mudança de glicemia (Grupo NT: Coeficiente *r* de Pearson = 0,1676, $p=0,7074$ / Grupo PSI: Coeficiente *r* de Pearson = 0,1419, $p=0,7886$) (Figuras 15 e 16).

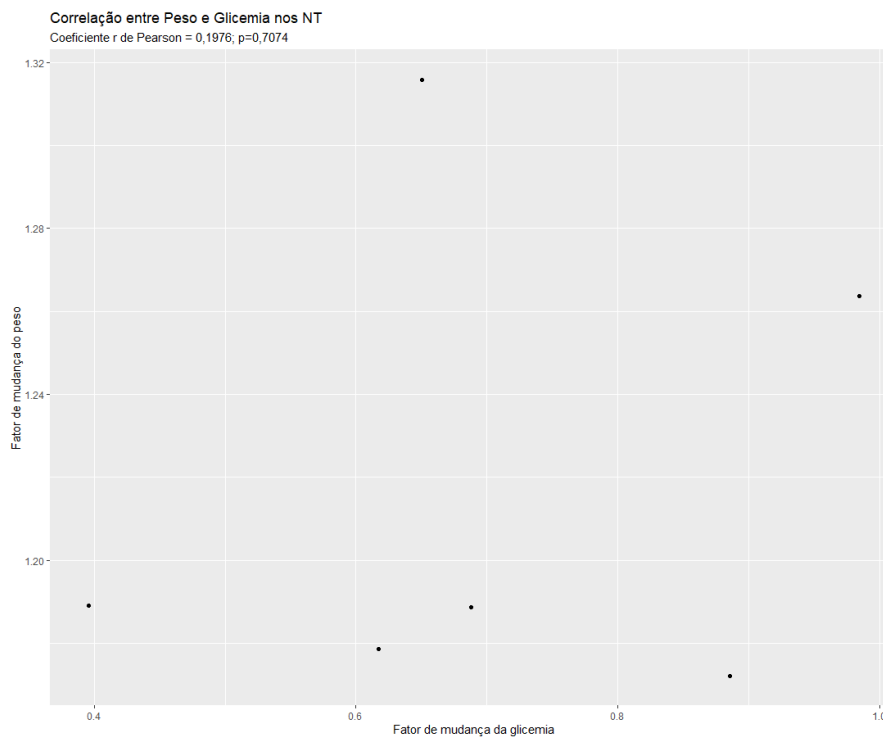


Figura 15 – Correlação entre os fatores de mudança de peso e glicemia dos animais pertencentes ao grupo NT ao final do experimento. Método comparativo: Coeficiente r de *Pearson*.

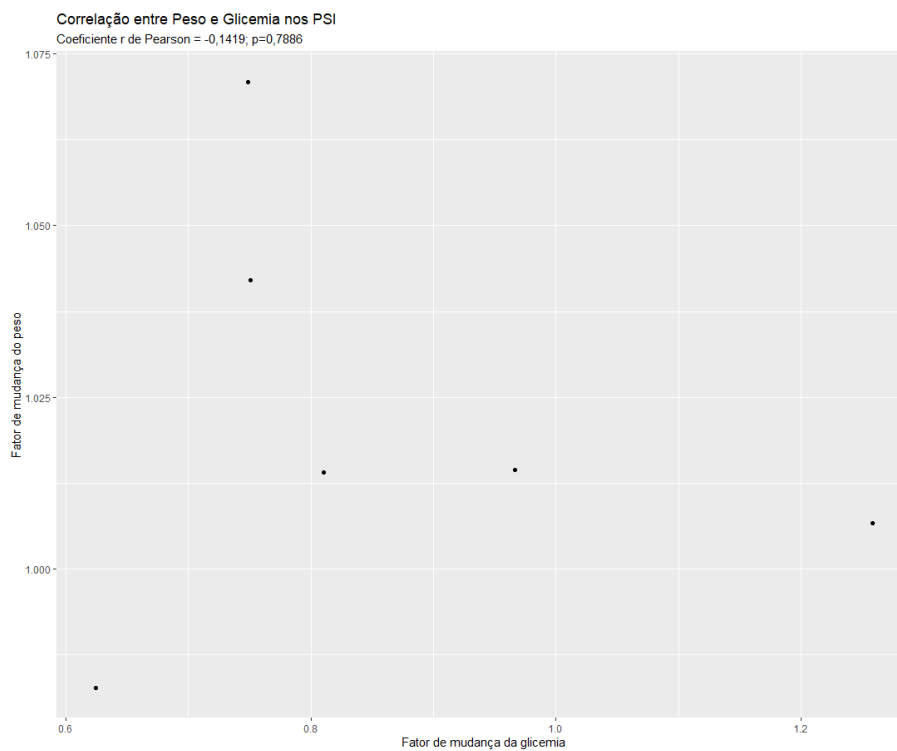


Figura 16 - Correlação entre os fatores de mudança de peso e glicemia dos animais pertencentes ao grupo PSI ao final do experimento. Método comparativo: Coeficiente r de *Pearson*.

4.4 Captação radioativa na Tomografia de Emissão de Pósitrons

4.4.1 Comparação entre valores absolutos

Ao comparar os valores padronizado de captação (SUV) absolutos gerados pelo PET observou-se que no grupo NT houve um aumento significativo na captação de SUV para todas as regiões cerebrais, exceto Corpo Estriado Esquerdo após 12 semanas. A captação também foi maior na Gordura Marrom (Tabela 3 e Figura 17).

Tabela 3 - Comparação dos valores absolutos de captação (SUV) entre o tempo inicial e final para o grupo NT

Grupo	Variável	Normalidade (Inicial)	Normalidade (Final)	Teste Escolhido	p válido	Significância
NT	Amígdala Direita	0,1725	0,9665	t Student	0,0014	**
	Amígdala Esquerda	0,0065	0,8955	Wilcoxon	0,0313	*
	Bulbo Olfatório	0,0170	0,7549	Wilcoxon	0,0313	*
	Cerebelo	0,4428	0,9549	t Student	0,0029	**
	Cinza Central	0,0191	0,2714	Wilcoxon	0,0313	*
	Colículo Inferior Direito	0,0406	0,6134	Wilcoxon	0,0313	*
	Colículo Inferior Esquerdo	0,0057	0,9996	Wilcoxon	0,0313	*
	Colículo Superior	0,0584	0,8398	t Student	0,0032	**
	Corpo Estriado Direito	0,1079	0,7551	t Student	0,0130	*
	Corpo Estriado Esquerdo	0,0111	0,9164	Wilcoxon	0,0625	N.S.
	Córtex	0,0031	0,5853	Wilcoxon	0,0313	*
	Gordura Marrom Máximo	0,9962	0,7560	t Student	0,0083	**
	Gordura Marrom Média	0,4648	0,3829	t Student	0,0048	**
	Grupo	0,0144	0,5763	Wilcoxon	0,0313	*
	Hipocampo Direito	0,1492	0,7224	t Student	0,0003	**
	Hipocampo Esquerdo	0,0026	0,1438	Wilcoxon	0,0313	*
	Hipotálamo	0,3538	0,2889	t Student	0,0017	**
	Mesencéfalo Direito	0,8275	0,2288	t Student	0,0003	***
	Mesencéfalo Esquerdo	0,0139	0,3499	Wilcoxon	0,0313	*
	Septo Prosencefalo Basal	0,0228	0,0972	Wilcoxon	0,0313	*
Tálamo	0,1357	0,9319	t Student	0,0022	**	
Tronco Cerebral	0,0320	0,8637	Wilcoxon	0,0313	*	

Nota: Significâncias - N.S. = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

