



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Carolina de Moraes Silveira Peixe

Efeitos Metabólicos da Dexametasona:

A Importância do Período da Vida e da Frequência de Exposição

Florianópolis
2025

Carolina de Moraes Silveira Peixe

Efeitos Metabólicos da Dexametasona:

A Importância do Período da Vida e da Frequência de Exposição

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Florianópolis

2025

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

Peixe, Carolina de Moraes Silveira

Efeitos Metabólicos da Dexametasona: :A Importância do Período da Vida e da Frequência de Exposição / Carolina de Moraes Silveira Peixe ; orientador, Alex Rafacho, coorientador, Alexandre Giusti-Paiva, 2025.

66 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Farmacologia Endócrina. 3. Glicocorticoides. I. Rafacho, Alex . II. Giusti-Paiva, Alexandre. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Carolina de Moraes Silveira Peixe

Efeitos Metabólicos da Dexametasona:

A Importância do Período da Vida e da Frequência de Exposição

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 18 de julho de 2025 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva, Dr^a.

Universidade de São Paulo

Prof^a. Luisa Mota da Silva, Dr^a.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Prof. José Eduardo da Silva Santos, Dr.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Alex Rafacho, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2025.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Alex Rafacho, pelos inúmeros ensinamentos e por tanta confiança ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Sua orientação foi um marco no meu crescimento, tanto profissional, quanto pessoal. Meu eterno obrigada pela paciência, pela presença e pelo apoio, especialmente nos momentos mais difíceis desses dois anos.

Ao meu coorientador, Alexandre Giusti-Paiva, pelas conversas e discussões sobre as mais diversas ideias — mirabolantes ou não — que eu levava até sua sala. Obrigada pela escuta e pelos ensinamentos ao longo do caminho.

À banca — Profa. Dra. Luísa Mota, Profa. Dra. Silvana Bordin, Prof. Dr. José Eduardo e Prof. Dr. Maurício Cunha — agradeço imensamente pelo aceite e por fazerem parte deste momento tão marcante.

A toda equipe do LIDoC — Aline, Júlia, Landerson, Vinicius Grippa, Milena, Victoria, Vinícius Zanotti, Luísa, Sofia e Gabriel — pelas trocas, pelas ajudas, pelo apoio e por tantos momentos de leveza que fizeram toda a diferença ao longo da jornada.

À minha fiel escudeira e grande parceira de pós-graduação, Luma, pelos incontáveis cafezinhos, pelas sessões de terapia, pelos almoços e pelas conversas que contribuíram muito para o meu crescimento ao longo desses anos.

Aos amigos que o mestrado me trouxe — Lucas, Chrysthian, Ohanez e Gabriel Amorim — por fazerem parte dessa caminhada com tanto companheirismo.

Ao Gilberto, mesmo que por um breve período, obrigada pelos ensinamentos essenciais para o desenvolvimento das histologias deste trabalho. Sua paciência e generosidade em compartilhar conhecimento foram fundamentais.

Aos meus amigos do coração — Isadora, Danilo, Tayná, Cassiano, Canton, Geremias, Lari e Matheus — pelas saídas, pelas risadas e pelos momentos que foram essenciais para aliviar a mente e o coração.

Aos meus tios Mauri e Mara e à minha família de consideração — Magda, Manoela e Rafael — por todo o carinho e acolhimento ao longo dessa jornada.

Ao meu namorado, Bruno, pelo apoio constante, incansável e sempre presente. Obrigada por tanto, sempre, sua confiança inquestionável é algo pelo qual serei eternamente grata. Ter você ao meu lado tornou tudo mais leve.

E aos meus pais Darlene e Marildo, e à minha tia Carla: obrigada pelo suporte incondicional, por me ouvirem (com paciência!) falar dos ratinhos, dos experimentos e dos causos da pós-graduação.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”
- Carl Jung.

