

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DANYLO NOLETO DE SOUSA MELO

EFEITOS DO USO DE GLICOCORTICOIDES SOBRE O METABOLISMO
DA GLICOSE EM RATOS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE
DEXAMETASONA E PREDNISONA

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Iracelle Carvalho Abreu

São Luís – MA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITOS DO USO DE GLICOCORTICOIDES SOBRE O METABOLISMO
DA GLICOSE EM RATOS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DEXAMETASONA
E PREDNISONA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

São Luís – MA

2016

DANYLO NOLETO DE SOUSA MELO

**EFEITOS DO USO DE GLICOCORTICOIDES SOBRE O METABOLISMO
DA GLICOSE EM RATOS: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DEXAMETASONA
E PREDNISONA**

A comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Ciências da Saúde, em sessão pública realizada no dia 29/09/2016 considerou o candidato

(X) APROVADO () REPROVADO

1º Examinador

Prof. Dr. Felipe Albuquerque Marques

2º Examinador

Prof. Dr. Mário Alves de Siqueira Filho

3º Examinador

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

Presidente

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as conquistas, e providências divinas da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Marcus Paes, pelo grande empenho e colaboração e ajuda científica não só nesse projeto, mas em toda minha vida profissional, e por ter me recebido de braços abertos nessa imensa família Lefisio.

À minha co-orientadora, Profa. Iracelle Abreu, pela ajuda e empenho no desenvolvimento desse estudo.

À Banca examinadora, pelas colaborações e enriquecimento científico do trabalho.

Aos meus colegas do Lefisio, em especial à equipe que esteve envolvida diretamente na execução desse projeto, como Lucas, Jonas, Karlla, Nathalee, e aos outros pelo auxílio no desenvolvimento dos protocolos experimentais do projeto, em especial Caroline, Pâmela, Renata e Bruno. Além disso, pelos conhecimentos compartilhados e às boas convivências e companheirismo existente entre todos os membros desse querido laboratório.

Aos meus familiares, em especial meus pais, Nilson e Kátia, que além de serem a base de tudo que eu sou, sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

À minha noiva, Ana Kely, pelo amor e por me ensinar a seguir em frente e enfrentar todos os obstáculos com mais paciência e amadurecimento.

À Universidade Federal do Maranhão e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela oportunidade de ter mais uma conquista acadêmica nessa casa.

Aos órgãos de fomentos CAPES, FAPEMA e CNPq, que foram essenciais para que o projeto fosse desenvolvido.

“O homem é do tamanho do seu sonho”
Fernando Pessoa

RESUMO

Os glicocorticoides (GCs) sintéticos podem induzir diversos efeitos adversos, quando administrados em doses elevadas e/ou por tempo prolongado, como resistência insulínica periférica, intolerância à glicose, e alterações no metabolismo lipídico, especialmente hipertrigliceridemia. Porém existem poucos estudos sobre o impacto metabólico promovido por tratamentos prolongados com diferentes GCs sintéticos, especialmente com a prednisona, GC de ação intermediária e de primeira escolha em sua classe farmacológica. Diante disso, buscou-se verificar as alterações metabólicas ocasionadas pelo tratamento subcrônico com prednisona em ratos e compará-las aos efeitos presentes e conhecidos em modelo agudo de indução de resistência insulínica pela dexametasona. Para tal, ratos *Wistar* com noventa dias de vida foram tratados com dexametasona (D5) (1 mg/Kg, i.p.) durante 5 dias consecutivos e, os seus controles (C5) com salina, e ratos *Wistar* com 60 dias de vida foram tratados com prednisona (80 mg/Kg, v.o.) durante 15 dias (P15) e 30 dias (P30) consecutivos e, os seus respectivos controles (C15 e C30), receberam veículo. Os ratos D5 apresentaram redução do peso corpóreo (12,3%) e menor peso da gordura retroperitoneal (38%), aumento das concentrações séricas de glicose em jejum (12%) e alimentado (30%), insulina (80%) e triglicerídeos (339%) ($p < 0,05$). O conteúdo de gordura total hepático, bem como triglicerídeos foram 29% e 52% maiores nos ratos D5, em relação aos ratos C5 ($p < 0,05$). Os ratos P15 apresentaram um ganho de peso 61% menor, redução da gordura retroperitoneal (29%) e aumento nas concentrações plasmáticas de triglicerídeos (60%), em relação aos ratos C15 ($p < 0,05$). Enquanto os ratos P30 apresentaram um ganho de peso 44% menor, redução da gordura retroperitoneal (25%) e aumento nas concentrações séricas de triglicerídeos (78%) e gordura total hepática (26%), em relação aos ratos C30 ($p < 0,05$). Os testes *in vivo* revelaram a presença de intolerância à glicose (GTT) nos ratos D5 e P30 e redução da sensibilidade à insulina (ITT, HOMA, TyG) nos animais D5 ($p < 0,05$). O teste *ex vivo* revelou maior sensibilidade nas ilhotas pancreáticas frente à glicose somente nos ratos D5. Em conclusão, a administração subcrônica de prednisona promoveu alterações metabólicas mais sutis na homeostasia da glicose, quando comparada à administração aguda de dexametasona, sugerindo assim, o uso preferencial da prednisona quando se pretende minimização dos efeitos adversos metabólicos associados ao uso de GCs.

Palavras-chave: dexametasona, prednisona, homeostase da glicose, sensibilidade à insulina, secreção insulínica, hipertrigliceridemia.

ABSTRACT

Synthetic glucocorticoids (GCs) induce several adverse effects when administered in high doses and/or prolonged, as peripheral insulin resistance, glucose intolerance, and alterations in lipid metabolism, especially hypertriglyceridemia. There are few studies on the metabolic impact caused by long-term treatments with different synthetic GCs, especially with prednisone, GC of intermediate action and first choice in its pharmacologic class. Therefore, we seek to verify the metabolic alterations caused by sub chronic treatment with prednisone in rats and compare them with existing and in acute model of insulin resistance induced by dexamethasone effects. For this, *Wistar* rats with of 90 days were treated with dexamethasone (D5) (1 mg/kg, i.p.) for 5 consecutive days and, its controls (C5) with saline, and *Wistar* rats of 60 days old were treated with prednisone (80 mg/kg, orally) for 15 days (P15) and 30 days (P30) consecutive and their respective controls (C15 and C30), received vehicle solution. The D5 results a decreased body weight (12.3%) and lower weight of retroperitoneal fat (38%), increased serum fasting glucose (12%) and fed (30%), insulin (80%) and triglycerides (339%) ($p < 0.05$). Total fat and triglycerides liver were 29% and 52% higher in rats D5, compared to the C5 rats ($p < 0.05$). The P15 rats had increased weight 61% less, reduction of retroperitoneal fat (29%) and increased plasma triglyceride concentrations (60%) compared to the C15 rats ($p < 0.05$). As long as P30 rats had increased weight 44% less, reduction of retroperitoneal fat (25%) and increased serum triglycerides (78%) and liver total fat (26%) compared to the C30 rats ($p < 0.05$). *In vivo* tests revealed the presence of impaired glucose tolerance (*o*GTT) in rats D5 and P30, and reduced insulin sensitivity (*ip*ITT, HOMA, TYG) in D5 animals ($p < 0.05$). *Ex vivo* test showed greater sensitivity in the pancreatic islets front glucose only in D5 rats. In conclusion, the sub chronic administration of prednisone promoted finer metabolic changes in glucose homeostasis, compared to acute administration of dexamethasone, suggesting the preferential use of prednisone when it is intended to minimize the adverse metabolic effects associated with the use of GCs.

Keywords: dexamethasone, prednisone, glucose homeostasis, insulin sensitivity, insulin secretion, hypertriglyceridemia.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.	Regulação do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal (HHA) na produção endógena de cortisol.....	15
Figura 2.	Morfofisiologia das glândulas suprarrenais (adrenais).....	16
Figura 3.	Mecanismo de ação dos glicocorticoides.....	19
Figura 4.	Mecanismo de secreção insulínica em células β pancreáticas.....	21
Figura 5.	Sinalização Insulínica e seus efeitos em tecidos responsivos.....	22
Figura 6.	Glicose em excesso, hiperinsulinemia e maior aporte de AGLs para o fígado contribui para uma maior síntese de VLDL hepática.....	24
Figura 7.	Evolução Ponderal e Consumo Alimentar de ratos tratados com dexametasona ou prednisona.....	36
Figura 8.	Parâmetros bioquímicos séricos, de resistência insulínica e perfil lipídico hepático de ratos tratados com dexametasona ou com prednisona.....	37
Figura 9.	Efeito do tratamento com dexametasona ou prednisona sobre a função do eixo insulina-glicose.....	39
Figura 10.	Tratamento com dexametasona ou prednisona não induz diferença na cinética de síntese de VLDL em ratos.....	40
Figura 11.	Perfil lipídico hepático de ratos tratados com dexametasona ou prednisona.....	40
Figura 12.	Efeito do tratamento com dexametasona ou prednisona na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) <i>ex vivo</i>	41
Tabela 1.	Parâmetros morfológicos de ratos tratados com dexametasona, prednisona e seus controles.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11β-HSD	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
ADP	Adenosina Difosfato
Akt	Serina-treonina quinase
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP-1	Ativador de proteína-1
ATGL	Lipase de triglicerídeos de tecido adiposo
ATP	Adenosina Trifosfato
AUC	Área sob a curva
C15	Grupo de ratos tratados com veículo por 15 dias
C30	Grupo de ratos tratados com veículo por 30 dias
C5	Grupo controle de dexametasona
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CBG	Globulina transportadora de corticosteroide
ChREBP	Proteína ligante do elemento regulado por carboidratos
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
D5	Grupo tratado com dexametasona
DAG	Diacilglicerol
DHEA	Desidroepiandrosterona
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GC	Glicocorticoide
GLUT-4	Transportador de glicose tipo 4
GR	Receptor de glicocorticoide
GRE	Elementos responsivos ao glicocorticoide
HHA	Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal
HSL	Lipase hormônio sensível
HSP	Proteína de choque térmico
IP3	Inositol 1-4-5-trifosfato
IRS	Substrato de receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LLP	Lipase de lipoproteínas

MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MTP	Proteína microsomal de transferência de triacilglicerois
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NFκB	Fator nuclear κB
P15	Grupo de ratos tratados com prednisona por 15 dias
P30	Grupo de ratos tratados com prednisona por 30 dias
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI3K	Fosfatidil-inositol 3 quinase
PK	Piruvato quinase
RI	Resistência insulínica
S6K	S6 quinase
SREBP-1c	Proteína ligante do elemento regulado por esteróis
TAB	Tecido adiposo branco
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Fisiologia do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	14
2.1.1 <i>Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA).....</i>	14
2.1.2 <i>Glândulas suprarrenais.....</i>	15
2.2 Hormônios glicocorticoides.....	16
2.3 Farmacologia dos glicocorticoides.....	17
2.3.1 <i>Mecanismo de ação.....</i>	17
2.3.2 <i>Uso clínico dos glicocorticoides e seus efeitos adversos.....</i>	19
2.4 Metabolismo da glicose.....	20
2.4.1 <i>Controle da secreção insulínica e o seu papel nos tecidos periféricos.....</i>	20
2.4.2 <i>Controle da síntese de triglicerídeos pela insulina.....</i>	23
2.5 Efeitos diabetogênicos dos glicocorticoides.....	24
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
ARTIGO	28
4. INTRODUÇÃO.....	30
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
5.1 Animais e desenho experimental.....	31
5.2 Avaliação bioquímica sérica.....	32
5.3 Teste de tolerância à glicose e à insulina	32
5.4 Secreção de triglicerídeos hepático.....	33
5.5 Extração e quantificação de gordura hepática.....	33
5.6 Isolamento de ilhotas pancreáticas e ensaio de secreção estática de insulina.....	34
5.7 Análise estatística.....	34
6. RESULTADOS.....	34
6.1 Ganho de peso, consumo alimentar e parâmetros morfométricos.....	34
6.2 Perfil bioquímico sérico.....	35
6.3 Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina.....	37
6.4 Avaliação da secreção e do armazenamento de triglicerídeos hepáticos	38

6.5 Secreção insulínica estimulada por glicose.....	41
7. DISCUSSÃO.....	41
AGRADECIMENTOS.....	45
REFERÊNCIAS.....	45
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	

1. APRESENTAÇÃO

Os glicocorticoides (GCs) são hormônios esteroidais derivados do colesterol, produzidos e secretados por células da zona fasciculada do córtex das glândulas adrenais, tendo como o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal regulador de suas concentrações circulantes (TAVES; GOMEZ-SANCHEZ; SOMA, 2011). Fisiologicamente, contribuem para a regulação da função imunológica, do metabolismo hídrico, eletrolítico e de macronutrientes. Em períodos de estresse, esses hormônios são produzidos em quantidades maiores, contribuindo para a modulação do metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos, de modo a mobilizar substratos para o processo oxidativo (ANDREWS; WALKER, 1999).

O cortisol é o principal representante dessa classe de hormônios e, além de sua atividade fisiológica, foram descobertos seus benefícios em pacientes artríticos, impulsionando Hench e colaboradores a sintetizar esse hormônio e utilizá-lo na prática clínica (BENEDEK, 2011). Além dos hormônios, existem alguns análogos sintéticos com atividade GC, como a triancinolona, dexametasona e a prednisona. Essa última se destaca como o mais utilizado na prática clínica e sendo o de primeira escolha no tratamento de diversas comorbidades (SCHIMMER; PARKER, 2011). Os GCs sintéticos são amplamente prescritos para o tratamento de doenças com base inflamatória, alérgica e até mesmo para fins imunossupressores (DE BOSSCHER et al., 2014). Esses fármacos diferenciam-se dos hormônios GCs por terem maior ação anti-inflamatória associada a uma menor depuração metabólica (SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002).

O mecanismo de ação dos GC consiste na sua ligação a receptores nucleares específicos (GR), que exercem sua sinalização no núcleo, em regiões específicas do DNA, denominadas elementos responsivos ao glicocorticoide (GRE), interagindo com co-ativadores de transcrição e regulando as atividades de determinados fatores de transcrição (MEIJSING et al., 2009). Os GREs podem modular a transcrição gênica positivamente (transativação), como os genes da gliconeogênese (SCHÄCKE et al., 2002), ou negativamente (transrepressão), incluindo, nesse caso, o gene da prolactina e da pró-opiomelanocortina (precursor de ACTH) (SAKLATVALA, 2002). Além disso, o complexo GC-GR pode ligar-se diretamente à fatores de transcrição, como NFκB (Fator nuclear κB) e AP-1 (ativador de proteína-1), que regulam a expressão de diversos componentes do sistema imune (DE BOSSCHER et al., 2014), contribuindo, assim, para seu importante uso clínico como efetivos anti-inflamatórios e imunossupressores.

Entretanto, o tratamento com glicocorticoides por períodos prolongados ou com doses elevadas geralmente está associada a efeitos adversos, como a atrofia muscular, aumento da deposição de gordura visceral e alterações metabólicas, tais como a indução da resistência insulínica (RI) e da intolerância à glicose (BUREN et al., 2008; NUNES et al., 2013; SCHÄCKE et al., 2002). Indivíduos com RI mantêm a glicemia normal ou próxima de valores fisiológicos resultante da resposta compensatória promovida pelo pâncreas endócrino, que promove hipersecreção de insulina e conseqüentemente, o desenvolvimento do quadro de hiperinsulinemia (RAFACHO, A et al., 2010).

Por causa disso, algumas pesquisas se propuseram verificar as conseqüências metabólicas provocadas por tratamentos agudos com GCs com altas doses. Estudos *in vivo* demonstraram que a administração de dexametasona 1 mg/kg peso corpóreo por 5 (RAFACHO et al., 2008; SAAD et al., 1993) e 11 (BUREN et al., 2008) dias consecutivos, provocava RI associada à hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, acompanhada ou não por hiperglicemia, provocadas de forma dependente da dose e tempo, com ou sem aumento da glicemia (RAFACHO et al., 2008). Hoje é bem elucidado que a dexametasona na dose de 1 mg/Kg induz intolerância à glicose, RI e dislipidemia (MOTTA et al., 2015; NUNES et al., 2013; RAFACHO, A. et al., 2010).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fisiologia do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA)

2.1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA)

As glândulas suprarrenais têm sua atividade regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), e sua função geral é manter a homeostasia do organismo. Essa regulação está ligada a uma grande variedade de estímulos fisiológicos (ritmo circadiano e estresse) e patológicos. Os estímulos originados de diversas áreas do sistema nervoso induzem as células hipotalâmicas a secretarem vasopressina e o hormônio liberador de corticotropina (CRH) (**Figura 1**) (ANDREWS; WALKER, 1999).