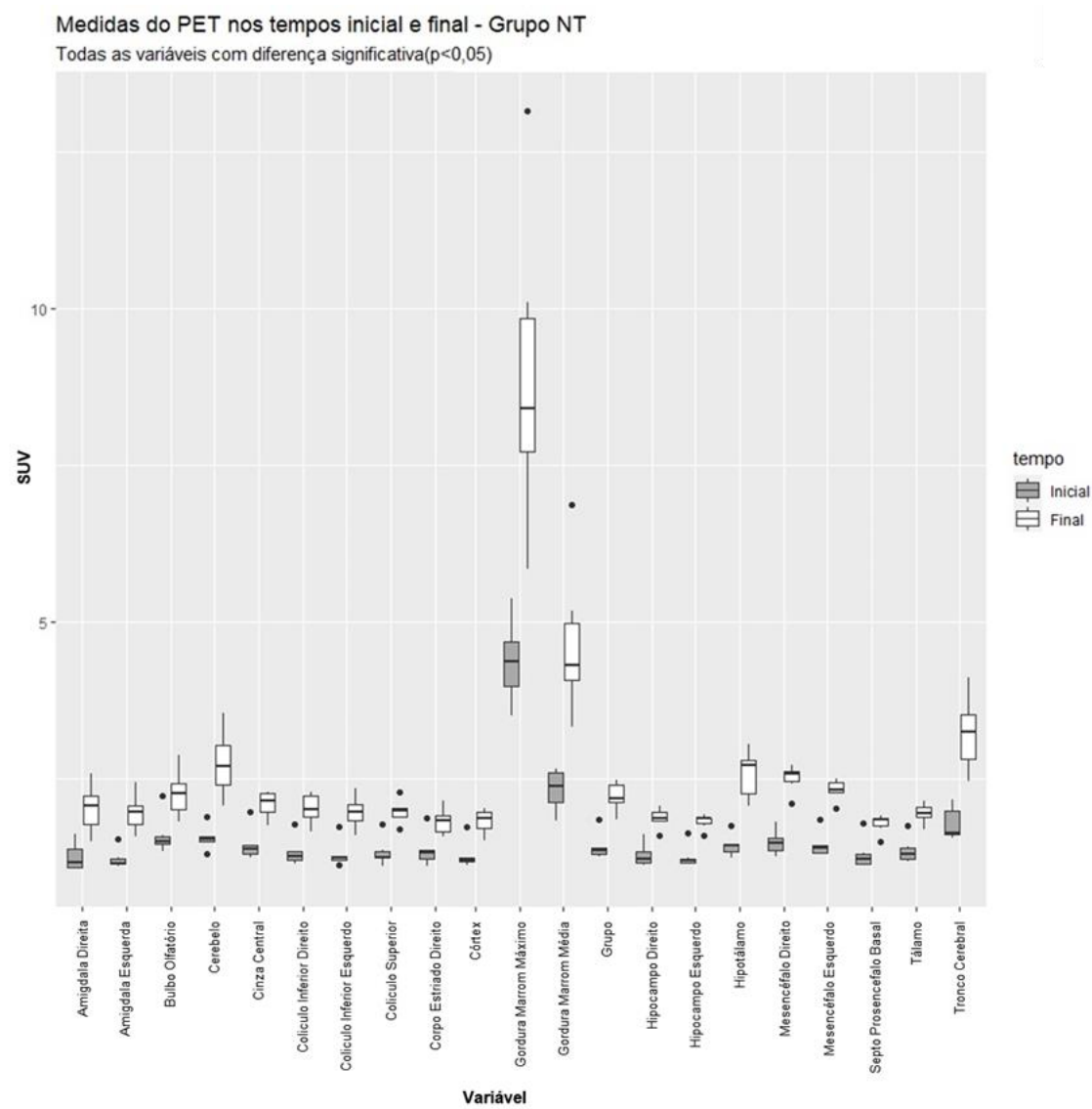


Figura 17 – Box plot descritivo dos valores de captação de SUV absolutos entre o tempo inicial e final para o grupo NT. A comparação entre os tempos final e inicial é estatisticamente significativa para todas as áreas descritas na figura.

Por sua vez, a comparação entre os valores iniciais e finais de SUV para o grupo PSI não apresentou diferença significativa para nenhuma região-alvo (Figura 18 e Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação dos valores absolutos de captação (SUV) entre o tempo inicial e final para o grupo PSI.

Grupo	Variável	Normalidade (Inicial)	Normalidade (Final)	Teste Escolhido	p válido	Significância
PSI	Amígdala Direita	0,2345	0,9991	t Student	0,8173	N.S.
	Amígdala Esquerda	0,9188	0,4175	t Student	0,5821	N.S.
	Bulbo Olfatório	0,3660	0,2798	t Student	0,2144	N.S.
	Cerebelo	0,5228	0,7896	t Student	0,5532	N.S.
	Cinza Central	0,5861	0,6786	t Student	0,0676	N.S.
	Colículo Inferior Direito	0,2214	0,8392	t Student	0,1856	N.S.
	Colículo Inferior Esquerdo	0,9981	0,2224	t Student	0,0979	N.S.
	Colículo Superior	0,2441	0,7198	t Student	0,0803	N.S.
	Corpo Estriado Direito	0,1268	0,4624	t Student	0,8388	N.S.
	Corpo Estriado Esquerdo	0,3004	0,5391	t Student	0,5680	N.S.
	Córtex	0,2227	0,6276	t Student	0,9740	N.S.
	Gordura Marrom Máximo	0,7916	0,6412	t Student	0,0953	N.S.
	Gordura Marrom Média	0,3070	0,4830	t Student	0,1189	N.S.
	Grupo	0,9573	0,8652	t Student	0,7923	N.S.
	Hipocampo Direito	0,2219	0,9403	t Student	0,6049	N.S.
	Hipocampo Esquerdo	0,0660	0,3398	t Student	0,4058	N.S.
	Hipotálamo	0,5300	0,5974	t Student	0,2578	N.S.
	Mesencéfalo Direito	0,4773	0,4633	t Student	0,6800	N.S.
	Mesencéfalo Esquerdo	0,6310	0,7339	t Student	0,4499	N.S.
	Septo Prosencefalo Basal	0,0449	0,1566	Wilcoxon	0,8438	N.S.
Tálamo	0,0931	0,1755	t Student	0,3882	N.S.	
Tronco Cerebral	0,2775	0,0454	Wilcoxon	0,3125	N.S.	

Nota: Significâncias - N.S. = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

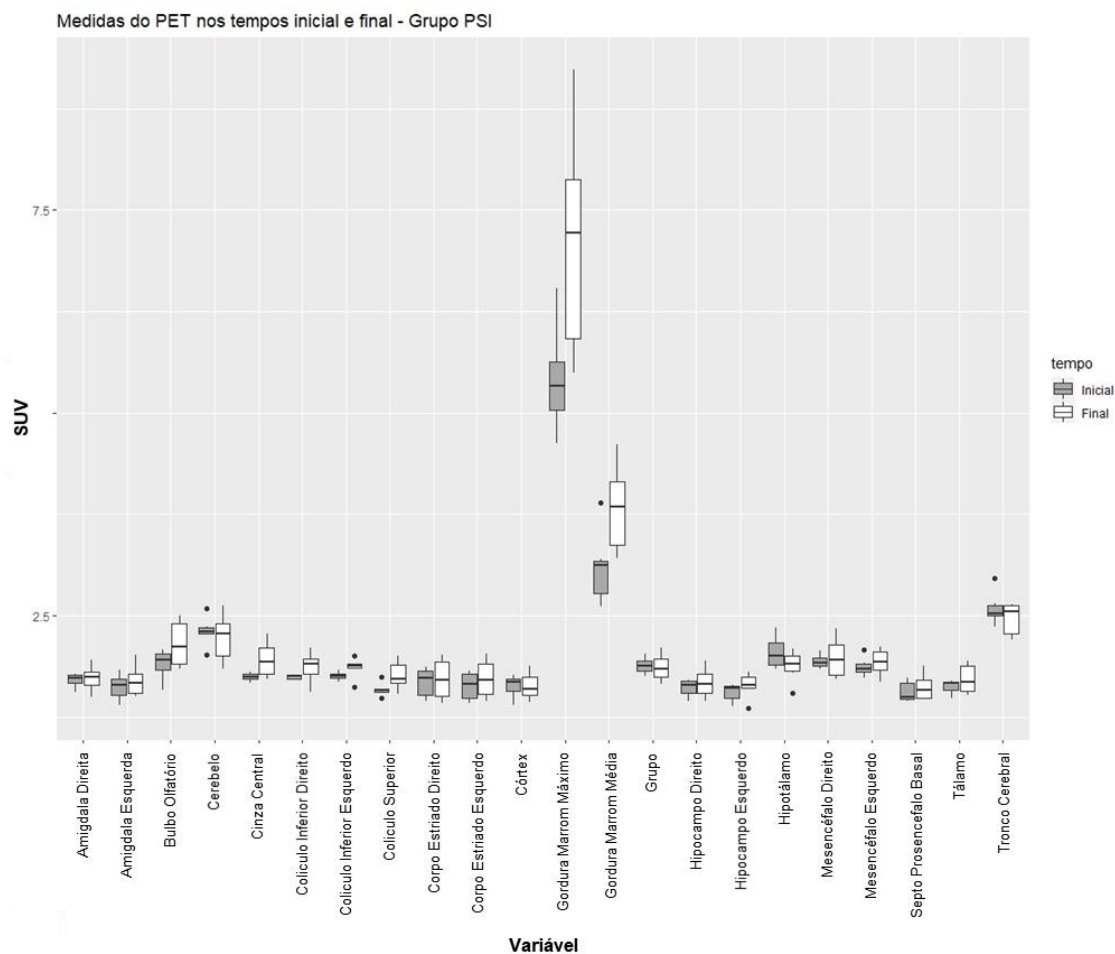


Figura 18 - Box plot descritivo dos valores de captação de SUV (obtidos a partir dos exames de PET) no tempo inicial e final para os animais pertencentes ao grupo PSI. Não há diferenças estatisticamente significativas entre inicial e final para nenhuma das áreas analisadas.

Contudo, identificamos um animal (PSI 5) que apresentava dados *outliers* para gordura marrom. Ao excluir os dados referentes a este animal e refazer a análise estatística, observou-se diferença estatisticamente significativa para as regiões referentes à gordura marrom (Média: $p = 0,0048$; e Máxima: $p = 0,0083$) (Figura 19).