RESUMO

A dexametasona (DEX) é um glicocorticoide amplamente utilizado por suas ações anti-inflamatórias e imunossupressoras em diferentes fases da vida. No entanto, tratamentos com DEX também podem estar associados a efeitos diabetogênicos. Diante disso, buscamos investigar se tratamento(s) prévio(s) com DEX pode exacerbar os distúrbios metabólicos induzidos por um tratamento posterior com DEX na vida adulta. Para avaliar tal objetivo, ratos machos foram submetidos a até três ciclos de tratamento, iniciando aos 30, 60 e 90 dias pós-natal. Cada ciclo consistiu em única injeção intraperitoneal diária por 5 dias consecutivos de DEX (1,0 mg/kg) ou salina (NaCl 0,9%, 1 mL/kg). Os animais foram divididos em cinco grupos: Controle (salina em todos os ciclos), 90 (DEX apenas aos 90 dias), 30+90 (DEX aos 30 e 90 dias), 60+90 (DEX aos 60 e 90 dias) e 30+60+90 (DEX nos três ciclos). O peso corporal e o consumo alimentar foram monitorados ao longo dos ciclos. No último dia do ciclo final, os animais foram submetidos a um teste de tolerância à glicose e 24 horas depois por um teste de tolerância à insulina. Em seguida, os animais foram eutanasiados para coleta de sangue e órgãos metabólicos. O tratamento com DEX interrompeu ou até reduziu o ganho de peso em comparação ao grupo controle, independentemente do ciclo em que isso se deu. Este dado esteve associado a menor ingestão alimentar nos animais tratados com DEX no segundo e terceiro ciclos. Todos os grupos tratados com DEX desenvolveram intolerância à glicose e apenas o grupo 30+60+90 não apresentou menor resposta à insulina. Todos os grupos tratados com DEX tiveram menor massa esplênica e adrenal, enquanto apenas o grupo 30+60+90 não desenvolveu maior massa hepática em relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas na massa do tecido adiposo visceral nos grupos tratados com DEX. Exceto pelo grupo 30+60+90, o tratamento com DEX resultou em hiperinsulinemia que esteve acompanhada de hipertriacilgliceridemia em todos os grupos DEX. Apenas o grupo 90 apresentou níveis menores de corticosterona em relação do grupo controle. Exceto pelo grupo 30+60+90, todos os demais grupos DEX exibiram maior conteúdo hepático de triglicerídeos e glicogênio em comparação ao grupo controle. A massa de células β foi maior apenas nos grupos 90 e 60+90. Assim, concluímos que exposições repetidas, desde que iniciadas na primeira infância, comprometem o crescimento dos animais, enquanto atenuam os desfechos metabólicos na vida adulta. A despeito de qual seja o mecanismo subjacente, é importante considerar tais achados no contexto clínico, visando mitigar prejuízos no crescimento bem como a necessidade de superdosagem futura.

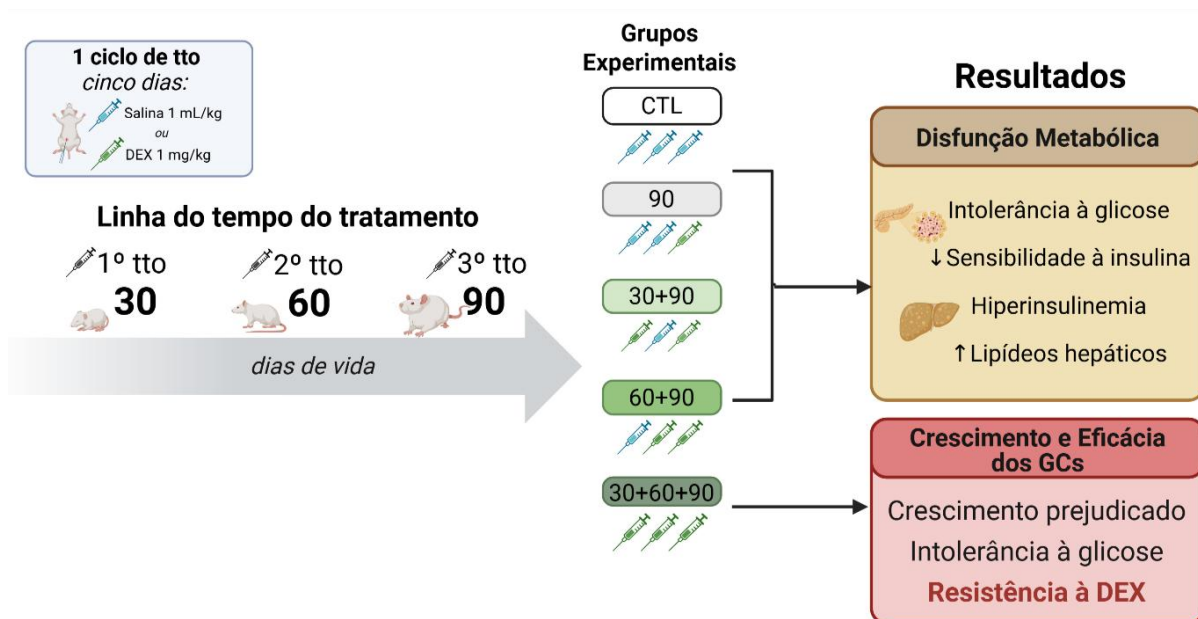
Palavras-chave Glicocorticoides, dexametasona, diabetes, homeostase glicêmica, resistência à glicocorticoides.