O CRH estimula os corticotrófos na adeno-hipófise a produzir e liberar hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). Nas células do córtex das glândulas adrenais ou suprarrenal, receptores específicos, chamados de MC2R, são ligados e ativados pelo ACTH, desencadeando uma sinalização para a produção dos hormônios corticosteroides (glicocorticoides e mineralocorticoides). O eixo HHA é então inibido quando existem altas concentrações de cortisol na corrente sanguínea, que, por efeito de retroalimentação negativa, este esteroide chega ao hipotálamo e à adeno-hipófise e inibe, respectivamente, a produção de CRH e de ACTH (LAUGERO, 2004) (**Figura 1**).

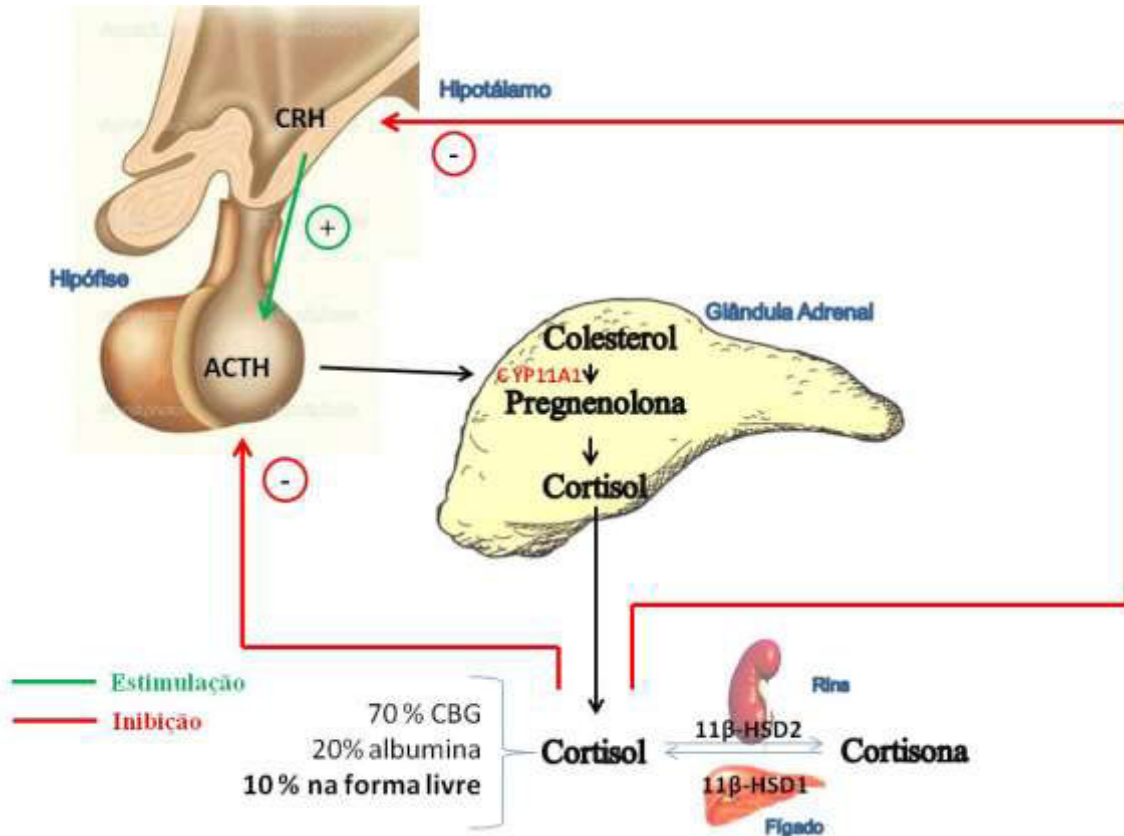


Figura 1. Regulação do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) na produção endógena de cortisol.
Fonte: Adaptação de arquivo pessoal. **CRH** – Hormônio liberador de corticotrofina. **ACTH** – Hormônio adrenocorticotrófico. **CBG** – globulina transportadora de corticoide. O cortisol é sintetizado a partir do colesterol na glândula suprarrenal, regulado pelo eixo hipotálamo- hipófise, através da secreção dos dois hormônios CRH e ACTH, respectivamente. O cortisol na forma livre é capaz de atravessar a membrana celular para exercer suas atividades intracelulares.

2.1.2 Glândulas suprarrenais

A glândula suprarrenal, ou adrenal, foi descrita anatomicamente por Bartholomeu Eustachius em 1563, porém, suas funções fisiológicas só foram descobertas após aproximadamente três séculos (LEOUTSAKOS; LEOUTSAKOS, 2008). Foi quando por volta de 1849, Thomas Addison descreveu a ocorrência de desfechos fatais em pacientes com destruição das suprarrenais, como também relacionou algumas manifestações clínicas, como irritabilidade, com anormalidades morfológicas das glândulas adrenais reveladas nas autópsias (SILVA et al., 2004).

As glândulas adrenais são formadas por dois diferentes tecidos: o cortical, ou córtex; e o medular, ou medula, com origens embrionárias e funções diferentes (ANDREWS; WALKER, 1999). A função básica da medula adrenal é produzir e secretar adrenalina e noradrenalina após estímulos nervosos. Já o córtex da suprarrenal, é formado por três zonas

celulares concêntricas: zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticular, cada uma responsável pela secreção de diferentes hormônios (SCHIMMER; PARKER, 2011).

A zona glomerulosa, localizada mais externamente no córtex, é responsável pela produção e secreção de hormônios chamados de mineralocorticóides, associados com a homeostasia de eletrólitos no sangue. A zona reticular é a região mais interna do córtex, realiza a síntese e secreção de hormônios andrógenos e estrogênios, como a desidroepiandrosterona (DHEA), que pode ser convertida periféricamente em androgênios mais potentes. Já a zona fasciculada, maior zona das três, secreta hormônios relacionados com o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, chamados de glicocorticoides (GCs), que estimulam a gliconeogênese (**Figura 2**). A secreção de corticosterona em roedores, ou de cortisol no homem, é regulada principalmente pelo ACTH (SCHIMMER; PARKER, 2011).

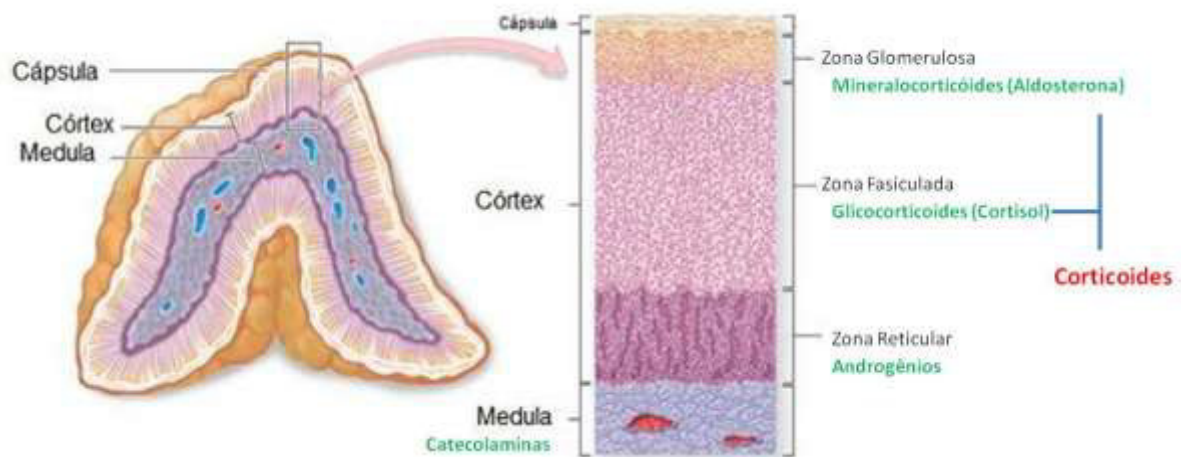


Figura 2. Morfofisiologia das glândulas suprarrenais (adrenais). Fonte: Adaptado de Medicina Geriátrica. Disponível em: <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/glicocorticoide>. A zona fasciculada da glândula suprarrenal (adrenal) é a responsável pela síntese dos glicocorticoides (cortisol), responsável pela manutenção de diversos processos fisiológicos, principalmente imunossupressores e do metabolismo intermediário.

2.2 Hormônios glicocorticoides

Os hormônios GCs são produzidos pelo córtex adrenal, a partir do colesterol e regulado pelo eixo HHA, influenciado, principalmente, por fatores como o ritmo circadiano, o estresse, e a retroalimentação negativa (ANDREWS; WALKER, 1999).

O colesterol, capturado da circulação sob a forma de lipoproteína de baixa densidade (LDL), sofre conversão para pregnenolona, estimulada pelo ACTH, por induzir a ligação do colesterol ao citocromo P450 na região mitocondrial. A pregnenolona deixa a mitocôndria, tornando-se o precursor obrigatório dos corticosteroides e andrógenos adrenais. Ao sofrer

reações de hidroxilação, catalisada por enzimas citocromo-oxidases P450, como a CYP11B1, pode originar os GCs endógenos, como o cortisol, em seres humanos, e a corticosterona em ratos (ANDREWS; WALKER, 1999; TAVES et al., 2011) (**Figura 1**).

Em humanos, a forma ativa desses hormônios é o cortisol livre, que se encontra em três estados no plasma: aproximadamente 70-72 % ligados à globulina transportadora de corticosteroides (CBG), 18-20 % ligados à albumina e, 8-10 % na sua forma livre (YANG; ZHANG, 2004). Esta última fração pode atravessar a membrana celular e interagir com seus receptores intracelulares, exercendo seu papel fisiológico (ANDREWS; WALKER, 1999).

A biodisponibilidade está também relacionada ao processo enzimático no plasma pelas enzimas 11 β -hidroxiesteroide desidrogenases (11 β -HSDs). Suas isoenzimas são proteínas que regulam a transição entre o cortisol, forma ativa livre, e a cortisona, forma inativa livre e sem afinidade ao GR. Fisiologicamente, a isoenzima 11 β -HSD1 converte, no fígado, a cortisona em cortisol, e, a isoenzima 11 β -HSD2, o processo reverso nos rins, abrandando o efeito mineralocorticoide desse hormônio no tecido (COOPER; STEWART, 2009) (**Figura 1**).

Fisiologicamente, os GCs são importantes em situação de estresse, quando eles favorecem a disponibilização de substratos para o metabolismo oxidativo, gerando energia em situações de “fuga” (ANDREWS; WALKER, 1999). A deficiência do cortisol, como na Síndrome de Addison, acarreta hipotensão postural, perda de peso e um quadro de hipoglicemia. Entretanto, em excesso, pode resultar em condições patológicas, como na Síndrome de Cushing, que apresenta sintomas como imunodeficiência, hipertensão arterial sistêmica, aumento da obesidade central e intolerância à glicose (ANDREWS; WALKER, 1999; SAKLATVALA, 2002).

2.3 Farmacologia dos glicocorticoides

2.3.1 Mecanismo de ação

Os receptores de glicocorticoides (GRs) são membros da superfamília de receptores nucleares de hormônios que agem como fatores de transcrição, e são ativados por ligantes. Diferente de outros receptores nucleares, os GRs inativos, localizam-se no citosol, ligados a proteínas de choque térmicos (HSP) (YUDT; CIDLOWSKI, 2001). Essas proteínas dão estabilidade conformacional aos GRs e facilitam a interação com os seus ligantes, os GCs (MENDEL; ORTI, 1988).

Após a ligação do ligante, os GRs dissociam-se de suas proteínas associadas e, ativados, dirigem-se até o núcleo, onde podem exercer suas respostas intracelulares através da interação com sequências específicas de DNA dentro das regiões reguladoras dos genes afetados (KADMIEL; CIDLOWSKI, 2013). Essas regiões específicas do DNA reconhecidas pelo GR ativado, são denominadas elementos responsivos ao glicocorticoide (GREs), que interagem com co-ativadores da transcrição e com proteínas que constituem o aparelho de transcrição basal (**Figura 3**).

Os GREs podem modular a transcrição gênica positivamente (transativação) ou negativamente (transrepressão) (SAKLATVALA, 2002). Os genes associados à transativação, incluem os envolvidos na gliconeogênese, tais como da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*PEPCK*) e a glicose-6-fosfatase (*G6Pase*) (SCHÄCKE et al., 2002), considerados como componentes importantes para o desenvolvimento da hiperglicemia induzida por GCs (RAFACHO et al., 2008). Exemplos de genes regulados negativamente por GREs incluem o gene da prolactina e da pró-opiomelanocortina (precursor de ACTH), esse último explica o efeito de retroalimentação negativa que os GCs exercem sobre o eixo HHA (SAKLATVALA, 2002) (**Figura 3**).

Outro mecanismo que os GCs podem exercer na célula é através da interação do complexo GC-GR diretamente com fatores de transcrição, não envolvendo a ligação com GRE no DNA. Exemplo disso é a interação proteína-proteína entre o GR e os fatores de transcrição *NFκB* (Fator nuclear κB) e *AP-1* (ativador de proteína-1), que regulam a expressão de diversos componentes do sistema imune (DE BOSSCHER et al., 2014) (**Figura 3**). Essas interações reprimem a expressão gênica de diversas citocinas e enzimas pró-inflamatórias, a colagenase e estromelina, associadas à destruição articular observada na artrite inflamatória (VINCENTI; BRINCKERHOFF, 2002). Assim sendo, esses efeitos negativos sobre a expressão gênica contribuem significativamente para os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores dos GCs.

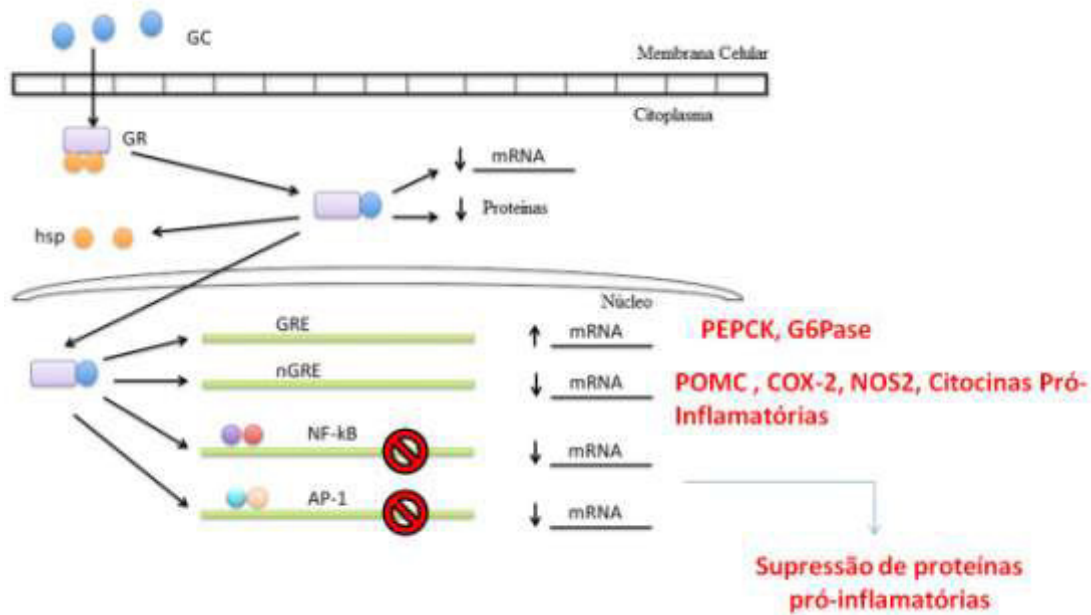


Figura 3. Mecanismo de ação dos glicocorticoides. Fonte: Adaptado de VALERA, TAMASHIRO, ANSELMO-LIMA, 2012. (VALERA; TAMASHIRO; ANSELMO-LIMA, 2012). **GC** – glicocorticoide. **GR** – receptor de glicocorticoide. **PEPCK** – gene fosfoenolpiruvato carboxiquinase. **G6Pase** – gene glicose 6-fosfatase. **POMC** – gene pró-opiomelanocortina. **COX-2** – gene ciclooxigenase tipo 2. **NOS2** – gene óxido nítrico sintase 2. Os glicocorticoides se ligam aos seus receptores (GR) e atravessam o núcleo, podendo exercer suas atividades intracelulares através da interação com sequências específicas de DNA, GRE, modulando positivamente ou negativamente a expressão gênica de determinados genes. Outro mecanismo é a interação do complexo GC-GR diretamente com fatores de transcrição, não envolvendo a ligação com GRE no DNA. Exemplo disso é a interação proteína-proteína entre o GR e os fatores de transcrição *NFκB* (Fator nuclear κB) e *AP-1* (ativador de proteína-1), que regulam a expressão de diversos componentes do sistema imune.