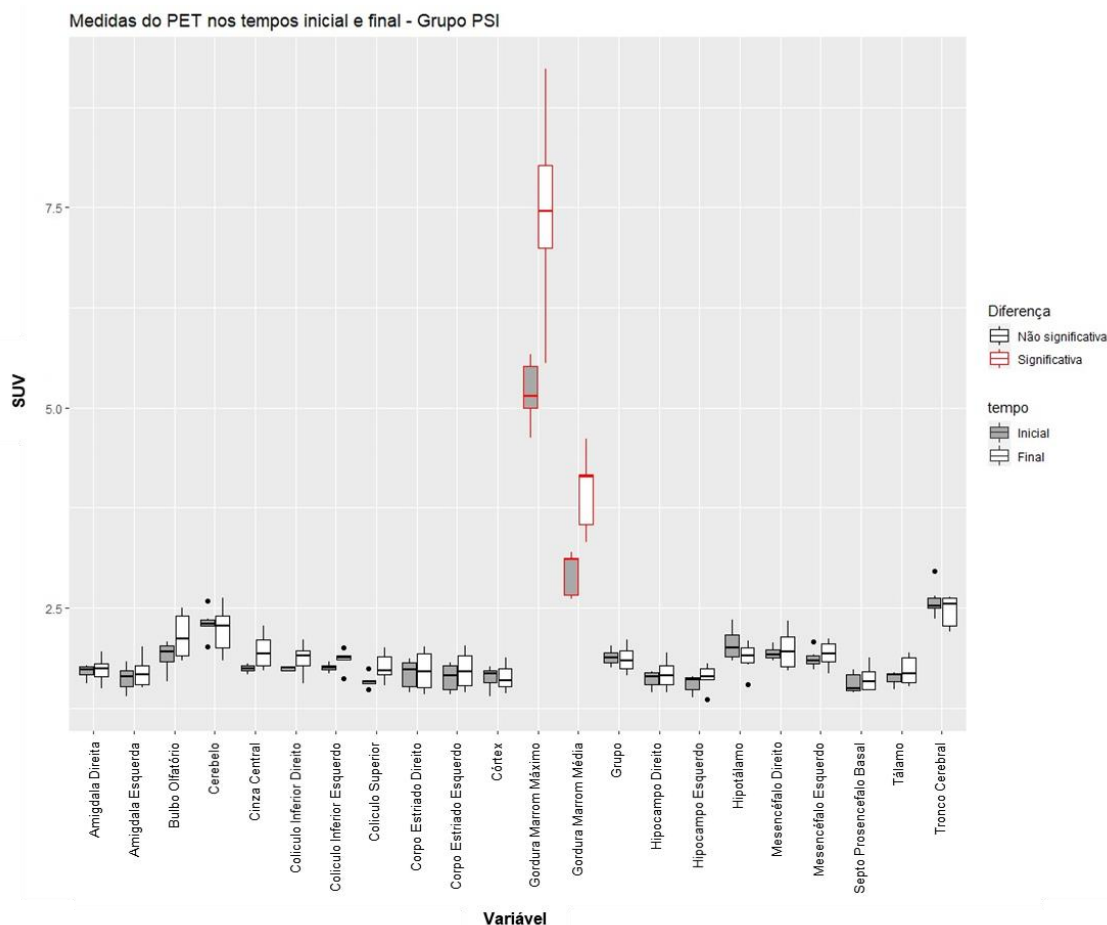


Figura 19 - Box plot descritivo dos valores de SUV no tempo inicial e final para os animais pertencentes ao grupo PSI. Versão alternativa considerando a exclusão dos dados de gordura marrom referentes ao animal PSI 5 (*outlier*). Há uma diferença significativa de SUV para área de gordura marrom (máxima e Média). Significância $p < 0,05$.

4.4.2 Comparação entre valores relativos: fator de captação

O fator de captação foi calculado pela relação entre o valor absoluto de captação final e inicial para cada área analisada. A comparação do grupo NT *versus* PSI mostrou que o fator de captação do grupo NT é maior para as diversas regiões-alvo do exame PET, exceto para Corpo Estriado Esquerdo e o Bulbo Olfatório, que não apresentaram significância na diferença dos fatores de captação entre os grupos. O fator de captação também foi maior na Gordura Marrom (Média e Máxima) nos animais do grupo NT ao final de 12 semanas (Tabela 5 e Figura 20).

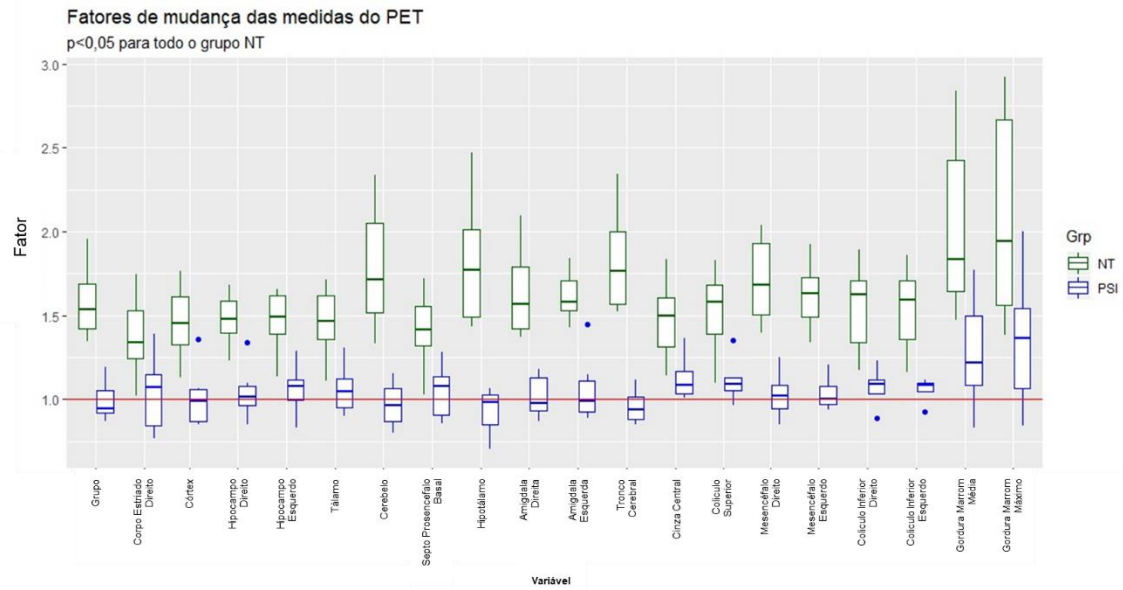


Figura 20 - Comparação dos fatores de captação (SUV PET) após 12 semanas de tratamento dos animais pertencentes ao grupo NT versus PSI. A comparação entre os grupos é estatisticamente significativa para todas as áreas descritas na figura. Significância $p < 0,05$.

Tabela 5 – Análise comparativa dos fatores de captação de SUV (variação de SUV dos animais pertencentes ao grupo NT *versus* PSI)

Variável	Grupo NT			Grupo PSI			Teste Escolhido	p válido	Significância
	Fator	Desvio Padrão	Normalidade	Fator	Desvio Padrão	Normalidade			
Grupo	1,5811	0,2283	0,5890	0,9902	0,1239	0,3021	<i>t Student</i>	0,0002	***
Corpo Estriado Direito	1,3743	0,2585	0,9626	1,0393	0,2378	0,6212	<i>t Student</i>	0,0417	*
Corpo Estriado Esquerdo	1,3464	0,2310	0,9318	1,0727	0,2276	0,3500	<i>t Student</i>	0,0656	N.S.
Córtex	1,4568	0,232	0,9681	1,0148	0,1906	0,2276	<i>t Student</i>	0,0048	**
Hipocampo Direito	1,4760	0,1630	0,9789	1,0428	0,1671	0,5676	<i>t Student</i>	0,0011	**
Hipocampo Esquerdo	1,4645	0,1950	0,4719	1,0616	0,1534	0,9646	<i>t Student</i>	0,0026	**
Tálamo	1,4580	0,2219	0,8662	1,0597	0,1494	0,7059	<i>t Student</i>	0,0045	**
Cerebelo	1,7857	0,3874	0,7421	0,9685	0,1366	0,8601	<i>t Student</i>	0,0006	***
Septo Prosencefalo Basal	1,4111	0,2424	0,9335	1,0482	0,1666	0,5133	<i>t Student</i>	0,0129	*
Hipotálamo	1,8236	0,4052	0,3620	0,9287	0,1425	0,2972	<i>t Student</i>	0,0020	**
Amígdala Direita	1,6403	0,2845	0,4011	1,0167	0,13021	0,2597	<i>t Student</i>	0,0006	***
Amígdala Esquerda	1,6151	0,1532	0,7682	1,0597	0,2099	0,1210	<i>t Student</i>	0,0004	***
Tronco Cerebral	1,8289	0,3245	0,3666	0,9571	0,1040	0,4051	<i>t Student</i>	0,0008	***
Cinza Central	1,4764	0,2506	0,9666	1,1243	0,1348	0,2500	<i>t Student</i>	0,0127	*
Colículo Superior	1,5214	0,2648	0,8119	1,1118	0,1302	0,3688	<i>t Student</i>	0,0068	**
Bulbo Olfatório	1,4538	0,3088	0,3341	1,1482	0,2540	0,3506	<i>t Student</i>	0,0908	N.S.
Mesencéfalo Direito	1,7085	0,2689	0,3996	1,0268	0,1401	0,9115	<i>t Student</i>	0,0007	***
Mesencéfalo Esquerdo	1,6212	0,2094	0,9219	1,0347	0,1011	0,3222	<i>t Student</i>	0,0001	***
Colículo Inferior Direito	1,5485	0,2783	0,5651	1,0724	0,1151	0,8473	<i>t Student</i>	0,0031	**
Colículo Inferior Esquerdo	1,5388	0,2693	0,5869	1,0576	0,0697	0,0605	<i>t Student</i>	0,0017	**
Gordura Marrom Média	2,0306	0,5546	0,2958	1,2764	0,3433	0,9330	<i>t Student</i>	0,0178	*
Gordura Marrom Máximo	2,0878	0,6780	0,1738	1,3552	0,4184	0,9047	<i>t Student</i>	0,0480	*