ABSTRACT

Dexamethasone (DEX) is a glucocorticoid widely used for its anti-inflammatory and immunosuppressive actions at different stages of life. However, DEX treatments may also be associated with diabetogenic effects. In this context, we aimed to investigate whether prior DEX treatment(s) could exacerbate the metabolic disturbances induced by a subsequent DEX treatment in adulthood. To address this objective, male rats were subjected to up to three treatment cycles starting at postnatal days 30, 60, and 90. Each cycle consisted of a single daily intraperitoneal injection for five consecutive days of DEX (1.0 mg/kg) or saline (0.9% NaCl, 1 mL/kg). Animals were divided into five groups: Control (saline in all cycles), 90 (DEX only at 90 days), 30+90 (DEX at 30 and 90 days), 60+90 (DEX at 60 and 90 days), and 30+60+90 (DEX in all three cycles). Body weight and food intake were monitored throughout the cycles. On the last day of the final cycle, animals underwent a glucose tolerance test (GTT) followed 24 hours later by an insulin tolerance test (ITT). Subsequently, animals were euthanized for blood and metabolic organ collection. DEX treatment impaired or even reduced weight gain compared to the control group, regardless of the treatment cycle. This finding was associated with lower food intake in animals treated with DEX during the second and third cycles. All DEX-treated groups developed glucose intolerance and, except for the 30+60+90 showed reduced insulin responsiveness, with a milder effect in the 30+60+90 group. All DEX-treated groups exhibited reduced spleen and adrenal mass, while only the 30+60+90 group did not develop increased liver mass compared to controls. No significant differences were observed in visceral adipose tissue mass in DEX-treated groups. Except for the 30+60+90 group, DEX treatment resulted in hyperinsulinemia accompanied by hypertriglyceridemia in all DEX groups. Only the 90 group showed lower corticosterone levels compared to the control. Except for the 30+60+90 group, all other DEX groups exhibited increased hepatic triglyceride and glycogen content relative to the control group. β -cell mass was increased only in the 90 and 60+90 groups. Thus, we conclude that repeated DEX exposures starting in early life impair animal growth while attenuating some metabolic outcomes in adulthood. Regardless of the underlying mechanism, it is important to consider these findings in clinical contexts to mitigate growth impairments and reduce the need for future overdosing.

Keywords: Glucocorticoids, dexamethasone, diabetes, glucose homeostasis, glucocorticoid resistance.