2.3.2 Uso clínico dos glicocorticoides e seus efeitos adversos

O uso de GCs para fins terapêuticos iniciou-se no século XX, quando Hench e colaboradores sintetizaram e testaram, com sucesso, o cortisol em pacientes com artrite reumatoide. Esses estudos abriram caminho para o uso clínico dos GCs sintéticos em uma ampla variedade de doenças, o que impulsionou a pesquisa e o aprimoramento dos análogos sintéticos do cortisol. Os estudos resultaram em fármacos com atividade GC mais acentuada, maior afinidade ao receptor, aumento do tempo de meia-vida, e ainda com redução da atividade mineralocorticoide. Entre os GCs sintéticos mais utilizados atualmente, destacam-se a triancinolona, prednisona e a dexametasona (BENEDEK, 2011).

A dexametasona, bastante utilizada na clínica, apresenta afinidade ao GR cinquenta vezes maior que o cortisol e não sofre a inativação pela enzima 11β -HSD2, o que lhe confere maior biodisponibilidade (SCHÄCKE et al., 2002). Possui diversas aplicabilidades terapêuticas podendo ser usado como anti-inflamatório e imunossupressor (DE BOSSCHER et al., 2014), antiemético em pacientes com câncer (GUPTA et al., 2013; MARANZANO et al., 2005), e para o tratamento de manifestações clínicas mais exacerbadas da artrite

reumatoide (SCHÄCKE et al., 2002). Outro GCs de grande uso clínico é a prednisona, fármaco de ação intermediária e de primeira escolha em diversas patologias (SCHIMMER; PARKER, 2011), possui inúmeras aplicabilidades na prática clínica, dentre elas destacam-se o seu uso como agentes contemporizadores para a doença progressiva da artrite reumatóide aos tratamentos de primeira linha, como em pacientes com síndrome nefrótica secundária, para atenuar as respostas inflamatórias presente nesse quadro (VERONESE et al., 2010), em crises asmáticas graves com doses orais de 30 a 60 mg diárias (CHAPMAN et al., 1991; SCHIMMER; PARKER, 2011), hepatite autoimune (dose inicial 40 a 60 mg/dia) (BELLARY et al., 1995) e no tratamento da sarcoidose (ISRAEL; FOUTS; BEGGS, 1973).

As ações farmacológicas dos GCs nos diferentes tecidos e diversos efeitos fisiológicos são mediados pelo mesmo receptor, assim sendo, os fármacos com atividade GC apresentam efeitos adversos sobre os processos fisiológicos que acompanham sua eficácia terapêutica; essa é uma das razões pelas quais os GCs produzem variados efeitos colaterais quando administrados por longo prazo e/ou em doses suprafarmacológicas. Dentre os efeitos adversos mais importantes podemos citar a obesidade (HIRATA et al., 2012), atrofia muscular (PRELOVSEK et al., 2006), a hipertensão (VAN RAALTE et al., 2013), a síndrome de Cushing (MITCHELL, 2012) e resistência periférica à insulina (BUREN et al., 2008; BUREN et al., 2002; RAFACHO et al., 2008).

2.4 Metabolismo da glicose

2.4.1 Controle da secreção insulínica e o seu papel nos tecidos periféricos

A homeostase glicêmica está intimamente relacionada ao equilíbrio mantido pelo sistema fisiológico entre o consumo de substratos para o metabolismo e o gasto energético, regulado pela ingestão alimentar, como consequência, o estabelecimento do peso corporal, que se mantém relativamente constante por mecanismos de controles envolvendo hormônios (insulina) tecidos periféricos (tecido adiposo) e sistema nervoso central (hipotálamo) (LADYMAN; GRATAN, 2013). Diversos fatores estão relacionados ao controle da homeostasia glicêmica, incluindo diversos hormônios e órgãos como o tecido adiposo, hepático, muscular, sistema nervoso, pâncreas e os intestinos. Dentre os hormônios envolvidos neste controle, a insulina tem papel substancial e sua atividade está relacionada tanto no seu papel nos tecidos periféricos (CZECH et al., 2013), como no controle de sua secreção no pâncreas (LI et al., 2004).

A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pelas células β pancreáticas, sendo a glicose o secretagogo mais importante (LI et al., 2004). A glicose, transportada para o interior da célula β através do transportador de glicose tipo 2 (GLUT-2) presente na membrana plasmática, é metabolizada dentro destas células, aumentando a concentração de ATP. O aumento da razão ATP/ADP induz o fechamento de canais de K^+ sensíveis a ATP, impedindo o efluxo desse íon, causando despolarização da membrana da célula β . Com isso, os canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem abrem-se, promovendo o influxo e aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), resultando na ativação da maquinaria secretória (**Figura 4**) (PRENTKI; CORKEY, 1996).

Essa ativação resulta na exocitose dos grânulos com moléculas de insulina para o meio extracelular, atingindo a corrente sanguínea. A estimulação das células β pela glicose também podem levar à ativação de adenilil ciclase, e isoformas da fosfolipase C (PLC), gerando adenosina monofosfato cíclico (AMPc), inositol 1-4-5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), responsáveis pelo aumento de $[Ca^{2+}]_i$.

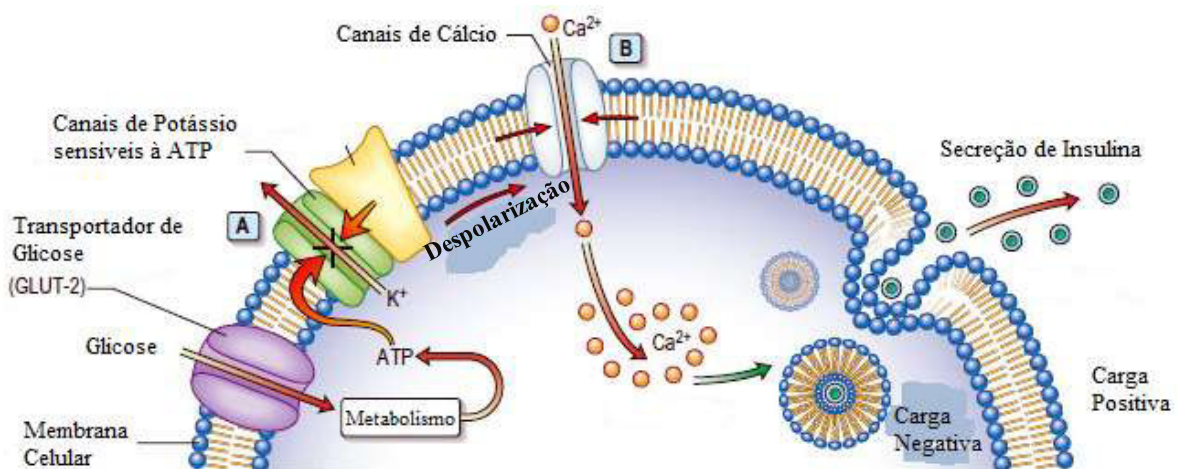


Figura 4. Mecanismo de secreção insulínica em células β pancreáticas. Adaptado de (Medicine Walker).

A insulina requer a ligação ao seu receptor para efetuar sua atividade nos tecidos periféricos responsivos a esse hormônio. O receptor de insulina é uma proteína heterotetramétrica, com atividade quinase intrínseca, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , ligadas por pontes dissulfeto. A subunidade α é responsável pela ligação com a insulina, enquanto a subunidade β , possui uma atividade quinase ativada quando a insulina se liga ao IR (SAAD et al., 1993). Após ativação do mesmo, este promove a fosforilação, em resíduos tirosina, de proteínas citoplasmáticas ancoradas ao mesmo, como os substratos do receptor de insulina (IRSs). Os considerados mais específicos da via insulínica são o IRS1 e

IRS2, que quando fosforilados em tirosina, se ligam e ativam proteínas como a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e a proteína quinase ativada por mitógeno.

Uma das proteínas alvo da PI3K é a proteína serina-treonina quinase Akt, que tem papel importante na homeostase da glicose, no crescimento e sobrevivência celular, além de promover fosforilação de proteínas que regulam a síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas (MANNING; CANTLEY, 2007).

No fígado, a Akt promove a oxidação da glicose e o seu armazenamento como glicogênio pela indução enzimática, respectivamente da piruvato quinase (PK) e glicogênio quinase (GK) (FRAME; COHEN, 2001) e inibe a gliconeogênese e glicogenólise, o que reduz a produção hepática de glicose (MICHAEL et al., 2000); estimula ainda, a síntese hepática de lipídeos (WIGGINS; GIBBONS, 1992).

Nos tecidos muscular e adiposo, a insulina é importante para promover a captação de glicose; sua utilização como fonte energética, bem como a estocagem do excedente na forma de glicogênio (FRAME; COHEN, 2001). A captação de glicose nestes tecidos depende da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a superfície da célula que é estimulada pela Akt; além disso, esta inibe a lipólise no tecido adiposo branco, através da inibição da lipase hormônio sensível (LHS) (CAPURSO; CAPURSO, 2012). A **Figura 5** representa a sinalização da insulina e o seu papel nos tecidos responsivos.

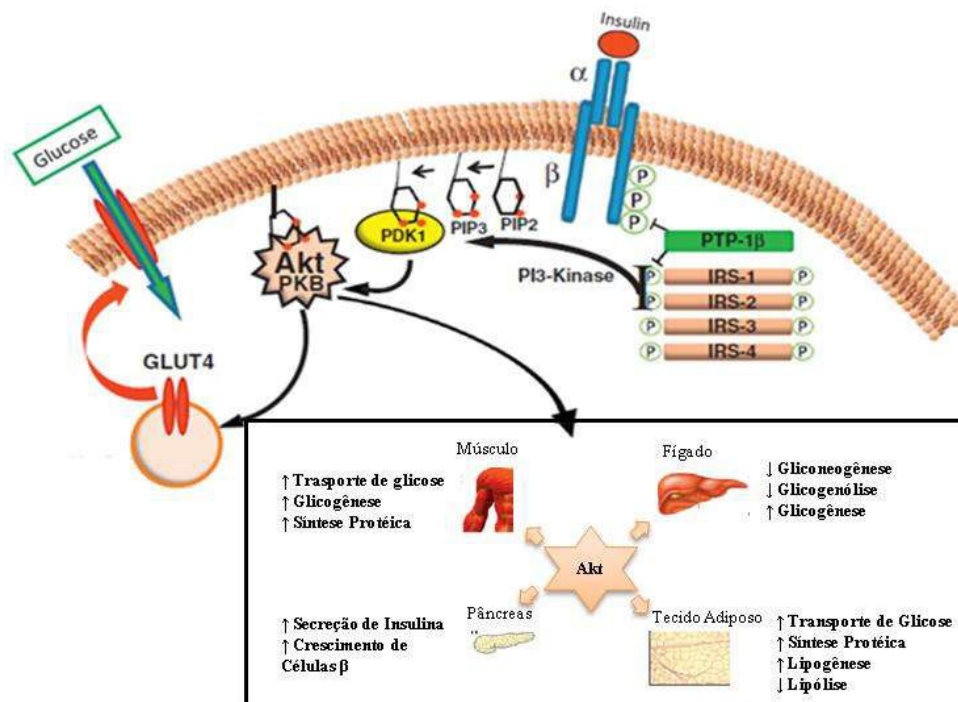


Figura 5 – Sinalização Insulínica e seus efeitos em tecidos responsivos. Adaptado de CAPURSO; CAPURSO, 2012. (CAPURSO; CAPURSO, 2012).

2.4.2 *Controle da síntese de triglicerídeos pela insulina*

O metabolismo dos lipídios é influenciado pela ação de duas enzimas: a lipase hormônio sensível (HSL) e a lipase de lipoproteínas (LLP). A primeira atua sobre o tecido adiposo, hidrolisando triglicerídeos (TG) armazenados, resultando em glicerol e ácidos graxos livres (AGLs), e é utilizada quando estes são necessários para serem incorporados nas membranas ou para seguirem na via da β -oxidação ou ainda entrar no núcleo e agir como ativadores ou inibidores da expressão gênica. A LLP, localizada nas células endoteliais, age sobre os quilomícrons e lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL), hidrolisando TG e fosfolipídios, que são armazenados nos tecidos adiposo e muscular (AHMADIAN; WANG; SUL, 2010). A insulina reside sobre a inibição da LHS nos adipócitos, evitando que os triacilgliceróis armazenados sejam hidrolisados em AGLs e se difundam na circulação, bem como na estimulação da oxidação da glicose que fornece glicerolfosfato para a síntese de TG (LANGIN; HOLM; LAFONTAN, 1996).

A insulina também é responsável pela regulação da exportação hepática de TG para a corrente sanguínea, pois a ativação da Akt medeia a expressão da proteína microsomal de transferência de triacilgliceróis (MTP), a qual é responsável pela montagem e síntese de partículas de VLDL no retículo endoplasmático de hepatócitos (KAMAGATE et al., 2008). Uma vez exportados, os TGs podem ser hidrolisados pela LLP e captados para serem armazenados no tecido adiposo branco e no músculo, sendo assim, o equilíbrio entre as taxas de secreção hepática de TG e a sua captação periférica, mantém constante a trigliceridemia. Quando ocorre um influxo aumentado de AGLs, o fígado pode aumentar a esterificação ou a oxidação destes. Entretanto, se houver limitação na taxa de oxidação, o tecido pode aumentar a síntese e exportação hepática de VLDL, e como consequência, hipertrigliceridemia (WIGGINS; GIBBONS, 1992) (**Figura 6**).

É também importante frisar que uma das funções metabólicas centrais do fígado é manter os níveis normais de glicose no plasma, independentemente do estado nutricional do animal ou do homem. No estado de hiperglicemia e com quantidade de ATP suficiente, a glicose é convertida em AGLs, que são esterificados a TG, e secretados para a circulação na forma de VLDL, ocasionando o aumento de TG-VLDL (WIGGINS; GIBBONS, 1992). Além disso, nos estados de RI, a maior oferta de glicose e insulina, aumentam a expressão, respectivamente, de proteína ligante do elemento regulador por carboidratos (ChREBP), e de proteína ligante do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c) (COHEN; HORTON; HOBBS, 2011). Sinergicamente, as ações de SREBP-1c e ChREBP, ativam a maquinaria

enzimática necessária para a conversão do excesso de glicose em AGLs (YAMASHITA et al., 2001) (Figura 6).

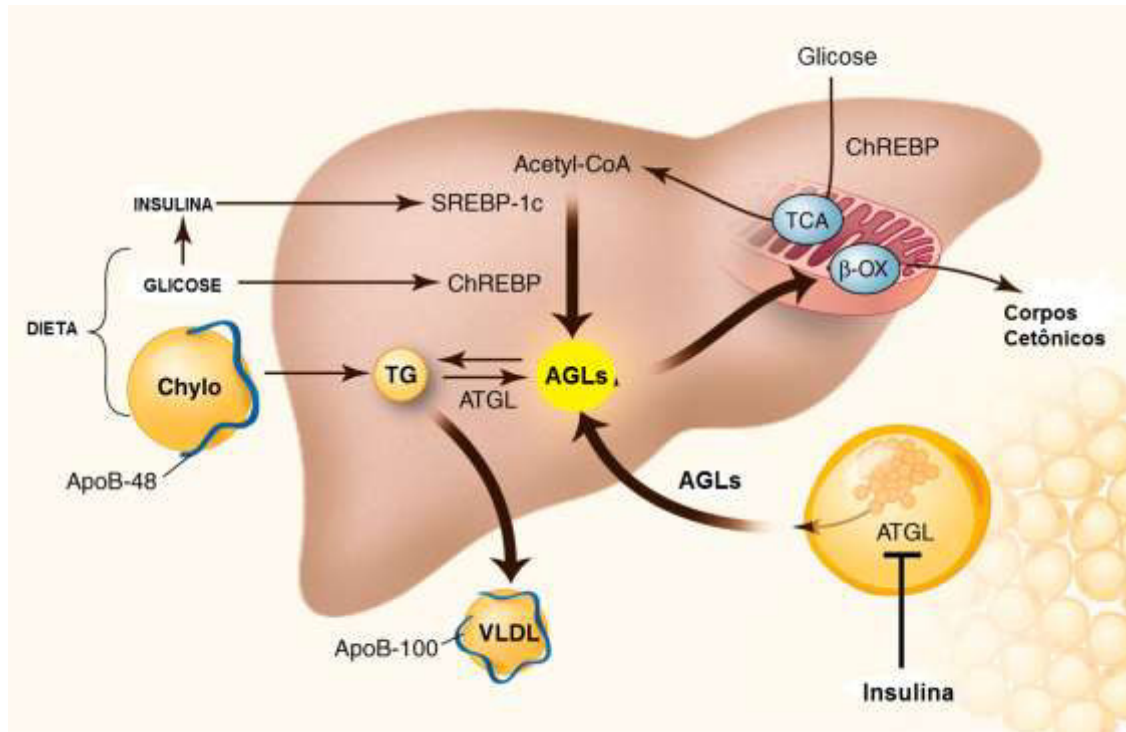


Figura 6 - Glicose em excesso, hiperinsulinemia e maior aporte de AGLs para o fígado contribui para uma maior síntese de VLDL hepática. Adaptado de (COHEN et al., 2011).