Nota: Significâncias - N.S. = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Ao se realizar a comparação da variação dos fatores de captação de SUV do grupo NT *versus* PSI para as regiões referentes à gordura marrom, considerando-se a exclusão dos dados do animal *outlier* (PSI 5), observou-se que, ainda assim, há diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a Gordura Marrom Média (2,0306 vs. 1,3663, $p = 0,0400$), contudo, não há diferença estatisticamente significativa para Gordura Marrom Máxima (2,0878 vs. 1,4581, $p = 0,0980$) (Figura 21).

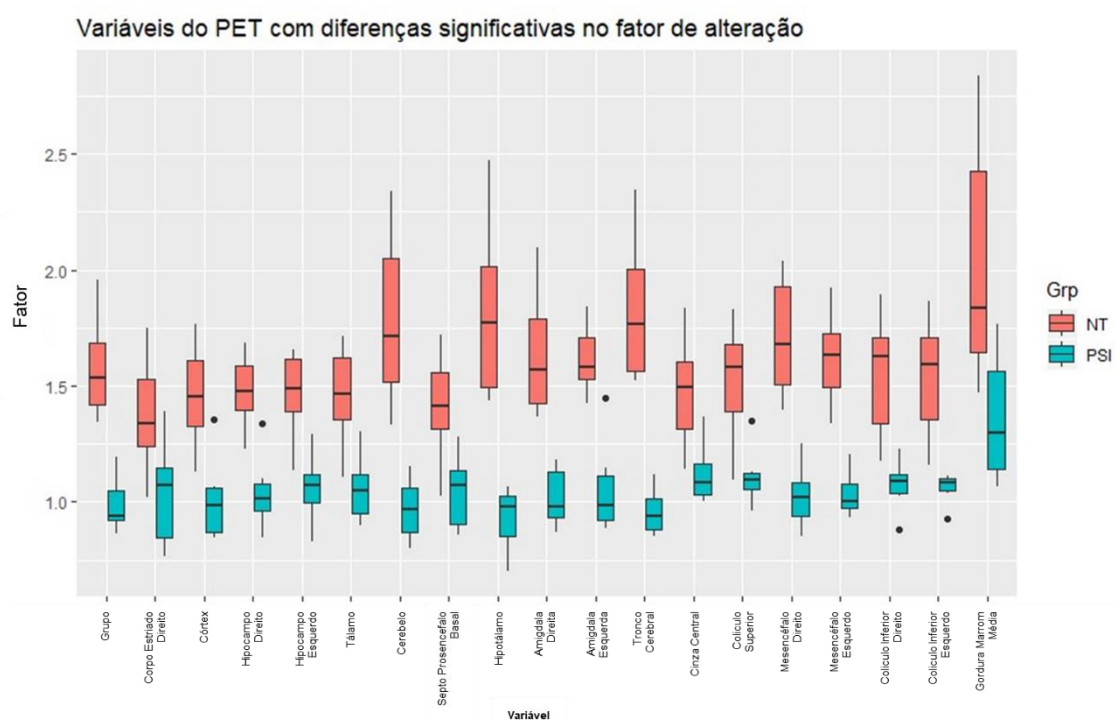


Figura 21 - Comparação dos fatores de captação (SUV PET) após 12 semanas de tratamento dos animais pertencentes ao grupo NT *versus* PSI. Versão alternativa considerando a exclusão dos dados de gordura marrom referentes ao animal PSI 5 (*outlier*). A comparação entre os grupos é estatisticamente significativa para todas as áreas descritas na figura. Significância $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo resultou em três achados principais: prevenção do ganho significativo de peso no grupo tratado (PSI); aumento significativo na atividade metabólica do tecido adiposo marrom (conforme dados do PET) no grupo tratado, quando excluídos os dados do animal outlier; e prevenção do aumento significativo de captação do traçador ^{18}F -FDG em todas regiões-alvo cerebrais, exceto Corpo Estriado Esquerdo, submetidas ao exame de PET no grupo tratado com Roflumilaste, quando comparado ao grupo controle.

Demonstramos que o uso do Roflumilaste impediu que os animais apresentassem ganho significativo de peso ao longo do período de acompanhamento do estudo (12 semanas), ao contrário do grupo não tratado, que apresentou cerca de 21,8% de ganho relativo de peso no mesmo intervalo.

É possível inferir que a ação inibitória de ganho de peso pelo Roflumilaste não é relacionada à alteração na secreção ou na ação nas vias de saciedade reguladas pela leptina, uma vez que o modelo animal escolhido é deficiente na produção e secreção deste hormônio (*knockout Lep^{ob/ob}*) (HURLEY; MORAN, 2020).

Assim como demonstrado por Mollmann e colaboradores (MOLLMANN; KAHLES; LEBHERZ; KAPPEL *et al.*, 2017) e Vollert e colaboradores (VOLLERT; KAESSNER; HEUSER; HANAUER *et al.*, 2012), observamos que a administração de Roflumilaste leva à redução dos índices glicêmicos, indicando melhora no metabolismo da glicose e diminuição na resistência periférica à insulina, que, alinhado ao efeito anti-inflamatório sistêmico desencadeado pelo medicamento, poderia contribuir para a manutenção do peso dos animais tratados.

Mesmo que os animais tratados tenham apresentado manutenção do peso corpóreo, foi possível observar pelo PET que a área de captação de gordura marrom teve aumento significativo ao final do tratamento com Roflumilaste por 12 semanas, quando excluídos os dados do animal *outlier* (PSI 5). A gordura marrom (tecido adiposo marrom, do inglês, *Brown Adipose Tissue [BAT]*) é um tecido oxidativo especializado em dissipar energia na forma de calor, mantendo a temperatura corporal quando o organismo é exposto a intempéries,

como mudanças climáticas em seu ambiente. Ao contrário do tecido adiposo branco (do inglês, *White Adipose Tissue [WAT]*) o BAT expressa a proteína desacopladora 1 (do inglês, *Uncoupling protein 1 [UCP1]*, também conhecida como termogenina), permitindo o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial e da termogênese. A exposição ao frio induz a capacidade oxidativa e termogênica do BAT, por meio da ativação do SNS e da estimulação adrenérgica da produção de cAMP, que, por sua vez, ativa imediatamente o PKA (do inglês, *Protein Kinase A*), levando ao aumento da lipólise e ativação da UCP1. Em uma resposta adaptativa à exposição prolongada ao frio, o cAMP também contribui para o aumento dos níveis de UCP1, biogênese mitocondrial e expansão da massa de BAT (CYPESS; DOYLE; SASS; HUANG *et al.*, 2013; FRANKL; SHERWOOD; CLEGG; SCHERER *et al.*, 2019; LIU; WANG; LIN, 2019; RAVNSKJAER; MADIRAJU; MONTMINY, 2016; REVERTE-SALISA; SANYAL; PFEIFER, 2019; ZHANG; HAO; SHAO; NHAM *et al.*, 2018).

Uma vez que o Roflumilaste tem sido amplamente descrito na literatura como um inibidor de PDE4 com consequente ação na expressão de cAMP, inibindo sua hidrólise e ativando sua expressão em diversos tecidos (FENG; WANG; HE; WU *et al.*, 2019; FIMIA; SASSONE-CORSI, 2001; GIEMBYCZ; FIELD, 2010; MARTORANA; BEUME; LUCATTELLI; WOLLIN *et al.*, 2005; MOLLMANN; KAHLES; LEBHERZ; KAPPEL *et al.*, 2017; VOLLERT; KAESSNER; HEUSER; HANAUER *et al.*, 2012; ZHANG; CHEN; FAN; YE *et al.*, 2018), é possível inferir, a partir de nossos achados e de suas correlações com os dados existentes na literatura, que a manutenção do peso corpóreo dos animais tratados com Roflumilaste pode ter ocorrido principalmente devido ao aumento de área de gordura marrom (ao inferirmos que a captação do PET tem relação diretamente proporcional à área de gordura marrom) aliado ao consequente aumento do metabolismo basal desses animais, principalmente pela ativação de AMPc e, possivelmente, PKA e UCP1 nesses tecidos, corroborando com a hipótese inicial deste estudo. Estudos adicionais visando identificar, quantificar e comparar a expressão de PKA e UCP1 por imunohistoquímica nos diversos tecidos dos animais de ambos os grupos poderão trazer grande contribuição na elucidação dos mecanismos de manutenção do peso corpóreo pelo uso deste fármaco.