RESUMO GRÁFICO



Resumo Gráfico. Ratos foram expostos à DEX em diferentes fases do desenvolvimento e avaliados quanto ao crescimento, homeostase glicêmica e parâmetros metabólicos. Até duas exposições à DEX ao longo da vida coincidem com os desfechos diabotogênicos clássicos do glicocorticoide. Por outro lado, exposições sucessivas, por três ciclos, desde a infância, não causaram os mesmos efeitos deletérios no metabolismo, mas comprometeram o crescimento corporal. Esses achados sugerem desenvolvimento de menor responsividade aos glicocorticoides, com potencial impacto na eficácia terapêutica futura. **Fonte:** elaborado pela autora.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação dos GCs.	17
Figura 2: Grupos experimentais	27
Figura 3: Delineamento experimental.....	28
Figura 4: Avaliação murinométrica durante o primeiro ciclo de tratamento com DEX ou salina aos 30 dias de idade.	34
Figura 5: Ganho de massa corpórea total durante o intervalo entre 30 e 60 dias de idade.	35
Figura 6: Avaliação murinométrica durante o segundo ciclo de tratamento com DEX ou salina aos 60 dias de idade.....	36
Figura 7: Avaliação do desenvolvimento murinométrico pela análise de ganho de massa corpórea total durante o intervalo de 30 a 90 dias de idade.	37
Figura 8: Avaliação murinométrica durante o terceiro ciclo de tratamento com DEX ou salina aos 90 dias de idade.....	38
Figura 9: Resposta à insulina em ratos com exposição repetida à DEX	39
Figura 10: Avaliação da tolerância à glicose em ratos com exposição repetida de dexametasona.....	39
Figura 11: Massa de órgãos periféricos ao término do último ciclo de tratamento com DEX.....	40
Figura 12: Massa do tecido adiposo visceral ao término do último ciclo de tratamento com DEX.	40
Figura 13: Avaliação de parâmetros bioquímicos plasmáticos ao término do último ciclo de tratamento com DEX.....	41
Figura 14: Avaliação histológica e bioquímica do fígado ao término do último ciclo de tratamento com DEX.....	42
Figura 15: Avaliação histológica do pâncreas total ao término do último ciclo de tratamento com DEX.....	43
Figura 16: Avaliação da distribuição de células α e β pancreáticas ao término do último ciclo de tratamento com DEX.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais GCs utilizados na clínica.....	19
Tabela 2 - Desfechos metabólicos reportados em estudos pré-clínicos com DEX ...	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIE	Anti-inflamatórios esteroidais
ATGL	Lipase do triacilglicerol adiposa
CBG	Globulina de ligação aos corticosteroides
COX-2	Enzima ciclooxygenase-2
DEX	Dexametasona
DBD	Domínio de ligação ao DNA
G6Pase	Glicose-6-fosfatase
GCs	Glicocorticoides
GREs	Elementos responsivos aos glicocorticoides
GR	Receptor de glicocorticoides
GSIS	Secreção de insulina estimulada por glicose
HATs	Histona acetiltransferases
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HDACs	Histona deacetilases
HSP90	Proteínas de choque térmico
ipGTT	Tolerância intraperitoneal à glicose
ipITT	Teste de tolerância à insulina intraperitoneal
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LPL	Lipase lipoproteica
MGL	Lipase do monoacilglicerol
MR	Receptores de mineralocorticoides
NGREs	Elementos negativos responsivos a glicocorticoides
NTD	N-terminal (domínio amino-terminal)
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinase
11 β -HSD	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase 1/2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2	OBJETIVO GERAL	24
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	MARCO REGULATÓRIO	25
3.2	ANIMAIS.....	25
3.3	TAMANHO AMOSTRAL.....	25
3.4	PROTOCOLO DE TRATAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS	26
3.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
3.6	PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS E METABÓLICOS.....	28
3.6.1	Massa corpórea	28
3.6.2	Ingesta alimentar	28
3.6.3	Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT)	29
3.6.4	Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT):	29
3.7	EUTANÁSIA E ANÁLISES <i>POST-MORTEM</i>	30
3.7.1	Eutanásia	30
3.7.2	Testes colorimétricos	30
3.7.3	Quantificação de corticosterona e insulina plasmática	30
3.7.4	Massa absoluta e relativa dos órgãos	30
3.7.5	Triglicerídeos hepáticos	31
3.7.6	Glicogênio hepático	31
3.7.7	Morfologia hepática e massa de ilhotas pancreáticas	31
3.7.8	Imunofluorescência	32
3.7.9	Análise estatística	33
4	RESULTADOS	34
4.1	ACOMPANHAMENTO MURINOMÉTRICO DURANTE OS CICLOS DE 30 DIAS	34
4.2	ACOMPANHAMENTO MURINOMÉTRICO NO CICLO DE TRATAMENTO AOS 60 DIAS.....	35
4.3	IMPACTO DO HISTÓRICO DE EXPOSIÇÕES PRÉVIAS COM DEX AO REALIZAR O TRATAMENTO AOS 90 DIAS.....	36

4.3.1	Resposta murinométrica no ciclo de tratamento aos 90 dias	36
4.3.2	Resposta à insulina aos 90 dias	38
4.3.3	Tolerância à glicose aos 90 dias	39
4.4	AVALIAÇÕES <i>POST-MORTEM</i>	40
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE A – LIMITAÇÕES	64
	ANEXO A – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ..	66