2.5 Efeitos diabetogênicos dos glicocorticoides

Estudos em tecido adiposo branco de roedores demonstraram uma redução da fosforilação do IRS-1 e IRS-2, bem como da Akt após tratamento com dexametasona, diminuindo a captação de glicose nesse tecido (CAPERUTO et al., 2006). Em estudos feitos com adipócitos isolados de ratos, com a presença de dexametasona, demonstrou-se a diminuição da expressão proteica de PI3K e da Akt total e fosforilada (BUREN et al., 2002). Além disso, demonstrou-se que em TAB *ex vivo*, há uma maior lipólise em tecido de animais tratados com dexametasona (NUNES et al., 2013), sugerindo uma maior liberação de AGLs para a circulação.

O tratamento com dexametasona também foi capaz de aumentar a expressão da enzima glicogênio sintase fosforilada em músculo esquelético, sugerindo uma atenuação da síntese de glicogênio nesse tecido (KUO et al., 2012), e reduziu a captação de glicose estimulada por insulina em músculo esquelético de ratos (BUREN et al., 2008). Em culturas de mioblastos, incubados com dexametasona, tiveram uma redução significativa da

fosforilação no resíduo serina 473 da Akt, no resíduo treonina 389 da S6K e aumento da fosforilação no resíduo serina 307 do IRS-1 (KUO et al., 2012), resultando no comprometimento da sinalização insulínica nessas células, prejudicando a captação de glicose.

Em tecido hepático, o tratamento de ratos com dexametasona está associado à redução da fosforilação do IRS-1 e da atividade da PI3K (SAAD et al., 1993), contribuindo, assim, para uma diminuição da ativação da Akt. Como consequência, há um aumento da expressão hepática das enzimas da gliconeogênese, tais como a PEPCK e G6Pase, resultando no aumento de produção hepática de glicose, mesmo com hiperinsulinemia, caracterizando, assim, uma resistência insulínica hepática (YABALURI; BASHYAM, 2010).

Os vários efeitos dos GCs na secreção de insulina podem ser, em parte, dependente da dose e da duração da administração. No pâncreas, foi identificado GR em células β , sugerindo efeito direto sobre a secreção de insulina e transcrição gênica, sendo reprimida a secreção *in vitro* de insulina em ilhotas incubadas com dexametasona (JEONG et al., 2001). Por outro lado, observou-se aumento da secreção de insulina, em resposta a concentrações de glicoses supraliminares, em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos submetidos a tratamento agudo com alta dose de dexametasona (1 mg/Kg) (RAFACHO et al., 2008). Estes dados sugerem que o aumento da secreção de insulina observada implica em certo grau de adaptação da ilhota, que pode ser associada à redução da captação de glicose nos tecidos periféricos, resultando no aumento sérico de glicose, importante secretagogo insulínico (LI et al., 2004).

Outro GC bastante utilizado na prática clínica, a prednisona, apresenta alguns estudos da relação de seu uso com efeitos adversos no metabolismo da glicose. A administração de altas doses de prednisona em crianças com leucemia linfoblástica aguda promoveu RI, representado pelo HOMA-IR (CHOW et al., 2013), bem como, foi observado hiperglicemia pós-prandial em pacientes adultos com artrite reumatoide que faziam uso de baixas doses de prednisolona, metabólito ativo da prednisona (BURT et al., 2012).

Porém, existem poucas evidências sobre o impacto metabólico promovido por tratamentos prolongados com GC nos tecidos periféricos envolvidos na manutenção da homeostase da glicose, principalmente com a prednisona, que tem ação intermediária e que vem a ser de primeira escolha de sua classe farmacológica em diversas aplicabilidades terapêuticas (SCHIMMER; PARKER, 2011). Desta forma, buscamos investigar as alterações promovidas pela prednisona sobre o metabolismo da glicose (que são similares entre humanos e roedores), e relacionar suas magnitudes com as alterações ocasionadas pela dexametasona, GC que, sabidamente, provoca alterações metabólicas significativas. Além disso, esperamos

contribuir com a expansão do conhecimento sobre esse fármaco com grande importância clínica.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar parâmetros morfofuncionais relacionados à homeostase glicêmica em ratos tratados com dexametasona ou prednisona.

3.2 Específicos

- Determinar o crescimento corpóreo dos ratos ao longo do tratamento agudo com dexametasona e crônico com prednisona;
- Determinar o peso de órgãos relacionados ao metabolismo energético após o tratamento;
- Avaliar a homeostasia glicêmica por meio da determinação da glicose sanguínea e da insulina plasmática de ratos após o tratamento;
- Quantificar a gordura hepática, bem como os níveis de triglicerídeos sérico e hepáticos de ratos após o tratamento;
- Avaliar a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, bem como a capacidade secretória de insulina *in vitro* após o tratamento.

Artigo de Pesquisa Original

Exposição à prednisona em médio prazo é menos prejudicial que à dexametasona em curto prazo para a homeostase da glicose em ratos.

Autores

Danylo Noleto de Sousa **Melo**^{1,2}, Karla Frida Torres **Flister**^{1,2}, Nathalee Liberal Xavier **Ribeiro**^{1,2}, Jonas Rodrigues **Sanches**^{1,2}, Lucas Martins **França**^{1,2}, Luciana Mateus **Gonçalves**³, Ana Paula Gameiro **Cappelli**^{1,2}, Everardo Magalhaes **Carneiro**³, Alex **Rafacho**⁴, Iracelle Carvalho **Abreu**^{2,5}, Antonio Marcus de Andrade **Paes**^{1,2*}

Afiliações

1. Laboratório de Fisiologia Experimental, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.
2. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.
3. Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
4. Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.
5. Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

*Autor Correspondente

Antonio Marcus de Andrade Paes, PhD.

Laboratório de Fisiologia Experimental – DCF/CCBS

Avenida dos Portugueses, 1966

Cidade Universitária

65.080-850 São Luís, MA, Brazil

E-mail: marcuspaes@ufma.br

Phone: +55 (98) 3272 8557

PERIÓDICO:

Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology

Fator de Impacto: 3,985

Qualis – Medicina I: A2

RESUMO

Introdução: Os glicocorticoides (GCs) sintéticos induzem diversos efeitos adversos quando administrados em doses elevadas, entre eles, resistência insulínica periférica, intolerância à glicose, e alterações no metabolismo lipídico, especialmente hipertrigliceridemia. Porém existem poucos estudos sobre o impacto metabólico promovido por tratamentos prolongados com GC. Diante disso, buscamos verificar as alterações metabólicas ocasionadas pelo tratamento subcrônico com prednisona em ratos e compará-los aos efeitos presentes e conhecidos em modelo agudo de indução de resistência insulínica pela dexametasona.

Métodos: Ratos *Wistar* com 90 dias de vida foram tratados com dexametasona (D5) (1 mg/Kg i.p.) durante 5 dias consecutivos e, os seus controles (C5) com salina, e ratos *Wistar* com 60 dias de vida foram tratados com prednisona (80 mg/Kg v.o.) durante 15 dias (P15) e 30 dias (P30) consecutivos e, os seus respectivos controles (C15 e C30), receberam veículo para avaliação dos parâmetros.

Resultados: Os ratos D5 apresentaram redução do peso corpóreo (12,3%) e menor peso da gordura retroperitoneal (38%), aumento das concentrações de glicose em jejum (12%) e alimentado (30%), insulina (80%) e triglicérides (339%) ($p < 0,05$). O conteúdo de gordura total hepática, bem como triglicérides e colesterol hepático foram 29%, 52% e 65% maiores nos ratos C5, em relação aos ratos C5 ($p < 0,05$). Os ratos P15 apresentaram um ganho de peso 61% menor, redução da gordura retroperitoneal (29%) e aumento nas concentrações de triglicérides (60%), em relação aos ratos C15 ($p < 0,05$). Enquanto os ratos P30 apresentaram um ganho de peso 44% menor, redução da gordura retroperitoneal (25%) e aumento nas concentrações de triglicérides (78%) e gordura total hepática (26%), em relação aos ratos C30 ($p < 0,05$). Os testes *in vivo* revelaram a presença de intolerância à glicose (GTT) nos ratos D5 e P30 e redução a sensibilidade à insulina (ITT, HOMA, TyG) nos animais D5, P15 e P30 ($p < 0,05$). O teste *ex vivo* revelou maior sensibilidade de nas ilhotas pancreáticas frente à glicose de ratos D5.

Conclusão: A administração subcrônica de prednisona promoveu alterações metabólicas mais sutis na homeostasia da glicose, quando comparada à administração aguda de dexametasona, sugerindo assim, o uso preferencial da prednisona quando se pretenda minimização dos efeitos adversos metabólicos associados ao uso de GCs.

Palavras-chave: dexametasona, prednisona, homeostase da glicose, sensibilidade à insulina, secreção insulínica, hipertrigliceridemia.

4. INTRODUÇÃO

Os glicocorticoides (GCs) sintéticos tornaram-se a terapia mais comum para distúrbios alérgicos, auto-imunes e inflamatórias, sendo utilizados em cerca de 2% da população adulta ocidental [1, 2]. Mimetizando os GCs endógenos, isto é, o cortisol nos seres humanos e corticosterona em roedores, os GCs sintéticos interagem com o receptor de glicocorticoide para formar um complexo de receptor de glicocorticoide-glicocorticoide, que em última análise modula a expressão do gene alvo através de vias de sinalização genômicas e não genômicas [3, 4]. Cerca de 1% do genoma é regulado positiva ou negativamente por GCs [5], retratando a amplitude da ação glicocorticoide, mas também antecipando a profundidade dos efeitos adversos que vêm com o uso terapêutico dos GCs sintéticos.

A exposição prolongada e/ou excessiva ao GC sintético tem efeitos adversos prejudiciais sobre a homeostase da glicose, consequente do aumento da gliconeogênese, glicogenólise e lipólise [6], bem como deficiência na sinalização de insulina, que causam resistência insulínica (RI) periférica [7]. O excesso de GC eleva os níveis de ácidos graxos livres na circulação, que representam a distribuição de gordura ectópica ao fígado, músculos e adipócitos centrais. O aumento da taxa de captação hepática de ácidos graxos acrescenta-se a RI hepática e à lipogênese *de novo* para promover maior montagem e secreção de partículas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), o que resulta em hipertrigliceridemia [8]. Paralelamente, a disglícemia resultante é tentativamente compensada pelo aumento da secreção de insulina, que leva a hiperinsulinemia [9]. A susceptibilidade individual para efeitos colaterais dos GCs sintéticos varia amplamente na população em geral e parece assim ser, pelo menos em parte, relacionada com polimorfismos em *NR3C1*, o gene que codifica o receptor GC [10]. Não obstante, pode também depender da afinidade e potência diferente do GC sintético aplicado clinicamente.

A potência farmacológica dos GCs sintéticos é dependente de fatores como a taxa de absorção, biodisponibilidade, afinidade para o receptor GC, taxa de metabolismo do fígado e depuração renal subsequente. A taxa de ligação às proteínas plasmáticas tem importante impacto sobre a meia-vida dos GCs, variando de 80 minutos para o cortisol a 270 minutos para a dexametasona. Aproximadamente 90% de cortisol em circulação é fortemente ligado à proteína plasmática globulina ligadora de glicocorticoide (CBG), enquanto GCs sintéticos, com exceção da prednisolona, apresentam baixa afinidade para tal globulina e são predominantemente ligada à albumina [11]. O uso prolongado ou de doses elevadas de GCs sintéticos estão associados a vários efeitos adversos, tais como atrofia muscular [12], aumento

da deposição de gordura visceral [13] e desordens metabólicas, tais como o desequilíbrio da homeostasia de glicose, incluindo RI, intolerância à glicose, e diabetes *mellitus* tipo 2 [11, 13, 14].

Diversos estudos têm verificado as consequências metabólicas de altas doses de GC sintético. A administração de dexametasona (1 mg/kg) por 5 [9, 15] ou 11 [14] dias consecutivos causou RI, hiperinsulinemia associada e hipertrigliceridemia, que foram acompanhadas ou não por hiperglicemia [9]. Hoje em dia, está bem estabelecido que a dexametasona induz intolerância à glicose, dislipidemia e RI [13, 16, 17]. No entanto, a dexametasona também promove uma fraqueza muscular e significativa imunossupressão devido a sua elevada potência farmacológica [18]. Apesar dos fatores acima mencionados, há dados escassos sobre impacto diferencial de GCs sintéticos distintos em alvos metabólicos, particularmente a homeostase da glicose. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição a médio prazo à prednisona, um GC sintético de potência intermediária, mas amplamente utilizado em vários regimes terapêuticos [2], na homeostase da glicose, em comparação com a administração a curto prazo da dexametasona, altamente potente .

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais e desenho experimental

Ratos machos *Wistar* foram obtidos a partir do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão e mantidos a 21 ± 2 ° C em um ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 07:00, luzes apagadas às 19:00), com acesso livre a comida e água. Os animais foram divididos em 3 diferentes protocolos e tratados entre 07:30 e 08:30 da manhã como segue: (1) Os animais com 90 dias de idade foram tratados por via intraperitoneal durante 5 dias consecutivos com **dexametasona** (Decadron®, Aché, Campinas, SP, Brasil) (1 mg/kg/dia , n = 9, **grupo D5**) ou solução **0,9 % de NaCl** (1 mL/kg/dia, N = 8, **grupo C5**); (2) Os animais com 60 dias de idade tratados por via oral durante 15 dias consecutivos com **prednisona** (80 mg/kg/dia, N = 7, **P15 grupo**) ou **solução veículo** (água 25% de sorbitol, 0,1% de sacarina de sódio, 0,05% de estabilizador de metabissulfito, destilada, pH <4,5, 1 mL/kg/dia, N = 7, **grupo C15**), e (3) Animais com 60 dias de idade foram tratados de uma forma semelhante ao protocolo de 2, mas com duração de 30 dias consecutivos, gerando grupos **P30** e **C30**, com n

= 8-10. O peso corporal e a ingestão de alimentos dos animais foram medidos a cada dia para grupos C5 e D5 ou três vezes por semana durante C15, P15, P30 e grupos C30. Durante os períodos de tratamento, os animais foram submetidos a testes de tolerância à glicose ou de insulina como descrito adiante. No final do tratamento, os ratos foram sacrificados, sob anestesia (37 % de cetamina/ 5 % de xilazina), após um jejum *overnight* para coleta de amostra de sangue por punção da aorta abdominal. Fígado, pâncreas, músculo esquelético gastrocnêmio e sóleo, bem como os coxins de gordura retroperitoneal, mesentérica e periepididimal foram recolhidos para avaliação morfométrica ou procedimentos experimentais descritos adiante. Os dados morfométricos foram expressos como a massa de tecido (g) por 100 g de peso corporal (% PC). Os protocolos experimentais adotados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão, sob protocolo N°. 23115.012396/2011.