Em meados da década de 1960, descobriu-se que a cafeína tem a capacidade de inibir uma PDE específica, exercendo modulação sobre AMPc. Desta forma, o estudo da associação do consumo de roflumilaste, associado à ingestão de café poderia resultar em achados semelhantes, sob o aspecto de manutenção de peso corpóreo (BUTCHER, SUTHERLAND, 1962).

A observação de um animal *outlier* para a captação de SUV nas regiões referentes à gordura marrom corroboram, de certa forma, com nossa hipótese que correlaciona a atividade metabólica da gordura marrom com a manutenção do peso corpóreo. Os números absolutos de captação de SUV deste animal indicam redução de atividade metabólica ou até mesmo de área da gordura marrom, quando comparados os tempos iniciais e finais. Curiosamente, este também é o animal pertencente ao grupo PSI que apresenta a curva de evolução de peso corporal com o maior ângulo de inclinação, tendendo ao ganho de peso, mesmo que este não seja significativo ao final do estudo, demonstrando uma possível relação inversamente proporcional entre atividade metabólica na gordura marrom e ganho de peso corpóreo.

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) é um procedimento de imagem não invasivo com uma ampla gama de aplicações clínicas, incluindo avaliação da fisiopatologia de distúrbios cerebrais, neurodegenerativos, tumores, infecções e inflamações. A técnica de PET é altamente sensível e permite o mapeamento tridimensional das regiões-alvo pela captação de radiofármacos emissores de pósitrons administrados em baixíssimas quantidade, sem que causem efeitos fisiológicos ou farmacologicamente significativos (LAMEKA; FARWELL; ICHISE, 2016).

O FDG, marcador radioativo utilizado no exame de PET, é um análogo não fisiológico da glicose, que, inclusive, é submetido aos mesmos processos metabólicos e fisiológicos da glicose, quando inoculado no organismo dos seres vivos, incluindo entre eles, ser absorvido por transportadores de superfície celular (principalmente o transportador de glicose-1, GLUT-1) e ser transformado pelo ação de enzimas glicolíticas (VAIDYANATHAN; PATEL; SCARSBROOK; CHOWDHURY, 2015).

Em 1923, OttoHeinrich Warburg propôs que as células malignas apresentavam metabolismo mais ativo do que as células normais, gerando

energia preferencialmente pela quebra não oxidativa da glicose. Contudo, Kubota e colaboradores descreveram que o aumento de metabolismo observado em tumores é resultante, principalmente, pela ação de células inflamatórias peritumorais, como macrófagos, que possuem captação de FDG ainda maior do que as próprias células tumorais, quando analisadas pela técnica de PET-FDG (VAIDYANATHAN; PATEL; SCARSBROOK; CHOWDHURY, 2015).

As primeiras alterações na inflamação incluem hiperemia tecidual, aumento da permeabilidade vascular e liberação de mediadores inflamatórios. O aumento na perfusão do tecido resulta em maior entrega de FDG aos locais afetados, que se seguirá pelo recrutamento, migração e proliferação de células ativas no local da inflamação (VAIDYANATHAN; PATEL; SCARSBROOK; CHOWDHURY, 2015). Assim, o aumento de perfusão e o consequente aumento no aporte de FDG, aliado ao aumento na glicólise em tecidos inflamados, em oposição às células normais, devido à ação e proliferação de células inflamatórias, formam a base fisiopatológica da aplicabilidade da imagem PET-FDG para mensuração de inflamação *in vivo* (VAIDYANATHAN; PATEL; SCARSBROOK; CHOWDHURY, 2015).

Nosso estudo demonstrou que os animais não tratados apresentaram aumentos significativos nos valores de SUV em todas as regiões-alvo cerebrais no exame PET, exceto Corpo Estriado Esquerdo, enquanto os animais tratados com Roflumilaste não apresentaram diferenças significativas nesses valores de SUV após as doze semanas de tratamento, indicando que o medicamento utilizado exerceu ação anti-inflamatória nessas diversas regiões-alvo cerebrais.

Feng e colaboradores observaram que o roflumilaste melhorou o comprometimento cognitivo (memória e aprendizagem) em camundongos APP / PS1, um modelo animal utilizado para o estudo de *Alzheimer*. Por meio de análises de biologia molecular e blotting, quantificaram a expressão NF-κB p 65, IL-6, IL-1B, TNF-α, cAMP, p-CREB e BDNF, concluindo que a melhora do comprometimento cognitivo dos animais está relacionada com a regulação positiva da via cAMP / CREB / BDNF e inibição da via de inflamação ativada por NF-κB no cérebro dos animais (FENG; WANG; HE; WU *et al.*, 2019). Nossos achados corroboram com os de Feng e colaboradores ao possibilitar a

visualização *in vivo*, pela captação do PET, do efeito anti-neuroinflamatório do Roflumilaste nas diversas regiões-alvo do cérebro no modelo animal utilizado.

Partindo-se do princípio de que o envelhecimento é caracterizado pelo desenvolvimento de um estado pró-inflamatório leve que, a longo prazo, desencadeia alterações fisiológicas em quatro grande domínios: mudanças na composição corporal; desequilíbrio entre disponibilidade e demanda de energia; desregulação em vias de sinalização, gerando dificuldade para manutenção da homeostase; e neurodegeneração com prejuízo à neuroplasticidade (BEKTAS; SCHURMAN; SEN; FERRUCCI, 2018); talvez seja possível utilizar o Roflumilaste como um agente retardador (profilático) dos efeitos inflamatórios próprios do envelhecimento, devido ao grande potencial anti-inflamatório do medicamento que demonstramos *in vivo* pelo exame PET, com especial aplicabilidade para a profilaxia dos efeitos inflamatórios que levam à neurodegeneração e perda de neuroplasticidade, correlacionadas com o desenvolvimento de diversas comorbidades em idosos, como o desenvolvimento de *Alzheimer* (BEKTAS; SCHURMAN; SEN; FERRUCCI, 2018).

A obesidade possui pontos em comum com o processo de envelhecimento, uma vez que, mesmo apresentando diversos fatores causais, também possui a característica de ser desencadeada por processos inflamatórios crônicos de leve intensidade, que se associam a múltiplas complicações, como a resistência periférica à insulina, e desencadeiam o quadro clínico típico desta patologia (IZAOLA; DE LUIS; SAJOUX; DOMINGO *et al.*, 2015).

A partir deste estudo é possível afirmar que o Roflumilaste tem se mostrado uma droga promissora, validando as hipóteses elencadas durante a elaboração do projeto de pesquisa, abrindo a possibilidade de indicação do mesmo para a realização de futuros estudos clínicos em humanos para avaliar seus efeito sob a manutenção do peso corpóreo em casos de obesidade, bem como seus efeitos anti-inflamatórios e, possivelmente, profiláticos sob o envelhecimento e acometimento por doenças neurológicas desencadeadas por processos inflamatórios.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que:

1. O roflumilaste administrado na dosagem de 1 mg/kg/dia por doze semanas resultou em manutenção do peso corpóreo dos camundongos ob/ob, evitando o ganho significativo de peso neste intervalo, em comparação ao grupo não tratado, que apresentou ganho significativo no mesmo intervalo.
2. A ação inibitória de ganho de peso pelo roflumilaste não é relacionada à alteração na secreção ou na ação nas vias de saciedade reguladas pela leptina, uma vez que o modelo animal escolhido é deficiente na produção e secreção deste hormônio (knockout Lepob/ob).
3. O grupo não tratado apresentou diminuição da captação de SUV para gordura marrom (média) após doze semanas de administração da solução controle (água), indicando diminuição da área de gordura marrom neste grupo, o que pode contribuir para o ganho de peso corpóreo observado nos mesmos, ao final deste intervalo.
4. Em contrapartida, ao excluir o animal outlier do grupo tratado, o uso do roflumilaste resultou em aumento de captação de SUV para gordura marrom (média) após doze semanas de tratamento na dosagem de 1 mg/kg/dia, em comparação ao grupo não tratado, indicando aumento de área tecidual de gordura marrom neste intervalo, o que pode contribuir para a inibição do ganho de peso corpóreo neste grupo.
5. O roflumilaste administrado na dosagem de 1 mg/kg/dia por doze semanas resultou na manutenção dos índices de captação de SUV no exame PET para os tecidos cerebrais, evitando o aumento de captação de ^{18}F -FDG, em comparação ao grupo não tratado, indicando ação anti-inflamatória nesses tecidos-alvo.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A – Aprovação do projeto pelo CEUA