5.2. Avaliação bioquímica sérica

As amostras de sangue foram recolhidas em tubos com ou sem anticoagulante (ácido etilenodiamina tetra-acético, EDTA, 30 mM mg / ml) para permitir a separação do plasma ou do soro a partir de todos os grupos. O soro foi utilizado para a medição espectrofotométrica de triglicerídeos (TG) usando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O plasma foi aplicado para a medição dos níveis de insulina por radioimunoensaio (RIA) utilizando a insulina humana radiomarcada com I^{125} como traçador, insulina de rato como padrão (Crystal Chem Inc., Downers Grove, IL, EUA) e anticorpo de insulina de rato (doado pelo Dr. Leclercq-Meyer, da Universidade de Bruxelas, Bélgica), como previamente descrito [19]. RI foi inferida a partir do cálculo do Índice de TyG ($TyG = \ln [\text{triglicerídeos em jejum (mg / dL)} \times \text{glicemia de jejum (mg / dL)} / 2]$) [20], e modelo de avaliação da homeostase (HOMA), o Índice de resistência à insulina HOMA-IR ($HOMA-IR = \text{insulina em jejum (U / mL)} / \text{glicose em jejum (mM)} / 22,5$) [21].

5.3. Teste de tolerância à glicose e à insulina

Ao final dos tratamentos, foram utilizados ratos em jejum *overnight* para o experimento de teste oral de tolerância à glicose (*voGTT*). Ratos conscientes tiveram sua ponta da cauda cortada para a coleta de sangue. A primeira gota foi rejeitada e o segundo foi usado para a determinação dos valores de glicemia (tempo 0) usando um glicosímetro (Accu-

Check Active, Roche Diagnostic, Alemanha). A solução de glicose 50% (4 g/kg PC, por via oral) foi imediatamente administrada, e amostras de sangue foram coletadas da ponta da cauda aos 30, 60 e 120 min após para medições de glicose no sangue. A área sob a curva (AUC) dos níveis de glicose durante *vo*GTT foram calculadas como anteriormente descrito [22]. Do mesmo modo, foram utilizados por protocolos separados de ratos alimentados para o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (*ip*ITT). Após a coleta de sangue da ponta da cauda no tempo 0, os animais foram injetados com insulina humana recombinante (Humulin 70N/30R) (1 UI/kg PC, Lilly, Indianapolis, IN, EUA) e amostras adicionais foram colhidas aos 15, 30, 45 e 60 min após para medição de glicose no sangue. A AUC da glicose durante *ip*ITT foi calculada como previamente descrito [22] e foi utilizado como uma medida da sensibilidade à insulina em tecidos periféricos [23-25].

5.4. Secreção de triglicerídeos hepático

No final de cada protocolo, ratos em jejum de 8 h foram anestesiados para coleta de amostras de sangue venoso (0,2 mL) retro-orbital antes e 30, 60, 120, e 240 minutos após a administração de uma dose intravenosa de 20% (v/v) de Triton WR1339 (200 mg/kg, Sigma, St. Louis, MO, EUA). A determinação de TG no soro foi efetuada como descrito acima. A taxa de síntese e secreção TG foi avaliada como a diferença das concentrações séricas de TG entre o final (4h) e tempos iniciais (0h) [26].

5.5. Extração e quantificação de gordura hepática

As amostras de fígado (~ 500 mg de cada) foram homogeneizadas em 5 mL de solução de clorofórmio / metanol (2:1), e mantidas *overnight* a 4 °C. O sobrenadante resultante foi filtrado, adicionado a 0,9% de NaCl (solução salina 1:5 filtrado), agitado e deixado em repouso durante 2 h. As fases de clorofórmio e metanol foram separadas por centrifugação (1000 rpm, 5 min) e uma alíquota de 1 mL da fase de clorofórmio foi recolhida e seca a 40 °C em uma estufa com fluxo de ar. A gordura seca foi pesada e novamente suspensa em 1 mL de Triton- X100/Metanol (2:1) para a medição espectrofotométrica de TG, tal como descrito acima. Os resultados foram expressos como gordura total do fígado (mg) por massa de tecido (g), e triglicerídeos no fígado (mg) por massa de tecido (g) [27].

5.6. Isolamento de ilhotas pancreáticas e ensaio de secreção estática de insulina

As ilhotas do pâncreas dos grupos C5, D5, C30 e P30 foram isoladas pela sua digestão com colagenase de tipo V (0,8 mg / mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), como previamente descrito [28]. Para os ensaios de secreção estática de insulina, pelo menos, quatro grupos de quatro ilhotas por animal foram pré-incubados em 24 poços de placas durante 45 min a 37 ° C em 1 ml de tampão de Krebs-Hepes (NaCl 115 mM; KCl 5 mM, CaCl₂ 2,6 mM, MgCl₂ 1 mM, NaHCO₃ 10 mM, HEPES 15 mM, suplementado com glicose 5,6 mM e 3 g/L de BSA) em ambiente controlado (95% O₂ + 5% de CO₂). Depois, o meio de incubação foi substituído com tampão fresco contendo 5,6 ou 16,7 mM de glicose e incubadas durante uma hora adicional. No final, as placas foram arrefecidas em banho de gelo e os sobrenadantes recolhidos e adequadamente armazenado a -20 ° C para a medição posterior das concentrações de insulina por RIA, como anteriormente descrito [19].

5.7. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. e analisados pelo teste *t* de Student para comparação dos grupos dentro do mesmo protocolo para um nível de significância de $p < 0,05$, tal como avaliado pelo software GraphPad Prism 5.0[®].

6. RESULTADOS

6.1. Ganho de peso, consumo alimentar e parâmetros morfométricos

Como mostrado na Figura 7A, a administração da dexametasona durante 5 dias consecutivos causou perda de peso consistente em D5 ($357,2 \pm 5,6$ vs. $313,2 \pm 7,4$ g, $p < 0,001$), em comparação com o C5 ($348,6 \pm 5,0$ vs. $362,1 \pm 7,2$ g). A perda de peso D5 foi acompanhada por uma diminuição de 24,6% do consumo alimentar, ao passo que não foi observada nenhuma diferença na ingestão de alimentos em C5 (Figura 7B). Por outro lado, a administração de prednisona não afetou a ingestão alimentar dos ratos dos grupos de P15 e P30, em comparação com os respectivos controles (C15 e C30) (Figura 7D). Notavelmente, ratos tratados com prednisona (P15/30) não perderam peso. Em vez disso, eles mostraram consistente ganho de peso, atingindo aproximadamente a metade do ganho observado nos seus controles (C15/30), $p < 0,001$ (Figura 7C). A fim de verificar o impacto do tratamento

com dexametasona (D5) ou prednisona (P15 e P30) em parâmetros morfométricos, foram medidos o peso relativo do fígado, pâncreas, de porções do tecido adiposo e dos músculos esqueléticos (gastrocnêmio e sóleo). Como mostrado na Tabela 1, os fígados dos animais D5 eram 25% mais pesados que dos C5, enquanto a gordura retroperitoneal foi reduzida em 37,8%, $p < 0,05$. Não observou-se qualquer efeito sobre os outros parâmetros. No que se refere aos ratos tratados com prednisona, o único efeito morfométrico observado foi uma diminuição da gordura retroperitoneal de 28,1 e 24,0% em P15 e P30, respectivamente, $p < 0,05$.

6.2. Perfil bioquímico sérico

Cinco dias de administração de dexametasona prejudicou significativamente a homeostasia da glicose de ratos D5, que mostraram níveis mais elevados de glicose no sangue, tanto nos estados em jejum (C5, $102,9 \pm 2,5$ vs. D5, $114,9 \pm 3,6$ mg/dL, $p < 0,05$) quanto alimentado (C5, $102,7 \pm 2,5$ vs. D5, $134,0 \pm 7,1$ mg/dL, $p < 0,05$), ao passo que não foi observada alteração nos níveis de glicose de ratos tratados com prednisona, apesar da duração do tratamento (Figuras 8A e 8B). Por outro lado, os dois tratamentos de dexametasona e prednisona aumentaram os níveis de TG em jejum em todos os grupos (C5, $26,97 \pm 2,2$ vs. D5, $118,6 \pm 22,27$ mg/dL, $p < 0,01$; C15, $58,84 \pm 4,64$ vs. P15, $93,87 \pm 12,69$ mg/dL, $p < 0,05$; C30, $77,35 \pm 7,80$ vs. P30, $137,3 \pm 10,10$ mg/dL, $p < 0,001$, Figura 8C). Apenas o tratamento com dexametasona induziu hiperinsulinemia (C5, $0,50 \pm 0,04$ vs D5, $0,99 \pm 0,12$ ng/mL, $p < 0,01$, Figura 8D), assim como a resistência periférica à insulina, como foi demonstrado por um aumento de quase 60% no índice HOMA-IR (Figura 8F). No entanto, a avaliação da resistência à insulina pelo cálculo do índice TyG mostrou diferença significativa em relação aos animais controles em ambos glicocorticoides (Figura 8E).

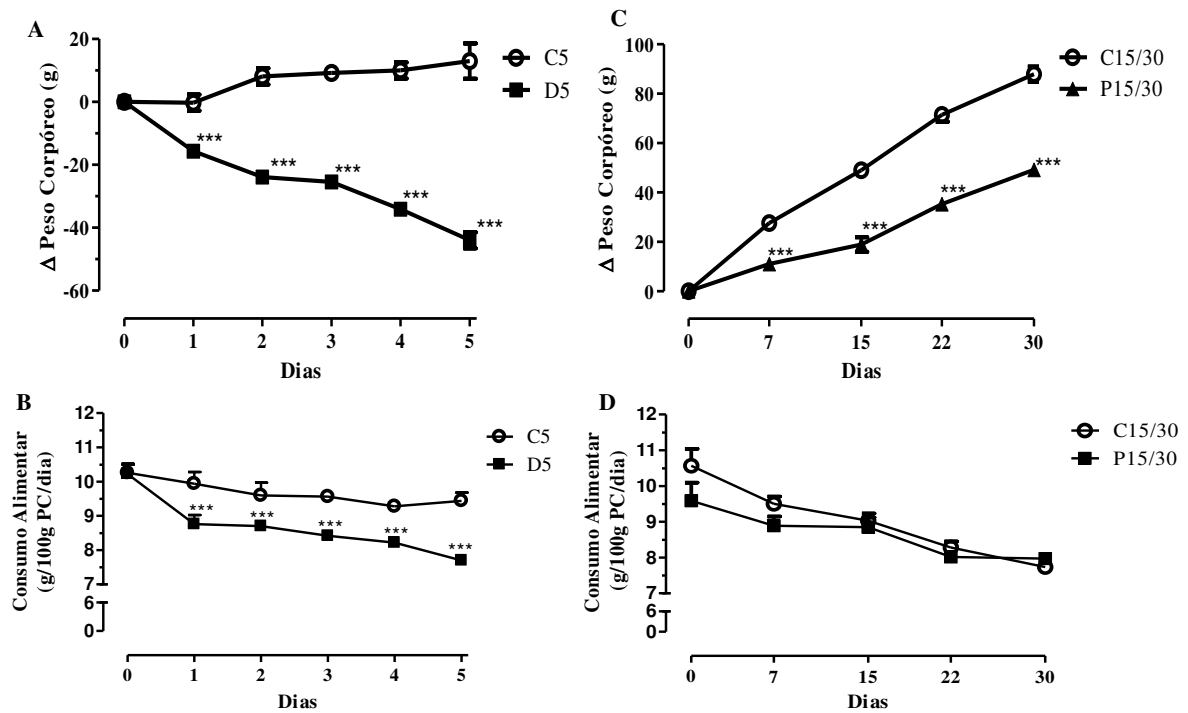


Figura 7. Evolução Ponderal e Consumo Alimentar de ratos tratados com dexametasona ou prednisona. Ratos *Wistar* com 90 e 60 dias de idade foram tratados, respectivamente, com dexametasona (1 mg/Kg/dia i.p., durante 5 dias consecutivos) (A e B) e com prednisona (80 mg/Kg/dia v.o., durante 15 e 30 dias consecutivos) (C e D). Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. (A e B)(n= 8-9); (C e D) (n= 7, tratados por 15 dias e n=12, tratados por 30 dias). *** indica diferença estatística em relação aos seus respectivos grupo controle com Test t, $p < 0,001$.

Tabela 1. Parâmetros morfológicos de ratos tratados com dexametasona, prednisona e seus controles.

	C5	D5	C15	P15	C30	P30
Parâmetros Morfológicos						
(^ag/100g PC, ^bmg/100 g PC)						
Fígado ^a	2,83 \pm 0,05	3,55 \pm 0,09***	3,07 \pm 0,08	2,98 \pm 0,10	3,18 \pm 0,05	3,18 \pm 0,05
Pâncreas ^b	438,5 \pm 28,4	369,7 \pm 24,4	556,2 \pm 29,2	453,2 \pm 39,3	533,2 \pm 26,2	490 \pm 21,7
Músculo Gastrocnêmio ^b	529,1 \pm 33,9	563 \pm 28,7	577,4 \pm 18,6	607,6 \pm 14,8	597,9 \pm 14	670,2 \pm 32,9
Músculo Sóleo ^b	43,6 \pm 5,3	40,9 \pm 1,84	38,4 \pm 2,7	47,2 \pm 2,2*	61,6 \pm 10,2	81,1 \pm 14,9
Gordura Retroperitoneal ^b	802,6 \pm 101,2	499,4 \pm 69,0*	1009 \pm 89,8	720,9 \pm 50,4*	911,8 \pm 55,4	692,9 \pm 60,1*
Gordura Periepídimal ^b	840,6 \pm 92,3	758,5 \pm 114,1	1037 \pm 68,4	1233 \pm 96,8	969,3 \pm 56,4	954,3 \pm 3
Gordura Mesentérica ^b	738,5 \pm 26,2	746,8 \pm 52,6	748,2 \pm 41,9	822,1 \pm 82	898,8 \pm 41	876 \pm 57,8

C5 e D5 - Grupos tratados, respectivamente, com salina (0,1mL/100 g/dia, i.p.) e dexametasona (1 mg/Kg/dia, i.p.) durante **5 dias**, n= 8-9.

C15 e P15 - Grupos tratados, respectivamente, com veículo (0,1 mL/100 g/dia, v.o.) e prednisona (80 mg/Kg/dia, v.o.) durante **15 dias**, n= 7.

C30 e P30 - Grupos tratados, respectivamente, com veículo (0,1 mL/100 g/dia, v.o.) e prednisona (80 mg/Kg/dia, v.o.) durante **30 dias**, n= 12.

Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. * Indica diferença estatística em relação aos seus respectivos grupo controle com Test t, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