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo do impacto do tratamento com Roflumilaste no metabolismo de camundongos obesos expostos à poluição atmosférica: a inflamação como promotora da síndrome metabólica**”, registrada com o nº **1376/2019**, sob a responsabilidade de **Elia Tomaso Espin Garcia Caldini e Felipe Pereira de Souza**, apresentada pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/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 Faculdade de Medicina da USP em 23.10.19

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-10-2019 Término: 01-10-2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Knouckout Ob/Ob
Nº de animais	24
Peso/Idade	8 semanas
Sexo	machos
Origem	Lab. de Gastroenterologia Clínica e Experimental da FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 23 de Outubro de 2019

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

7.2 Anexo B – Valores Absolutos - PET - Baseline

Parâmetro	Grupo – Animal											
	NT 1	NT 2	NT 3	NT 4	NT 5	NT 6	PSI 1	PSI 2	PSI 3	PSI 4	PSI 5	PSI 6
Grupo	982,23786	943,089756	1.034,38	646,646409	860,519255	379,42690	1.117,04	1.089,06	1.002,82	998,73	859,384531	1.014,97
Corpo Estriado Direito	965,49327	951,18824	922,992746	643,638075	814,879425	330,99019	1.059,51	1.060,95	806,12	930,36	734,813877	837,271251
Corpo Estriado Esquerdo	948,67492	951,985121	921,791674	649,304256	791,671522	353,51423	1.034,65	1.034,62	784,73	927,54	674,370846	836,25567
Córtex	874,11319	882,270322	913,351645	610,055423	724,919213	335,94266	1.009,82	964,46	849,16	911,00	729,358494	804,13895
Hipocampo Direito	965,98320	825,154916	891,036192	580,20193	778,704015	339,16321	978,57	972,08	839,47	889,47	700,637704	838,450331
Hipocampo Esquerdo	852,53947	835,780971	898,706654	587,479635	753,8225	341,79934	940,20	928,31	804,47	882,91	674,911356	796,626599
Tálamo	1.006,69	900,154285	977,551218	603,44749	808,726816	352,65366	967,43	961,02	861,72	912,31	696,550277	858,520515
Cerebelo	1.102,04	969,622367	1.220,12	646,383785	902,947751	458,12989	1.302,56	1.318,39	1.273,34	1.090,99	1.095,98	1.366,30
Septo Proencefalo Basal	890,94646	916,372925	868,424669	583,300345	803,282006	334,84608	988,02	976,17	803,68	827,90	624,561028	848,559642
Hipotálamo	1.031,81	893,222328	1.115,99	618,781236	876,617398	396,86879	1.164,75	1.059,62	1.226,64	995,62	995,617291	1.136,22
Amígdala Direita	880,39220	821,02175	835,446549	527,520635	869,553244	322,61821	1.016,66	999,01	952,05	842,53	755,9065	956,775201
Amígdala Esquerda	785,19914	783,817608	883,214709	564,529919	755,898713	344,80957	984,68	966,80	830,65	857,03	773,573645	805,662706
Tronco cerebral	1.145,46	1.103,09	1.284,80	801,006658	1.281,49	467,90588	1.447,69	1.421,09	1.393,51	1.277,53	1.254,81	1.535,02
Cinza Central	1.023,05	1.003,62	1.064,46	641,072161	841,924075	374,33685	981,05	974,72	981,57	976,56	757,56995	964,405391
Colículo Superior	960,56408	905,937132	970,755578	613,027129	758,696462	333,60909	906,65	906,76	868,82	946,33	656,847525	859,698381
Bulbo Olfatório	1.122,46	1.141,03	1.180,27	728,948403	884,73257	402,41218	1.190,15	1.079,75	1.000,06	1.092,48	861,640412	915,182346
Mesencéfalo Direito	1.119,82	929,974362	1.171,16	627,938745	885,812844	398,18220	1.073,50	1.052,46	1.143,91	1.077,04	825,866351	1.084,75
Mesencéfalo Esquerdo	1.019,28	946,403308	1.081,38	650,406155	859,680328	391,71646	1.039,81	1.025,96	1.028,77	1.040,36	879,32098	998,1207
Colículo Inferior Direito	952,84471	908,689475	1.013,44	570,979036	740,888471	363,54664	996,82	1.004,63	947,06	957,61	744,943399	990,987869
Colículo Inferior Esquerdo	854,65088	884,805576	966,28433	604,236149	689,402294	378,66847	982,20	997,00	928,92	955,34	757,686925	1.061,34
Gordura Marrom – Média	1.600,77	1.360,89	1.609,80	1.261,79	1.613,87	550,38472	1.522,73	1.774,83	1.727,09	1.412,68	1.647,59	1.844,10
Gordura Marrom – Máximo	2.998,49	2.308,61	3.019,03	2.384,50	3.301,99	1.055,20	2.944,12	3.140,44	3.143,99	2.501,73	2.770,78	2.884,68
Atividade injetada (MBq) início da imagem	31,148489	30,9319996	35,3504980	22,7383492	25,5170330	14,784591	27,5016413	29,2579872	29,5414925	30,2216967	21,9993391	27,5104878
Atividade injetada (Bq) início da imagem	31148,489	30931,9996	35350,4980	22738,3492	25517,0330	14784,591	27501,6413	29257,9872	29541,4925	30221,6967	21999,3391	27510,4878
Peso (g)	43,8	60,3	45,5	45,3	41,5	48,9	48,1	51,4	53,3	55,8	51,9	47,6
Glicemia	394	253	404	320	363	332	243	147	269	197	243	207
Cinj. (Bq/g)	711,15272	512,968485	776,934022	501,950313	614,868267	302,34337	571,759695	569,221541	554,249390	541,607468	423,879366	577,951425

7.3 Anexo C – Valores SUV - PET – Baseline

Parâmetro	Grupo – Animal											
	NT 1	NT 2	NT 3	NT 4	NT 5	NT 6	PSI 1	PSI 2	PSI 3	PSI 4	PSI 5	PSI 6
Grupo	1,38	1,84	1,33	1,29	1,40	1,25	1,95	1,91	1,81	1,84	2,03	1,76
Corpo Estriado Direito	1,36	1,85	1,19	1,28	1,33	1,09	1,85	1,86	1,45	1,72	1,73	1,45
Corpo Estriado Esquerdo	1,33	1,86	1,19	1,29	1,29	1,17	1,81	1,82	1,42	1,71	1,59	1,45
Córtex	1,23	1,72	1,18	1,22	1,18	1,11	1,77	1,69	1,53	1,68	1,72	1,39
Hipocampo Direito	1,36	1,61	1,15	1,16	1,27	1,12	1,71	1,71	1,51	1,64	1,65	1,45
Hipocampo Esquerdo	1,20	1,63	1,16	1,17	1,23	1,13	1,64	1,63	1,45	1,63	1,59	1,38
Tálamo	1,42	1,75	1,26	1,20	1,32	1,17	1,69	1,69	1,55	1,68	1,64	1,49
Cerebelo	1,55	1,89	1,57	1,29	1,47	1,52	2,28	2,32	2,30	2,01	2,59	2,36
Septo Prosencefalo Basal	1,25	1,79	1,12	1,16	1,31	1,11	1,73	1,71	1,45	1,53	1,47	1,47
Hipotálamo	1,45	1,74	1,44	1,23	1,43	1,31	2,04	1,86	2,21	1,84	2,35	1,97
Amígdala Direita	1,24	1,60	1,08	1,05	1,41	1,07	1,78	1,76	1,72	1,56	1,78	1,66
Amígdala Esquerda	1,10	1,53	1,14	1,12	1,23	1,14	1,72	1,70	1,50	1,58	1,82	1,39
Tronco cerebral	1,61	2,15	1,65	1,60	2,08	1,55	2,53	2,50	2,51	2,36	2,96	2,66
Cinza Central	1,44	1,96	1,37	1,28	1,37	1,24	1,72	1,71	1,77	1,80	1,79	1,67
Colículo Superior	1,35	1,77	1,25	1,22	1,23	1,10	1,59	1,59	1,57	1,75	1,55	1,49
Bulbo Olfatório	1,58	2,22	1,52	1,45	1,44	1,33	2,08	1,90	1,80	2,02	2,03	1,58
Mesencéfalo Direito	1,57	1,81	1,51	1,25	1,44	1,32	1,88	1,85	2,06	1,99	1,95	1,88
Mesencéfalo Esquerdo	1,43	1,84	1,39	1,30	1,40	1,30	1,82	1,80	1,86	1,92	2,07	1,73
Colículo Inferior Direito	1,34	1,77	1,30	1,14	1,20	1,20	1,74	1,76	1,71	1,77	1,76	1,71
Colículo Inferior Esquerdo	1,20	1,72	1,24	1,20	1,12	1,25	1,72	1,75	1,68	1,76	1,79	1,84
Gordura Marrom – Média	2,25	2,65	2,07	2,51	2,62	1,82	2,66	3,12	3,12	2,61	3,89	3,19
Gordura Marrom – Máximo	4,22	4,50	3,89	4,75	5,37	3,49	5,15	5,52	5,67	4,62	6,54	4,99