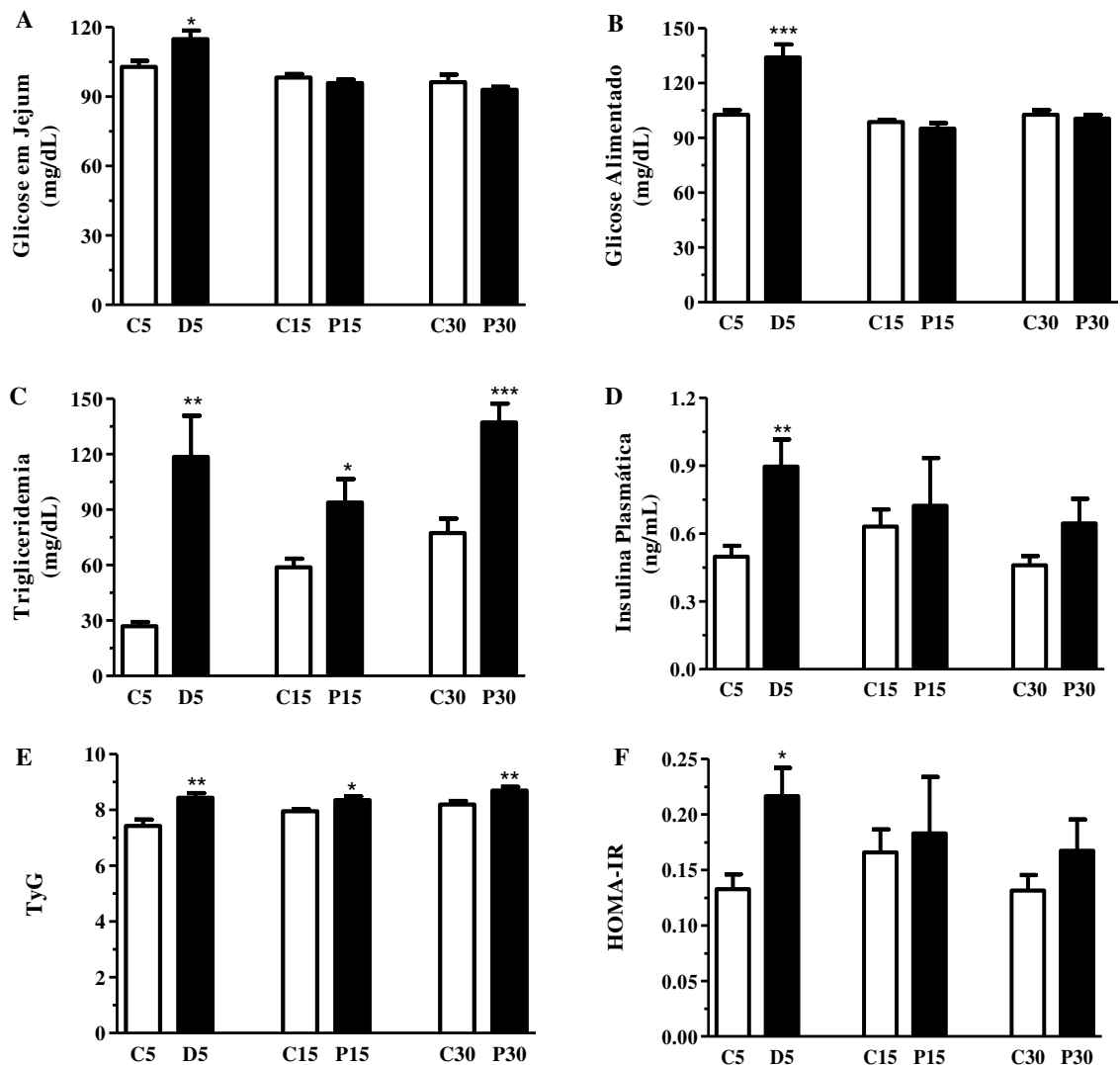


Figura 8. Parâmetros bioquímicos séricos, de resistência insulínica e perfil lipídico hepático de ratos tratados com dexametasona ou com prednisona. C5 e D5- ratos tratados, respectivamente, com salina (0,1 mL/100 g, i.p.) e dexametasona (1 mg/Kg, i.p.) durante 5 dias consecutivos, n= 8-9; C15 e P15 – ratos tratados, respectivamente, com veículo (0,1 mL/100 g, v.o.) e prednisona (80 mg/mL, v.o.) durante 15 dias, n= 7; C30 e P30 – ratos tratados, respectivamente, com veículo (0,1 mL/100 g, v.o.) e prednisona (80 mg/mL, v.o.) durante 30 dias, n= 12. Os níveis de glicose em jejum (A), triglicerídeos sérico (C) e insulina plasmática (D) foram medidos em amostras de sangue colhidas a partir de um jejum noturno. A glicose alimentar (B) foi medida em amostra de sangue após alimentação noturna. Os índices para inferir resistência insulínica TyG (E) e HOMA-IR (F) foram calculados a partir dos níveis de jejum de glicose e de triglicerídeos, e dos níveis de jejum de glicose e insulina plasmática, respectivamente. A gordura total hepática (G) e os triglicerídeos hepáticos (H) foram obtidos a partir de amostras de fígado. Os resultados são expressos como média \pm SEM. * Indica diferença estatística em relação aos seus respectivos grupo controle com Test t, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6.3. Avaliação da tolerância à glicose e sensibilidade à insulina

Foram realizados testes de tolerância à glicose e à insulina, a fim de garantir os efeitos de dexametasona e prednisona no eixo de glicose-insulina. Os dados na Figura 9 mostram que 5 dias de tratamento com dexametasona promove a intolerância à glicose representado por um

aumento de 32% na área sob a curva de glicose (AUC) (Figura 9A), quando comparado com o grupo C5. Enquanto isso, prednisona levou mais tempo para promover o efeito semelhante sobre a capacidade de manuseamento da glicose destes animais, uma vez que a AUC diferiram entre ratos C30 e P30 (5.723 ± 328 e 7.296 ± 670 , respectivamente, $p < 0,01$, Figura 9C), mas não entre C15 e P15 (Figura 9B). Além disso, a dexametasona induziu significativamente a resistência à insulina periférica com um aumento de 2 vezes da AUC (C5, 1152 ± 85 e D5, 2430 ± 286 , $p < 0,001$, Figura 9D), ao passo que a prednisona não afetou a sensibilidade periférica à insulina, apesar da duração do tratamento (Figuras 9E e 9F).

6.4. Avaliação da secreção e do armazenamento de triglicerídeos hepáticos

A síntese de TG hepáticos, bem como montagem e secreção de partículas de VLDL constituem processos bioquímicos finamente regulados por vias de sinalização da insulina [29]. Assim, avaliamos os efeitos do tratamento dos GCs sobre a hipertrigliceridemia induzida por Triton WR1339. Os dados da Figura 10 mostram que nem o tratamento com dexametasona nem com prednisona resultaram em uma maior secreção de triglicerídeos, apesar da menor sensibilidade hepática à insulina sugerida pelos valores do Índice TyG (Figura 8E). No entanto, tendo em conta os níveis de TG séricos elevados nos grupos D5, P15 e P30 (Figura 2C), também quantificamos a gordura total e o teor de TG no fígado destes animais, assim como nos seus respectivos controles. Como mostrado na Figura 11A, o conteúdo total de gordura de fígado de D5 ($197,6 \pm 3,3$ mg/g) foi significativamente mais elevada que C5 ($152,5 \pm 18,8$ mg/g), $p < 0,05$). A acumulação de gordura hepática induzida por prednisona foi mais lenta, uma vez que os ratos tratados não mostraram qualquer diferença neste parâmetro após 15 dias de tratamento (C15, $226,1 \pm 12,1$ vs. P15, $215,5 \pm 12,5$ mg/g), mas apresentaram depois de 30 dias (C30, $191,5 \pm 11,1$ vs. P30, $240,6 \pm 9,1$ mg/g, $p < 0,01$) (Figura 11A). Quando considerado o teor de TG no fígado, apenas os ratos D5 mostraram aumento da acumulação (C5, $3,0 \pm 0,2$ mg/g vs. D5, $4,6 \pm 0,5$, $p < 0,01$, Figura 11B), sugerindo que a prednisona tem um efeito atenuado sobre o armazenamento de TG no fígado.

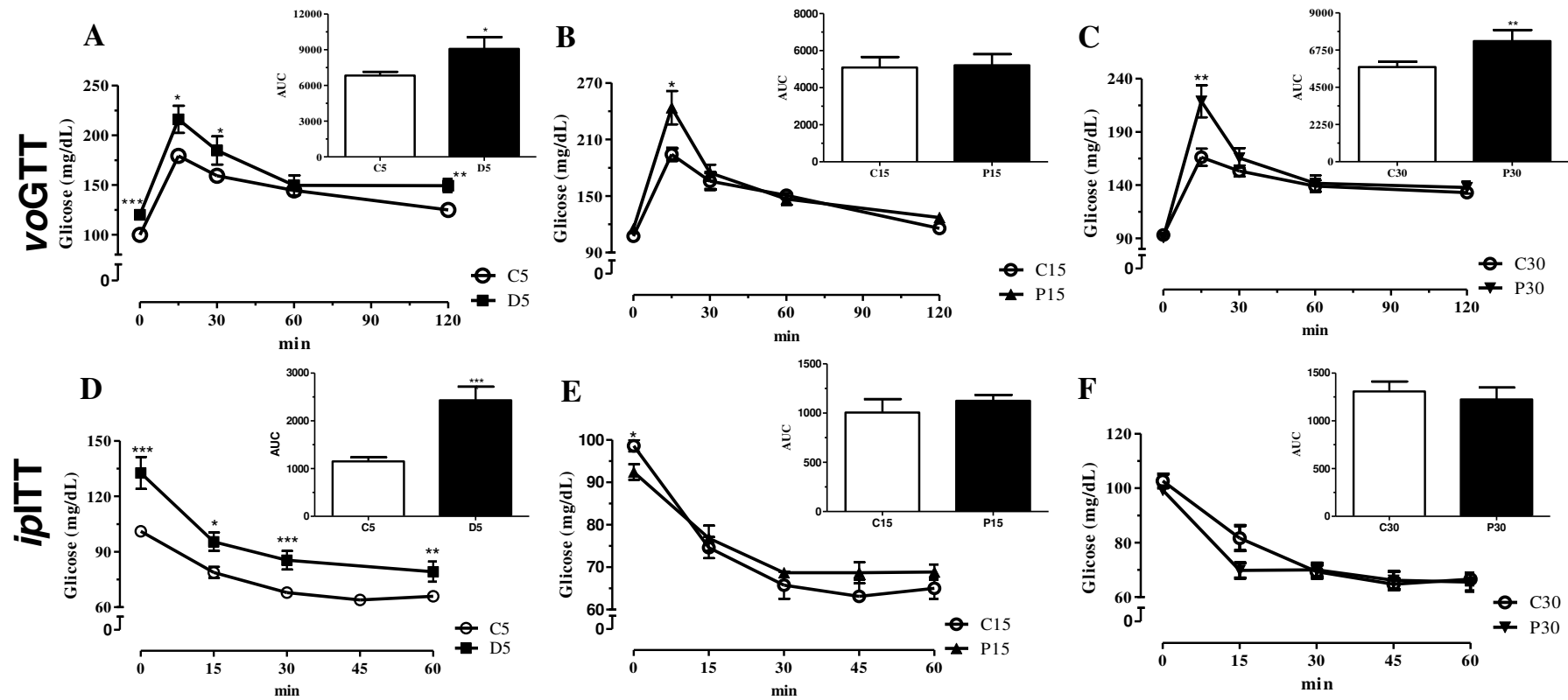


Figura 9. Efeito do tratamento com dexametasona ou prednisona sobre a função do eixo insulina-glicose. O teste oral de tolerância à glicose (voGTT) e o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT) foram realizados para avaliar a função do eixo de insulina-glicose em ratos tratados com dexametasona (1 mg/Kg, i.p.) (A e D), ou com prednisona (80 mg/Kg, v.o.) (B, C, E e F). A tolerância à glicose foi avaliada pelas mudanças na glicose em função do tempo mensurada com gotas de sangue da cauda durante voGTT e pela acumulação total de glicose no sangue relatados com AUC (A, B e C). A sensibilidade à insulina foi avaliada por ITT (AUC) (D, E e F), que mede a taxa de desaparecimento de glicose a partir da corrente sanguínea. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. A e D, n=6; B, E e C, n=7-8; F, n=11-12. * Indica diferença estatística em relação aos seus respectivos grupo controle com Test t, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

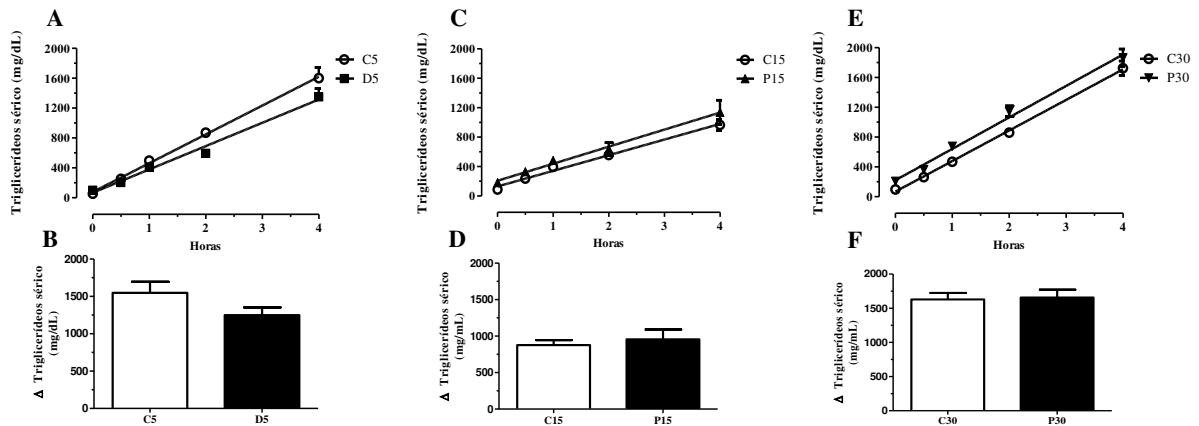


Figura 10. Tratamento com dexametasona ou prednisona não induz diferença na cinética de síntese de VLDL em ratos. Não foi observado diferença na velocidade de síntese de VLDL (TG) entre os grupos tratados com dexametasona (1 mg/kg, i.p.) por 5 dias, n=6 (D5) (A), ou com prednisona (80 mg/Kg, v.o.) por 15 dias, n=7-8 (P15) (C) e, 30 dias, n=8 (P30) (E), em relação aos seus respectivos grupos controle (C5, C15 e C30). A velocidade de síntese e exportação hepática de VLDL foram representados pelo acúmulo da concentração de triglicerídeos no soro (B, D e F) antes e após 4 horas da administração de Triton WR-1339. Foi utilizado o teste “t” de Student para comparação da concentração do acúmulo de triglicerídeos séricos obtido pelas curvas de ratos tratados com glicocorticoide e seus respectivos controles.

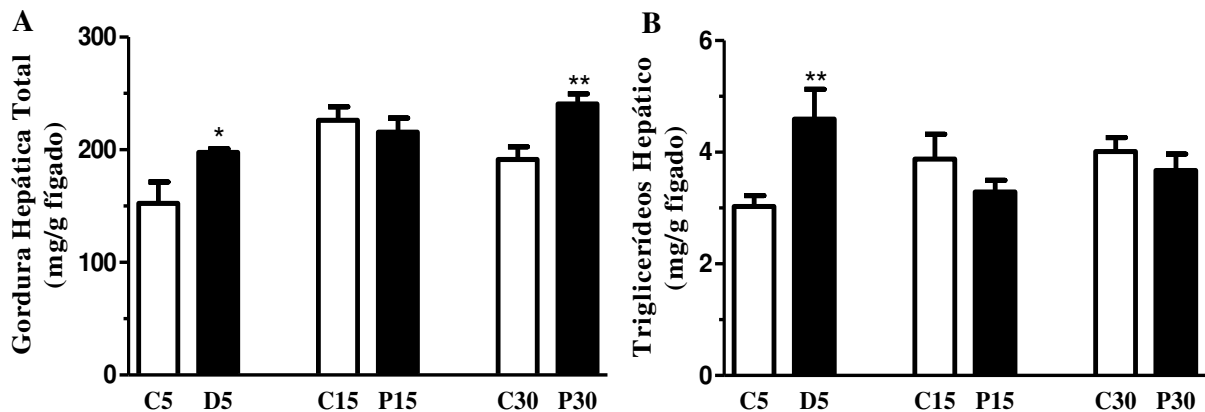


Figura 11. Perfil lipídico hepático de ratos tratados com dexametasona ou prednisona. Os ratos do grupo D5 (dexametasona 1 mg/Kg i.p., n=8-9) e do grupo P30 (prednisona 80 mg/Kg v.o., n=12) apresentaram significativamente maior conteúdo hepático de gordura total (A) em relação aos seus controles. Também observamos aumento significativo de triglicerídeos hepáticos (B) no grupo D5 em relação ao seu controle. Os dados são expressos como média ± e.p.m. * Indica diferença estatística em relação aos seus respectivos grupo controle com Test t, *p<0,05, **, p<0,01.

6.5. Secreção insulínica estimulada por glicose

Finalmente, as ilhotas pancreáticas isoladas a partir dos grupos C5, D5, C30 e P30 foram utilizadas para a avaliação da secreção de insulina sob concentração basal (5,6 mM) e alta (16,7 mM) de glicose. A dexametasona estimulou a elevação da secreção de insulina, tanto a 5,6 mM (C5, $0,17 \pm 0,02$ vs D5, $1,62 \pm 0,16$ ng/mL/h; $p < 0,001$) quanto em 16,7 mM (C5, $3,7 \pm 0,3$ vs. $7,43 \pm 0,8$ mg/ml/h, $p < 0,001$) (Figura 12A) de glicose, enquanto a prednisona não mostrou nenhum efeito sobre a sensibilidade de ilhotas pancreáticas à glicose (Figura 12B). Estes dados sugerem que estes dois GCs sintéticos possuem efeitos diferentes sobre a homeostase da glicose.