7.4 Anexo D – Valores Absolutos - PET - Pós tratamento

Parâmetro	Grupo – Animal											
	NT 1	NT 2	NT 3	NT 4	NT 5	NT 6	PSI 1	PSI 2	PSI 3	PSI 4	PSI 5	PSI 6
Grupo	1.498,49	1.217,88	1.150,95	1.386,49	1.478,41	1.167,70	1.265,71	529,726777	1.021,78	1.247,15	1.355,95	1.349,14
Corpo Estriado Direito	1.494,70	931,956493	972,548367	1.090,28	1.129,06	909,033471	1.001,00	469,939652	973,014327	1.234,97	1.266,31	1.294,27
Corpo Estriado Esquerdo	1.425,52	913,882762	939,354183	1.100,01	1.126,12	921,088307	1.018,69	482,222423	948,498135	1.207,27	1.312,58	1.307,85
Córtex	1.414,75	957,791637	942,516032	1.118,44	1.176,16	933,099503	1.057,24	460,130223	941,385633	1.120,17	1.157,88	1.212,97
Hipocampo Direito	1.437,75	975,635781	984,954742	1.156,03	1.270,78	898,508529	1.150,60	462,509187	899,448244	1.126,90	1.215,19	1.247,83
Hipocampo Esquerdo	1.293,19	912,975232	989,650001	1.195,85	1.227,16	889,376482	1.137,73	434,293849	965,651485	1.125,71	1.192,62	1.143,15
Tálamo	1.497,01	958,389749	1.047,56	1.285,15	1.301,29	916,502952	1.110,26	485,987652	932,453625	1.190,62	1.279,82	1.246,44
Cerebelo	1.437,92	1.537,91	1.440,17	1.716,47	1.827,42	1.684,20	1.855,08	592,054252	1.153,41	1.362,71	1.729,51	1.520,93
Septo Prosencefalo Basal	1.297,96	904,16397	931,305533	1.144,28	1.197,16	906,81939	1.048,52	473,614462	883,855712	1.071,26	1.205,92	1.208,67
Hipotálamo	1.478,46	1.356,46	1.282,89	1.898,60	1.954,28	1.266,88	1.437,30	574,44654	918,684748	1.186,19	1.372,51	1.345,92
Amígdala Direita	1.181,42	1.265,27	927,366805	1.213,30	1.513,85	1.064,05	1.257,25	520,969735	885,828664	1.137,03	1.222,03	1.256,22
Amígdala Esquerda	1.097,99	1.198,49	1.070,26	1.291,41	1.348,47	946,875286	1.181,34	481,680296	892,57294	1.131,07	1.191,54	1.295,60
Tronco cerebral	1.707,59	2.026,32	1.665,56	2.017,58	2.257,34	1.723,02	1.826,28	706,548378	1.308,34	1.643,57	1.808,60	1.700,25
Cinza Central	1.578,93	1.099,04	1.088,69	1.282,49	1.356,45	1.081,34	1.240,85	550,777688	1.106,53	1.329,48	1.438,31	1.464,36
Colículo Superior	1.592,99	955,07387	1.045,18	1.250,48	1.311,10	960,367671	1.173,70	489,740532	1.001,40	1.209,37	1.259,30	1.289,59
Bulbo Olfatório	2.003,31	1.196,29	1.120,91	1.302,22	1.376,10	1.149,39	1.306,74	598,767863	1.320,24	1.532,13	1.435,32	1.612,12
Mesencéfalo Direito	1.685,14	1.335,51	1.306,19	1.589,93	1.840,31	1.227,50	1.294,16	550,459959	1.042,12	1.350,11	1.495,64	1.507,90
Mesencéfalo Esquerdo	1.627,07	1.217,17	1.251,98	1.550,44	1.596,36	1.083,81	1.288,55	539,556148	1.103,75	1.322,25	1.433,63	1.338,10
Colículo Inferior Direito	1.582,35	1.024,52	1.025,13	1.210,77	1.312,28	1.082,31	1.311,40	499,590643	1.039,64	1.228,92	1.413,04	1.355,17
Colículo Inferior Esquerdo	1.459,06	986,758489	988,620668	1.196,10	1.250,33	1.108,75	1.351,74	519,021753	1.097,06	1.186,05	1.333,39	1.286,26
Gordura Marrom – Média	2.311,19	3.380,71	2.490,20	2.724,34	2.962,04	2.456,35	2.942,64	1.062,64	2.106,94	2.876,90	2.309,76	2.663,39
Gordura Marrom – Máximo	4.065,50	6.480,19	4.784,01	5.644,40	5.415,36	4.798,70	5.675,78	1.779,92	4.149,29	5.761,81	3.949,44	4.792,41
Atividade injetada (MBq) início da imagem	36,65	33,36	32,20	34,38	36,09	27,15	34,37	17,10	33,24	33,39	36,43	33,63
Atividade injetada (Bq) início da imagem	36646	33363	32203	34385	36094	27150	34366	17100	33241	33385,69977	36432	33630
Peso (g)	52,6	67,7	51,8	55,2	51,6	57,1	48,6	53,4	56	53,5	50,7	52,3
Glicemia	156	224	278	315	236	205	197	185	202	123	182	200
Cinj.(Bq/g)	696,70	492,81	621,68	622,91	699,50	475,49	707,12	320,22	593,58	624,0317715	718,57	643,02

7.5 Anexo E – Valores SUV - PET - Pós tratamento

Parâmetro	Grupo – Animal											
	NT 1	NT 2	NT 3	NT 4	NT 5	NT 6	PSI 1	PSI 2	PSI 3	PSI 4	PSI 5	PSI 6
Grupo	2,15	2,47	1,85	2,23	2,11	2,46	1,79	1,65	1,72	2,00	1,89	2,10
Corpo Estriado Direito	2,15	1,89	1,56	1,75	1,61	1,91	1,42	1,47	1,64	1,98	1,76	2,01
Corpo Estriado Esquerdo	2,05	1,85	1,51	1,77	1,61	1,94	1,44	1,51	1,60	1,93	1,83	2,03
Córtex	2,03	1,94	1,52	1,80	1,68	1,96	1,50	1,44	1,59	1,80	1,61	1,89
Hipocampo Direito	2,06	1,98	1,58	1,86	1,82	1,89	1,63	1,44	1,52	1,81	1,69	1,94
Hipocampo Esquerdo	1,86	1,85	1,59	1,92	1,75	1,87	1,61	1,36	1,63	1,80	1,66	1,78
Tálamo	2,15	1,94	1,69	2,06	1,86	1,93	1,57	1,52	1,57	1,91	1,78	1,94
Cerebelo	2,06	3,12	2,32	2,76	2,61	3,54	2,62	1,85	1,94	2,18	2,41	2,37
Septo Prosencefalo Basal	1,86	1,83	1,50	1,84	1,71	1,91	1,48	1,48	1,49	1,72	1,68	1,88
Hipotálamo	2,12	2,75	2,06	3,05	2,79	2,66	2,03	1,79	1,55	1,90	1,91	2,09
Amígdala Direita	1,70	2,57	1,49	1,95	2,16	2,24	1,78	1,63	1,49	1,82	1,70	1,95
Amígdala Esquerda	1,58	2,43	1,72	2,07	1,93	1,99	1,67	1,50	1,50	1,81	1,66	2,01
Tronco cerebral	2,45	4,11	2,68	3,24	3,23	3,62	2,58	2,21	2,20	2,63	2,52	2,64
Cinza Central	2,27	2,23	1,75	2,06	1,94	2,27	1,75	1,72	1,86	2,13	2,00	2,28
Colículo Superior	2,29	1,94	1,68	2,01	1,87	2,02	1,66	1,53	1,69	1,94	1,75	2,01
Bulbo Olfatório	2,88	2,43	1,80	2,09	1,97	2,42	1,85	1,87	2,22	2,46	2,00	2,51
Mesencéfalo Direito	2,42	2,71	2,10	2,55	2,63	2,58	1,83	1,72	1,76	2,16	2,08	2,35
Mesencéfalo Esquerdo	2,34	2,47	2,01	2,49	2,28	2,28	1,82	1,68	1,86	2,12	2,00	2,08
Colículo Inferior Direito	2,27	2,08	1,65	1,94	1,88	2,28	1,85	1,56	1,75	1,97	1,97	2,11
Colículo Inferior Esquerdo	2,09	2,00	1,59	1,92	1,79	2,33	1,91	1,62	1,85	1,90	1,86	2,00
Gordura Marrom - Média	3,32	6,86	4,01	4,37	4,23	5,17	4,16	3,32	3,55	4,61	3,21	4,14
Gordura Marrom - Máximo	5,84	13,15	7,70	9,06	7,74	10,09	8,03	5,56	6,99	9,23	5,50	7,45

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APOVIAN, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. **Am J Manag Care**, 22, n. 7 Suppl, p. s176-185, Jun 2016.

BALES CW, PORTER STARR KN. Obesity Interventions for Older Adults: Diet as a Determinant of Physical Function. **Adv Nutr**. 2018 Mar 1;9(2):151-159.