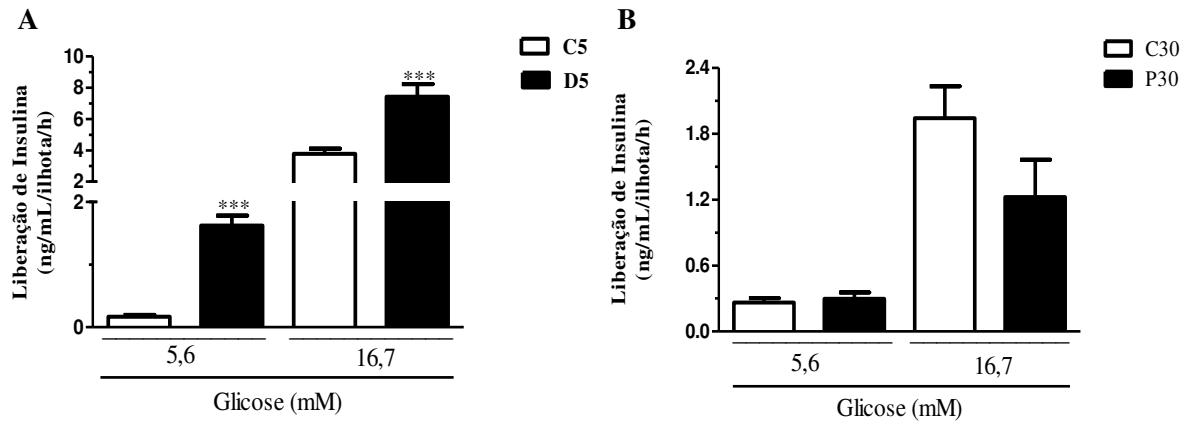


Figura 12. Efeito do tratamento com dexametasona ou prednisona na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) *ex vivo*. (A) GSIS (Glicose 5,6 e 16,7 mM) em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos controle (salina 0,1 mL/100 g, i.p.) (C5) e tratados com dexametasona (1 mg/Kg, i.p)(D5) durante 5 dias. (B) GSIS (Glicose 5,6 e 16,7 mM) em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos, controle (veículo 0,1 mL/ 100 g, v.o.) (C30) e tratados com prednisona (80 mg/Kg, v.o.) (P30) durante 30 dias. Em ambos (A, B), pelo menos, quatro grupos de quatro ilhotas por animal foram incubadas durante temperatura de 37 °C sob condições necessárias. Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=4, por grupo). * Em (A) indica diferença estatística ($p < 0,05$) vs C5 com *test T*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

7. DISCUSSÃO

O presente estudo fornece vários níveis de evidências de que a prednisona, a GC sintético amplamente prescrito para efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, é menos prejudicial que a dexametasona na homeostase da glicose e em parâmetros metabólicos em tecidos sensíveis à glicose. Em primeiro lugar, o tratamento de 30 dias com 80 mg/kg/dia com prednisona não aumentou os níveis séricos de glicose nem em jejum, nem sob estado alimentado, diferentemente do tratamento de 5 dias com 1 mg/kg/dia de dexametasona. Em

segundo lugar, o efeito parece estar relacionado com o desenvolvimento tardio de resistência periférica à insulina em ratos tratados com prednisona, em comparação com as da dexametasona. Em terceiro lugar, o tratamento com prednisona não potencializou a secreção de insulina estimulada por glicose *ex vivo* como dexametasona fez. Por outro lado, ambos os GCs sintéticos elevaram os níveis séricos de TG do tecido hepático, sugerindo ser mais sensíveis à deficiência de eixo de glicose-insulina do que outras áreas periféricas, tais como o músculo esquelético e no tecido adiposo branco. Por último, mas não menos importante, a prednisona não induziu a caquexia típica comumente observada em roedores tratados com dexametasona, o que torna prednisona uma droga mais adequada para estudos sobre os efeitos duradouros da terapia GC no metabolismo da glicose.

Os efeitos dos GC são mediados pelo receptor de GC, um fator de transcrição ativado por ligante localizado no citoplasma, como parte de um complexo de proteínas que incluem as proteínas de choque térmico (HSP) -90, -70, e -40, além de outras chaperonas [30]. Após a ligação ao hormônio, o par receptor GC-GC dissocia do complexo de proteínas e transloca-se para o núcleo onde se liga a elementos de regulação em regiões promotoras de genes responsivos ao glicocorticoide (GRE), em particular os responsáveis pela resposta imune [4, 11]. Em adição aos seus efeitos sobre o sistema imune, o GC também modula a expressão do padrão de genes envolvidos no metabolismo da glicose. No fígado, o GC ativa genes relacionados com a gliconeogênese, particularmente fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G-6-Pase) [11], além dos efeitos inibitórios sobre as vias de sinalização da insulina, que concorrem para o aparecimento de resistência insulínica hepática [15]. Além disso, o GC diminui a absorção de glicose estimulada por insulina em tecidos periféricos, tais como o músculo esquelético e tecido adiposo branco [14, 31]. A maioria destes efeitos secundários metabólicos são atribuídos aos mecanismos de transativação do receptor GC nos genes, o que parece estar diretamente relacionado com afinidades distintas dos GCs sintéticos para o receptor GC [32]. No entanto, os parâmetros farmacocinéticos, tais como taxa de ligação às proteínas plasmáticas, também são de capital importância para a transativação acima referido [11].

Os dados aqui apresentados mostram que os efeitos colaterais metabólicos da prednisona foram mais atenuados e retardados em comparação com dexametasona. A administração oral de prednisona em ratos, durante 15 ou 30 dias, não aumentou os níveis sérico de glicose nos estados de jejum e alimentado, diferentemente da administração intraperitoneal de cinco dias com dexametasona (Figura 8A e B). Este resultado está de acordo com os dados adicionais que mostrou que os ratos prednisona não tinham

hiperinsulinemia (Figura 8D), nem resistência periférica à insulina (Figura 8E e F), diferindo do observado em ratos dexametasona. Por outro lado, os animais P30 mas não P15 mostraram tolerância à glicose diminuída (Figura 9) e aumento da acumulação total de gordura no fígado (Tabela 1), o que sugere tempo-dependência de ocorrência de efeitos secundários da prednisona, ao passo não seria descartados os aspectos farmacodinâmicos.

Prednisona é tanto o pró-fármaco como o produto da metabolização de prednisolona, que é considerado um GC de potência intermediária. Em comparação com hidrocortisona, prednisona ou prednisolona possui uma potência anti-inflamatória 6 vezes maior, enquanto que a dexametasona corresponde a uma potência 26 vezes maior [2]. Mais importante, foi demonstrado que a atividade de transativação do GC aumenta com a sua potência farmacológica [33, 34]. Usando um sistema de detecção MMTV-luciferase para medir a transativação ativada pelo GC, He e colaboradores [35] mostraram que a prednisolona causou um deslocamento da curva dose-resposta para a esquerda, mostrando-se cinco vezes mais potente que o cortisol, porém com metade da potência da dexametasona. Não obstante, a potência GC também depende da taxa de ligação às proteínas do plasma, uma vez que controla a entrega da droga a tecidos-alvo [11]. A prednisolona se liga à albumina e à globulina de ligação a corticosteróides, também conhecida como transcortina, de maneira respectivamente baixa e elevada afinidade, o que lhe confere uma proteína de ligação de aproximadamente 95% [36]. Por outro lado, dexametasona liga-se apenas à albumina, de forma com baixa afinidade, mas de alta capacidade, alcançando uma taxa de ligação de cerca de 70% [37]. Assim, é apropriado sugerir que os efeitos secundários metabólicos atenuados assim como retardados observados nos ratos tratados prednisona está relacionado com a sua menor capacidade de transativação e maior taxa de ligação às proteínas do plasma, em comparação com a dexametasona.

Diferentemente dos resultados acima mencionados, ambos os ratos tratados com dexametasona e prednisona diminuíram a acumulação de gordura nos depósitos retroperitoneais não viscerais (Tabela 1), enquanto que nenhuma alteração foi observada nos depósitos viscerais periepididimal e mesentéricos (Tabela 1). O efeito lipolítico dos GCs é mediado pela transativação da lipase hormônio sensível (HSL) e expressão de genes da lipase de triglicerídeos de tecido adiposo (ATGL) no tecido adiposo branco, além de um efeito sinérgico sobre as vias de sinalização dependentes de catecolaminas lipolíticas [38]. Por outro lado, a insulina age como um fator antilipolítico através de fosforilação da fosfodiesterase -3B e subsequente degradação de AMPc à 5'AMP [39], que pode ser comprometida na resistência à insulina. Numerosos estudos experimentais têm mostrado que GC promove a redução da

sensibilidade à insulina em ratos [9, 14, 15, 40]. No entanto, os nossos dados não suportam o desenvolvimento de resistência periférica à insulina no tecido periférico de ratos a partir de grupos de prednisona, pois somente os animais P30 mostrou tolerância à glicose diminuída (Figura 9C), porém sem comprometimento da sensibilidade periférica à insulina (Figura 9E e 9F). Assim, considerando que a exposição GC promove redistribuição de tecido adiposo periféricos para locais ectópicos centrais [8], é plausível inferir que ácidos graxos livres a partir de depósitos retroperitoneais não viscerais foram captados principalmente pelo fígado, em vez de depósitos viscerais, onde eles foram incorporados na síntese hepática de lipídeos, tal como sugerido pela acumulação de gordura total aumentada no fígado de D5 e grupos P30 (Figura 11A), bem como o aumento da trigliceridemia em todos os grupos tratados com GC (Figura 8C).

A produção hepática de TG é primariamente regulada por duas enzimas chave, proteína ligante do elemento regulado por carboidratos (ChREBP) e proteínas ligante do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c), que são regulados positivamente por hiperinsulinemia [41] ou excesso de GC [42]. No entanto, a exportação hepática de TG para a corrente sanguínea é um processo regulado pela insulina que envolve a ativação da Akt que medeia a expressão da proteína microsomal de transferência de triacilgliceróis (MTP), a qual é responsável pela montagem e síntese de partículas de VLDL no retículo endoplasmático de hepatócitos [43]. Uma vez que todos os ratos tratados com GC apresentaram níveis mais elevados de TG séricos e, ainda, o TyG sugeriu o desenvolvimento de resistência à insulina hepática, aproveitamos Triton WR-1339 para bloquear lipase de lipoproteína (LPL) como uma ferramenta para avaliar a taxa de secreção de TG hepáticos [26]. Os dados sobre a Figura 4 mostram que nem a dexametasona, nem prednisona interferiu na exportação de VLDL. Embora contraditórios, estes dados sugerem um menor efeito dos GCs sintéticos sobre a produção de VLDL mediada por insulina, e corroboram uma ação primária destes GCs sobre a biossíntese hepática de lipídeos.

Os GCs endógenos e sintéticos estimulam a secreção pancreática de insulina de uma maneira tanto tempo quanto dose-dependente [9], como resultado da regulação positiva da função das células β , causada por mecanismos adaptativos compensatórios provocados pela resistência periférica à insulina induzida por GC [7]. Além disso, a secreção de insulina também é aumentada pelo efeito direto dos ácidos graxos livres [44], cujos níveis são elevados em roedores tratados com GC. Curiosamente, em nosso estudo, apenas dexametasona foi capaz de potencializar a secreção de insulina estimulada por glicose nas condições basal e hiperglicêmica (Figura 12A). A ausência do aumento na secreção de

insulina em ilhotas pancreáticas isolados a partir de animais P30 (Figura 12B) corrobora ainda mais com os efeitos colaterais dos GC atenuados após administração de prednisona, em relação à dexametasona.

Em conclusão, os nossos resultados sugerem que a exposição em médio prazo à prednisona promove mudanças graduais e atenuadas no metabolismo da glicose e de lipídeos, como a intolerância à glicose atrasada e hipertrigliceridemia, sem comprometimento da sensibilidade periférica à insulina; que difere diretamente do distúrbio metabólico agressivo causado pela utilização em curto prazo de dexametasona. Não obstante, os ratos tratados com prednisona não mostraram a caquexia típica vulgarmente observada em roedores tratados com dexametasona, o que faz com que a prednisona seja uma droga mais adequada para estudos sobre os efeitos crônicos do tratamento com GC no metabolismo da glicose e para além.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos ao pessoal do LeFisio por todo o apoio técnico durante os procedimentos experimentais, especialmente a Pâmela Santos, Caroline Castro. Somos também gratos aos órgãos de fomento FAPEMA, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro, e à Universidade Federal do Maranhão, pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS

- [1] S.A. Jones, E.F. Morand, Glucocorticoids in 2015: New answers to old problems, *Nat Rev Rheumatol*, 12 (2016) 73-74.
- [2] S. Trikudanathan, G.T. McMahon, Optimum management of glucocorticoid-treated patients, *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 4 (2008) 262-271.
- [3] R.A. Quax, L. Manenschijn, J.W. Koper, J.M. Hazes, S.W. Lamberts, E.F. van Rossum, R.A. Feelders, Glucocorticoid sensitivity in health and disease, *Nat Rev Endocrinol*, 9 (2013) 670-686.
- [4] C. Stahn, F. Buttgereit, Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids, *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4 (2008) 525-533.
- [5] S. John, P.J. Sabo, T.A. Johnson, M.H. Sung, S.C. Biddie, S.L. Lightman, T.C. Voss, S.R. Davis, P.S. Meltzer, J.A. Stamatoyannopoulos, G.L. Hager, Interaction of the glucocorticoid receptor with the chromatin landscape, *Mol Cell*, 29 (2008) 611-624.
- [6] W. Arlt, P.M. Stewart, Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action, *Endocrinol Metab Clin North Am*, 34 (2005) 293-313, viii.
- [7] A. Rafacho, H. Ortsater, A. Nadal, I. Quesada, Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes, *J Endocrinol*, 223 (2014) R49-62.
- [8] A.J. Peckett, D.C. Wright, M.C. Riddell, The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism, *Metabolism*, 60 (2011) 1500-1510.
- [9] A. Rafacho, V.A. Giozzet, A.C. Boschero, J.R. Bosqueiro, Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance, *Pancreas*, 36 (2008) 284-293.
- [10] L. Manenschijn, E.L. van den Akker, S.W. Lamberts, E.F. van Rossum, Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview, *Ann N Y Acad Sci*, 1179 (2009) 179-198.
- [11] H. Schäcke, W.-D. Döcke, K. Asadullah, Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids, *Pharmacology & therapeutics*, 96 (2002) 23-43.
- [12] O. Prelovsek, T. Mars, M. Jevsek, M. Podbregar, Z. Grubic, High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF- α and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 291 (2006) R1651-R1656.
- [13] E.A. Nunes, L.M. Goncalves-Neto, F.B. Ferreira, C. Dos Santos, L.C. Fernandes, A.C. Boschero, P.C. Calder, A. Rafacho, Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in rats, *Appl Physiol Nutr Metab*, 38 (2013) 1137-1146.
- [14] J. Buren, Y.C. Lai, M. Lundgren, J.W. Eriksson, J. Jensen, Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats, *Arch Biochem Biophys*, 474 (2008) 91-101.
- [15] M.J. Saad, F. Folli, J.A. Kahn, C.R. Kahn, Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats, *J Clin Invest*, 92 (1993) 2065-2072.
- [16] K. Motta, A.M. Barbosa, F. Bobinski, A.C. Boschero, A. Rafacho, JNK and IKK β phosphorylation is reduced by glucocorticoids in adipose tissue from insulin-resistant rats, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 145 (2015) 1-12.
- [17] A. Rafacho, S. Quallio, D.L. Ribeiro, S.R. Taboga, F.M. Paula, A.C. Boschero, J.R. Bosqueiro, The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment, *Acta Physiol (Oxf)*, 200 (2010) 223-235.