BARSIG, J.; LEUNG, B.; BUNDSCHUH, D.; WOLLIN, L. *et al.* FRI0018 Protection by phosphodiesterase-4 inhibitor roflumilast of mice against collagen-induced arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 60, n. Suppl 1, p. A452-A452, 2001.

BAYS HE. Current and investigational antiobesity agents and obesity therapeutic treatment targets. **Obes Res**. 2004 Aug;12(8):1197-211.

BEKTAS, A.; SCHURMAN, S. H.; SEN, R.; FERRUCCI, L. Aging, inflammation and the environment. **Exp Gerontol**, 105, p. 10-18, May 2018.

BETZ, M. J.; ENERBACK, S. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease. **Nat Rev Endocrinol**, 14, n. 2, p. 77-87, Feb 2018.

BUTCHER RW, SUTHERLAND EW. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. **J Biol Chem**. 1962 Apr;237:1244-50.

CHAO AM, QUIGLEY KM, WADDEN TA. Dietary interventions for obesity: clinical and mechanistic findings. **J Clin Invest**. 2021 Jan 4;131(1):e140065.

CABALLERO, B. Humans against Obesity: Who Will Win? **Adv Nutr**, 10, n. suppl_1, p. S4-s9, Jan 1 2019.

CYPESS, A. M.; DOYLE, A. N.; SASS, C. A.; HUANG, T. L. *et al.* Quantification of human and rodent brown adipose tissue function using ^{99m}Tc-methoxyisobutylisonitrile SPECT/CT and ¹⁸F-FDG PET/CT. **J Nucl Med**, 54, n. 11, p. 1896-1901, Nov 2013.

DANQUAH FI, YEBOAH M, BAWONTUO V, KUUPIEL D. Mapping evidence on the burden and distribution of childhood obesity in sub-Saharan Africa: a scoping review protocol. **Syst Rev**. 2019 Nov 13;8(1):274.

ENGIN, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. **Adv Exp Med Biol**, 960, p. 1-17, 2017.

FENG, H.; WANG, C.; HE, W.; WU, X. *et al.* Roflumilast ameliorates cognitive impairment in APP/PS1 mice via cAMP/CREB/BDNF signaling and anti-neuroinflammatory effects. **Metab Brain Dis**, 34, n. 2, p. 583-591, Apr 2019.

FERTIG BA, BAILLIE GS. PDE4-mediated cAMP signalling. **J Cardiovasc Dev Dis** 2018;5(1).

FIMIA, G. M.; SASSONE-CORSI, P. Cyclic AMP signalling. **J Cell Sci**, 114, n. Pt 11, p. 1971-1972, Jun 2001.

FRANKL, J.; SHERWOOD, A.; CLEGG, D. J.; SCHERER, P. E. *et al.* Imaging Metabolically Active Fat: A Literature Review and Mechanistic Insights. **Int J Mol Sci**, 20, n. 21, Nov 5 2019.

GIEMBYCZ, M. A.; FIELD, S. K. Roflumilast: first phosphodiesterase 4 inhibitor approved for treatment of COPD. **Drug Des Devel Ther**, 4, p. 147-158, Jul 21 2010.

GRANT-GUIMARAES J, FEINSTEIN R, LABER E, KOSOY J. Childhood Overweight and Obesity. **Gastroenterol Clin North Am**. 2016 Dec;45(4):715-728.

GURNEY, M E.; D'AMATO, E C.; BURGIN, A B. Phosphodiesterase-4 (PDE4) molecular pharmacology and Alzheimer's disease. **Neurotherapeutics**, v. 12, p. 49-56, 2015.

HALES CM, CARROLL MD, FRYAR CD, OGDEN CL. Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2015-2016. **NCHS Data Brief**. 2017 Oct;(288):1-8.

HALPIN DM. ABCD of the phosphodiesterase family: interaction and differential activity in COPD. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**. 2008;3:543–561

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med**, 19, n. 10, p. 1252-1263, Oct 2013.

HATZELMANN A, MORCILLO EJ, LUNGARELLA G, ADNOT S, SANJAR S, BEUME R, ET AL. The preclinical pharmacology of roflumilast – a selective, oral phosphodiesterase 4 inhibitor in development for chronic obstructive pulmonary disease. **Pulm Pharmacol Ther**. 2010;23:235–256

HURLEY, M. M.; MORAN, T. H. Animal Models of Ingestive Behaviors. *In: Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*: Elsevier, 2020.

IZAOLA, O.; DE LUIS, D.; SAJOUX, I.; DOMINGO, J. C. *et al.* [Inflammation and obesity (lipoinflammation)]. **Nutr Hosp**, 31, n. 6, p. 2352-2358, Jun 1 2015.

KUMAR, R. K.; HERBERT, C.; THOMAS, P. S.; WOLLIN, L. *et al.* Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma. **J Pharmacol Exp Ther**, 307, n. 1, p. 349-355, Oct 2003.

LAMEKA, K.; FARWELL, M. D.; ICHISE, M. Positron Emission Tomography. **Handb Clin Neurol**, 135, p. 209-227, 2016.

LIU, J.; WANG, Y.; LIN, L. Small molecules for fat combustion: targeting obesity. **Acta Pharm Sin B**, 9, n. 2, p. 220-236, Mar 2019.

MARTORANA, P. A.; BEUME, R.; LUCATTELLI, M.; WOLLIN, L. *et al.* Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. **Am J Respir Crit Care Med**, 172, n. 7, p. 848-853, Oct 1 2005.

MAYORAL, L. P.; ANDRADE, G. M.; MAYORAL, E. P.; HUERTA, T. H. *et al.* Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. **Indian J Med Res**, 151, n. 1, p. 11-21, Jan 2020.

MOLLMANN, J.; KAHLES, F.; LEBHERZ, C.; KAPPEL, B. *et al.* The PDE4 inhibitor roflumilast reduces weight gain by increasing energy expenditure and leads to improved glucose metabolism. **Diabetes Obes Metab**, 19, n. 4, p. 496-508, Apr 2017.

MORALES CAMACHO WJ, MOLINA DÍAZ JM, PLATA ORTIZ S, PLATA ORTIZ JE, MORALES CAMACHO MA, CALDERÓN BP. Childhood obesity: Aetiology, comorbidities, and treatment. **Diabetes Metab Res Rev**. 2019 Nov;35(8):e3203.

PICHÉ, M. E.; POIRIER, P.; LEMIEUX, I.; DESPRÉS, J. P. Overview of Epidemiology and Contribution of Obesity and Body Fat Distribution to Cardiovascular Disease: An Update. **Prog Cardiovasc Dis**, 61, n. 2, p. 103-113, Jul-Aug 2018.

RABE KF. Update on roflumilast, a phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. **Br J Pharmacol**. 2011 May;163(1):53-67

RAVNSKJAER, K.; MADIRAJU, A.; MONTMINY, M. Role of the cAMP Pathway in Glucose and Lipid Metabolism. **Handb Exp Pharmacol**, 233, p. 29-49, 2016.

REVERTE-SALISA, L.; SANYAL, A.; PFEIFER, A. Role of cAMP and cGMP Signaling in Brown Fat. **Handb Exp Pharmacol**, 251, p. 161-182, 2019.

SALVATOR H, BUENESTADO A, BROLLO M, NALINE E, VICTONI T, LONGCHAMP E, TENOR H, GRASSIN-DELYLE S, DEVILLIER P. Clinical Relevance of the Anti-inflammatory Effects of Roflumilast on Human Bronchus: Potentiation by a Long-Acting Beta-2-Agonist. **Front Pharmacol**. 2020 Dec 8;11:598702.

SCHUDT C, HATZELMANN A, BEUME R, TENOR H. Phosphodiesterase inhibitors: history of pharmacology. **Handb Exp Pharmacol**. 2011;(204):1-46

SERAVALLE, G.; GRASSI, G. Obesity and hypertension. **Pharmacol Res**, 122, p. 1-7, Aug 2017.

VAIDYANATHAN, S.; PATEL, C. N.; SCARSBROOK, A. F.; CHOWDHURY, F. U. FDG PET/CT in infection and inflammation--current and emerging clinical applications. **Clin Radiol**, 70, n. 7, p. 787-800, Jul 2015.

VOLLERT, S.; KAESSNER, N.; HEUSER, A.; HANAUER, G. *et al*. The glucose-lowering effects of the PDE4 inhibitors roflumilast and roflumilast-N-oxide in db/db mice. **Diabetologia**, 55, n. 10, p. 2779-2788, Oct 2012.

WEIHRAUCH-BLÜHER S, WIEGAND S. Risk Factors and Implications of Childhood Obesity. **Curr Obes Rep**. 2018 Dec;7(4):254-259.

ZHANG, F.; HAO, G.; SHAO, M.; NHAM, K. *et al*. An Adipose Tissue Atlas: An Image-Guided Identification of Human-like BAT and Beige Depots in Rodents. **Cell Metab**, 27, n. 1, p. 252-262.e253, Jan 9 2018.

ZHANG, X.; CHEN, Y.; FAN, L.; YE, J. *et al*. Pharmacological mechanism of roflumilast in the treatment of asthma-COPD overlap. **Drug Des Devel Ther**, 12, p. 2371-2379, 2018.