- [18] B.P. Schimmer, K.L. PARKER, ACTH, Adrenal Steroids, and Pharmacology of the Adrenal Cortex, in: L.L. BRUNTON, B.A. CHABNER, B.C. KNOLLMANN (Eds.) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, 2011, pp. 1433-1457.
- [19] A.M. Scott, I. Atwater, E. Rojas, A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans, *Diabetologia*, 21 (1981) 470-475.
- [20] L.E. Simental-Mendia, M. Rodriguez-Moran, F. Guerrero-Romero, The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects, *Metab Syndr Relat Disord*, 6 (2008) 299-304.
- [21] D.R. Matthews, J.P. Hosker, A.S. Rudenski, B.A. Naylor, D.F. Treacher, R.C. Turner, Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man, *Diabetologia*, 28 (1985) 412-419.
- [22] A. Rafacho, J.L. Abrantes, D.L. Ribeiro, F.M. Paula, M.E. Pinto, A.C. Boschero, J.R. Bosqueiro, Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats, *Horm Metab Res*, 43 (2011) 275-281.
- [23] J. Delarue, C. Magnan, Free fatty acids and insulin resistance, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 10 (2007) 142-148.
- [24] R.J. Perry, V.T. Samuel, K.F. Petersen, G.I. Shulman, The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes, *Nature*, 510 (2014) 84-91.
- [25] S. Smemo, J.J. Tena, K.H. Kim, E.R. Gamazon, N.J. Sakabe, C. Gomez-Marin, I. Aneas, F.L. Credidio, D.R. Sobreira, N.F. Wasserman, J.H. Lee, V. Puvindran, D. Tam, M. Shen, J.E. Son, N.A. Vakili, H.K. Sung, S. Naranjo, R.D. Acemel, M. Manzanares, A. Nagy, N.J. Cox, C.C. Hui, J.L. Gomez-Skarmeta, M.A. Nobrega, Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3, *Nature*, 507 (2014) 371-375.
- [26] S. Otway, D.S. Robinson, The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions, *J Physiol*, 190 (1967) 321-332.
- [27] B.D. Freedman, E.J. Lee, Y. Park, J.L. Jameson, A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor-gamma knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome, *J Biol Chem*, 280 (2005) 17118-17125.
- [28] S. Bordin, A.C. Boschero, E.M. Carneiro, I. Atwater, Ionic mechanisms involved in the regulation of insulin secretion by muscarinic agonists, *J Membr Biol*, 148 (1995) 177-184.
- [29] J.D. Sparks, C.E. Sparks, K. Adeli, Selective hepatic insulin resistance, VLDL overproduction, and hypertriglyceridemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32 (2012) 2104-2112.
- [30] W.B. Pratt, Y. Morishima, M. Murphy, M. Harrell, Chaperoning of glucocorticoid receptors, *Handb Exp Pharmacol*, (2006) 111-138.
- [31] J. Ruzzin, A.S. Wagman, J. Jensen, Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor, *Diabetologia*, 48 (2005) 2119-2130.
- [32] P. Smit, H. Russcher, F.H. de Jong, A.O. Brinkmann, S.W. Lamberts, J.W. Koper, Differential regulation of synthetic glucocorticoids on gene expression levels of glucocorticoid-induced leucine zipper and interleukin-2, *J Clin Endocrinol Metab*, 90 (2005) 2994-3000.
- [33] P. Wei, Y.I. Ahn, P.R. Housley, J. Alam, W.V. Veddeckis, Modulation of hormone-dependent glucocorticoid receptor function using a tetracycline-regulated expression system, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 64 (1998) 1-12.

- [34] I.M. Adcock, Y. Nasuhara, D.A. Stevens, P.J. Barnes, Ligand-induced differentiation of glucocorticoid receptor (GR) trans-repression and transactivation: preferential targeting of NF-kappaB and lack of I-kappaB involvement, *Br J Pharmacol*, 127 (1999) 1003-1011.
- [35] Y. He, W. Yi, K. Suino-Powell, X.E. Zhou, W.D. Tolbert, X. Tang, J. Yang, H. Yang, J. Shi, L. Hou, H. Jiang, K. Melcher, H.E. Xu, Structures and mechanism for the design of highly potent glucocorticoids, *Cell Res*, 24 (2014) 713-726.
- [36] D. Czock, F. Keller, F.M. Rasche, U. Haussler, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids, *Clin Pharmacokinet*, 44 (2005) 61-98.
- [37] D.M. Cummings, G.E. Larijani, D.P. Conner, R.K. Ferguson, M.L. Rocci, Jr., Characterization of dexamethasone binding in normal and uremic human serum, *DICP*, 24 (1990) 229-231.
- [38] C. Xu, J. He, H. Jiang, L. Zu, W. Zhai, S. Pu, G. Xu, Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes, *Mol Endocrinol*, 23 (2009) 1161-1170.
- [39] F. Giorgino, L. Laviola, J.W. Eriksson, Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies, *Acta Physiol Scand*, 183 (2005) 13-30.
- [40] J. Buren, H.X. Liu, J. Jensen, J.W. Eriksson, Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes, *Eur J Endocrinol*, 146 (2002) 419-429.
- [41] J.D. Browning, J.D. Horton, Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury, *J Clin Invest*, 114 (2004) 147-152.
- [42] A. Erhuma, S. McMullen, S.C. Langley-Evans, A.J. Bennett, Feeding pregnant rats a low-protein diet alters the hepatic expression of SREBP-1c in their offspring via a glucocorticoid-related mechanism, *Endocrine*, 36 (2009) 333-338.
- [43] A. Kamagate, S. Qu, G. Perdomo, D. Su, D.H. Kim, S. Slusher, M. Meseck, H.H. Dong, FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice, *J Clin Invest*, 118 (2008) 2347-2364.
- [44] P. Steneberg, N. Rubins, R. Bartoov-Shifman, M.D. Walker, H. Edlund, The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse, *Cell Metab*, 1 (2005) 245-258.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao avaliarmos as condições metabólicas de ratos que receberam a administração aguda de dexametasona ou subcrônica de prednisona, percebemos que a distinção entre esses dois fármacos no que se refere à potência farmacológica, onde o primeiro mostra-se aproximadamente seis vezes mais potente em relação ao segundo, não se limita apenas ao cunho farmacológico, mas também aos seus efeitos adversos.

A administração de dexametasona em ratos promoveu relevante caquexia desses animais, acompanhado do desenvolvimento de resistência insulínica periférica e hepática, representados, respectivamente, pelos dados da sensibilidade periférica à insulina e pela hiperglicemia e o índice TyG, além do desequilíbrio no metabolismo de lipídeos, especialmente representado pelo dado de triglicerídeos sérico. Em contrapartida, a prednisona não comprometeu a sobrevivência do animal, mantendo parâmetros, como a glicemia em jejum, insulinemia e a sensibilidade periférica à insulina, em estados normais quando comparados aos animais controles, apesar de notamos algumas alterações já vista no tratamento agudo de dexametasona, como hipertrigliceridemia.

Diante disso, o nosso estudo sugere que a prednisona é um glicocorticoide que induz alterações metabólicas atenuadas quando comparadas à dexametasona em roedores, e sustenta dados importantes que possam estimular o uso preferencial da prednisona na prática clínica quando se pretende a minimização dos seus efeitos adversos, ou seu uso para estudos sobre os efeitos metabólicos associados a tratamentos crônicos com GC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADIAN, M.; WANG, Y.; SUL, H. S. Lipolysis in adipocytes. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 5, p. 555-9, May 2010.

ANDREWS, R. C.; WALKER, B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clin Sci (Lond)**, v. 96, n. 5, p. 513-23, May 1999.

BELLARY, S. et al. Chronic hepatitis with combined features of autoimmune chronic hepatitis and chronic hepatitis C: favorable response to prednisone and azathioprine. **Annals of internal medicine**, v. 123, n. 1, p. 32-34, 1995.

BENEDEK, T. G. History of the development of corticosteroid therapy. **Clin Exp Rheumatol**, v. 29, n. 5 Suppl 68, p. S-5-12, Sep-Oct 2011.

BUREN, J. et al. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch Biochem Biophys**, v. 474, n. 1, p. 91-101, Jun 1 2008.

BUREN, J. et al. Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. **Eur J Endocrinol**, v. 146, n. 3, p. 419-29, Mar 2002.

BURT, M. G. et al. Screening for diabetes in patients with inflammatory rheumatological disease administered long-term prednisolone: a cross-sectional study. **Rheumatology (Oxford)**, v. 51, n. 6, p. 1112-9, Jun 2012.

CAPERUTO, L. C. et al. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. **Endocrine**, v. 29, n. 3, p. 391-8, Jun 2006.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. **Vascul Pharmacol**, v. 57, n. 2-4, p. 91-7, Sep-Oct 2012.

CHAPMAN, K. R. et al. Effect of a short course of prednisone in the prevention of early relapse after the emergency room treatment of acute asthma. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 12, p. 788-794, 1991.

CHOW, E. J. et al. Glucocorticoids and insulin resistance in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer**, v. 60, n. 4, p. 621-6, Apr 2013.

COHEN, J. C.; HORTON, J. D.; HOBBS, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. **Science**, v. 332, n. 6037, p. 1519-23, Jun 24 2011.

COOPER, M. S.; STEWART, P. M. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 12, p. 4645-54, Dec 2009.

CZECH, M. P. et al. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. **Diabetologia**, v. 56, n. 5, p. 949-64, May 2013.

DE BOSSCHER, K. et al. Selective modulation of the glucocorticoid receptor can distinguish between transrepression of NF-kappaB and AP-1. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 1, p. 143-63, Jan 2014.

FRAME, S.; COHEN, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. **Biochem J**, v. 359, n. Pt 1, p. 1-16, Oct 1 2001.

GUPTA, M. et al. Nausea and vomiting in advanced cancer: the Cleveland Clinic protocol. **J Support Oncol**, v. 11, n. 1, p. 8-13, Mar 2013.

HIRATA, A. et al. Contribution of glucocorticoid-mineralocorticoid receptor pathway on the obesity-related adipocyte dysfunction. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 419, n. 2, p. 182-7, Mar 9 2012.

ISRAEL, H. L.; FOUTS, D.; BEGGS, R. A. A Controlled Trial of Prednisone Treatment of Sarcoidosis 1. **American Review of Respiratory Disease**, v. 107, n. 4, p. 609-614, 1973.

JEONG, I. K. et al. The effects of dexamethasone on insulin release and biosynthesis are dependent on the dose and duration of treatment. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 51, n. 3, p. 163-71, Mar 2001.

KADMIEL, M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, n. 9, p. 518-30, Sep 2013.

KAMAGATE, A. et al. FoxO1 mediates insulin-dependent regulation of hepatic VLDL production in mice. **J Clin Invest**, v. 118, n. 6, p. 2347-64, Jun 2008.

KUO, T. et al. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 28, p. 11160-5, Jul 10 2012.

LADYMAN, S. R.; GRATTAN, D. R. JAK-STAT and feeding. **Jakstat**, v. 2, n. 2, p. e23675, Apr 1 2013.

LANGIN, D.; HOLM, C.; LAFONTAN, M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. **Proc Nutr Soc**, v. 55, n. 1b, p. 93-109, Mar 1996.

LAUGERO, K. D. Reinterpretation of basal glucocorticoid feedback: implications to behavioral and metabolic disease. **Vitam Horm**, v. 69, p. 1-29, 2004.

LEOUTSAKOS, B.; LEOUTSAKOS, A. The adrenal glands: a brief historical perspective. **Hormones (Athens)**, v. 7, n. 4, p. 334-6, Oct-Dec 2008.

LI, C. et al. A signaling role of glutamine in insulin secretion. **J Biol Chem**, v. 279, n. 14, p. 13393-401, Apr 2 2004.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261-74, Jun 29 2007.

MARANZANO, E. et al. Evidence-based recommendations for the use of antiemetics in radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, v. 76, n. 3, p. 227-233, 9// 2005.

Medicine Walker. Disponível em: < <http://www.medicinehack.com/2014/04/diaxozide-mechanism-of-action.html> >.

MEIJSING, S. H. et al. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. **Science**, v. 324, n. 5925, p. 407-10, Apr 17 2009.

MENDEL, D. B.; ORTI, E. Isoform composition and stoichiometry of the approximately 90-kDa heat shock protein associated with glucocorticoid receptors. **J Biol Chem**, v. 263, n. 14, p. 6695-702, May 15 1988.

MICHAEL, M. D. et al. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. **Mol Cell**, v. 6, n. 1, p. 87-97, Jul 2000.

MITCHELL, F. Therapy: Glucocorticoid-induced Cushing syndrome increases the risk of cardiovascular events. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, n. 10, p. 563, Oct 2012.

MOTTA, K. et al. JNK and IKK β phosphorylation is reduced by glucocorticoids in adipose tissue from insulin-resistant rats. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 145, p. 1-12, 2015.

NUNES, E. A. et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate in rats. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 38, n. 11, p. 1137-46, Nov 2013.

PRELOVSEK, O. et al. High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF-alpha and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 291, n. 6, p. R1651-6, Dec 2006.

PRENTKI, M.; CORKEY, B. E. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? **Diabetes**, v. 45, n. 3, p. 273-83, Mar 1996.

RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v. 36, n. 3, p. 284-93, Apr 2008.

RAFACHO, A. et al. The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment. **Acta physiologica**, v. 200, n. 3, p. 223-235, 2010.

RAFACHO, A. et al. The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 200, n. 3, p. 223-35, Nov 2010.

SAAD, M. J. et al. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J Clin Invest**, v. 92, n. 4, p. 2065-72, Oct 1993.

SAKLATVALA, J. Glucocorticoids: do we know how they work? **Arthritis Res**, v. 4, n. 3, p. 146-50, 2002.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W.-D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. ACTH, Adrenal Steroids, and Pharmacology of the Adrenal Cortex. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A., *et al* (Ed.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12. New York: McGraw-Hill, 2011. cap. 42, p.1433-1457.

SILVA, R. D. C. *et al*. Primary adrenal insufficiency in adults: 150 years after Addison. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 5, p. 724-738, 2004.

TAVES, M. D.; GOMEZ-SANCHEZ, C. E.; SOMA, K. K. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 301, n. 1, p. E11-24, Jul 2011.

VALERA, F. C.; TAMASHIRO, E.; ANSELMO-LIMA, W. T. **Glucocorticoid resistance in the upper respiratory airways**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9535108727.

VAN RAALTE, D. H. *et al*. Glucocorticoid treatment impairs microvascular function in healthy men in association with its adverse effects on glucose metabolism and blood pressure: a randomised controlled trial. **Diabetologia**, v. 56, n. 11, p. 2383-91, Nov 2013.

VERONESE, F. J. V. *et al*. Síndrome Nefrótica Primária em Adultos. **Clinical & Biomedical Research**, v. 30, n. 2, 2010.

VINCENTI, M. P.; BRINCKERHOFF, C. E. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. **Arthritis Res**, v. 4, n. 3, p. 157-64, 2002.

WIGGINS, D.; GIBBONS, G. F. The lipolysis/esterification cycle of hepatic triacylglycerol. Its role in the secretion of very-low-density lipoprotein and its response to hormones and sulphonylureas. **Biochem J**, v. 284 (Pt 2), p. 457-62, Jun 1 1992.

YABALURI, N.; BASHYAM, M. D. Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. **J Biosci**, v. 35, n. 3, p. 473-84, Sep 2010.

YAMASHITA, H. *et al*. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 16, p. 9116-21, Jul 31 2001.

YANG, S.; ZHANG, L. Glucocorticoids and vascular reactivity. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 2, n. 1, p. 1-12, Jan 2004.

YUDT, M. R.; CIDLOWSKI, J. A. Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. **Mol Endocrinol**, v. 15, n. 7, p. 1093-103, Jul 2001.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 17
PROJETO DE PESQUISA	Registro da CEUA: 17/11 Nº do Protocolo: 23115.012396/2011-15 Data de entrada no CEUA: 16/09/11 Parecer: Com pendências

I – Identificação

Título do projeto: Efeitos metabólicos dos extratos de plantas medicinais em modelo experimental de hiperglicemia em roedores		
Identificação da equipe executora: Iracelle Carvalho Abreu (Responsável)		
Instituição onde será realizado: Departamento de Ciências Fisiológicas e departamento de Farmácia da UFMA		
Área temática: Não se aplica	Multicêntrico: Não	Data de recebimento: 23/09/2011
Cooperação estrangeira: Não		Data de devolução: 28/10/2011

II – Objetivos:

Estudar os efeitos metabólicos dos extratos de plantas medicinais em modelo experimental de hiperglicemia em roedores.

- Verificar as ações dos extratos sobre o metabolismo glicêmico no modelo experimental de hiperglicemia em ratos e camundongos normoglicêmicos;
- Observar os efeitos dos extratos sobre o metabolismo dos lipídeos dos animais com hiperglicemia induzida;
- Investigar os possíveis mecanismos das ações dos extratos como hipoglicemiantes e/ou anti-diabetogênicos.

III – Sumário do projeto:

A proposta trata de um estudo experimental com uso de ratos (*Rattus norvegicus*), linhagem wistar, e camundongos (*Mus musculus*), linhagem swiss, com o objetivo de avaliar efeito de

extratos botânicos sobre hiperglicemia. O procedimento prevê três grupos experimentais (Controle; Prednisona; Prednisona+Extratos), cada um com 10 animais cada.

IV – Comentário do relator frente à resolução 779 de 26 de agosto de 2010 e complementares em particular sobre:

Os autores não relatam quais os procedimentos de coleta de sangue e nem da eutanásia dos animais. Por favor, especifique atentando aos aspectos de BEA.

V – Pendências

Falta todo o encaminhamento padrão para o CEUA (Carta de encaminhamento, ficha de encaminhamento do CEUA – Anexo II da resolução 779/2010)

VI – Recomendações:

VII – Parecer consubstanciado da CEUA

São Luís, 25 / 11 / 2011


Prof. Dra. Lucilene Amorim

Presidente da CEUA / UFMA