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os glicocorticoides (GCs) são hormônios esteroides sintetizados na zona fasciculada do córtex adrenal, desempenhando ações centrais na regulação do metabolismo glicídico e lipídico, além de modularem respostas imunes e inflamatórias. Nos seres humanos, o principal GC endógeno é o cortisol, equivalente a corticosterona nos roedores. Após sua liberação, os GCs circulam ligados à globulina de ligação aos corticosteroides (CBG) e à albumina, sendo que apenas uma fração (aproximadamente 5%) permanece livre e biologicamente ativa. A biodisponibilidade tecidual desses hormônios não depende apenas da secreção via eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), mas também do metabolismo pré-receptor, mediado pelas isoformas da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase (11 β -HSD). A 11 β -HSD1 catalisa a conversão de cortisona em cortisol em humanos, e de 11-desidrocorticosterona em corticosterona em roedores, promovendo a ativação local dos GCs. A 11 β -HSD2 atua de forma oposta, convertendo os GCs ativos em suas formas inativas, regulando assim sua ação nos tecidos-alvo (Chapman; Holmes; Seckl, 2013; Ramamoorthy; Cidlowski, 2016; Agnew *et al.*, 2018).

O receptor de glicocorticoides (GR) pertence à família dos receptores nucleares e apresenta a arquitetura estrutural típica composta por três domínios funcionais: o domínio N-terminal (NTD), que contém a região de ativação transcricional; o domínio de ligação ao DNA (DBD); e o domínio de ligação ao ligante (LBD), que medeia a interação com o hormônio e participa da dimerização, transativação e transrepressão gênica. Em humanos, o GR é codificado pelo gene *NR3C1*, localizado no cromossomo 5, enquanto em roedores é derivado do gene *Nr3c1*, situado no cromossomo 18. O *splicing* alternativo do éxon 9 em humanos gera predominantemente as isoformas GR- α (ativa) e GR- β (dominante-negativa), além de variantes menos caracterizadas, como GR- γ , GR-A e GR-P. Nos roedores, a isoforma GR- α também inclui o éxon 9, porém a isoforma GR- β decorre de um evento de *splicing* no íntron 8, refletindo diferenças interespecies no processamento pós-transcricional desse receptor (Ramamoorthy; Cidlowski, 2016; Martinez *et al.*, 2024).

A isoforma GR- α é a principal mediadora da sinalização dos GCs, sendo funcionalmente ativa e capaz de ligar tanto a GCs endógenos quanto exógenos. Ainda não foram identificados quais os ligantes endógenos da isoforma GR- β nem sua função fisiológica está completamente elucidada. O heterodímero formado entre GR-

α e GR- β pode interagir com os GCs; entretanto, a presença de GR- β exerce um efeito dominante inibitório sobre a transdução do sinal mediado por GR- α . Nesse sentido, GR- β tem sido tradicionalmente associado a um mecanismo de retroalimentação negativa em nível celular, no qual sua coexpressão com GR- α resulta na formação de complexos transcricionalmente inativos. Mecanicamente, enquanto GR- α recruta enzimas histona acetiltransferases (HATs), promovendo a ativação transcricional de genes-alvo, GR- β favorece a interação com histona deacetilases (HDACs), suprimindo as respostas genômicas induzidas pelos GCs (Martinez *et al.*, 2024).

Os GR localizam-se no citoplasma acoplados a proteínas de choque térmico (HSP90), e a imunofilinas, incluindo P23 e FKBP51, que estabilizam a conformação do receptor e evitam sua degradação prematura (Figura 1). Quando ativados pelo ligante, a interação com o receptor induz uma alteração conformacional, que promove a dissociação do complexo com as chaperonas citoplasmáticas, permitindo a dimerização do receptor com o ligante e sua subsequente translocação para o núcleo celular. No núcleo, o complexo GC-GR atua como fator de transcrição ao se ligar a elementos responsivos aos glicocorticoides (GREs), promovendo a transativação de genes-alvo. Esse processo resulta, por exemplo, na transrepressão gênica, por meio da interação com elementos negativos responsivos a glicocorticoides (nGREs), suprimindo a transcrição de genes pró-inflamatórios, como as interleucinas 1 e 6, a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), além de inibir a produção do fator de crescimento de células T, como a interleucina 2 (IL-1), o que inibe a proliferação de linfócitos T (Czock *et al.*, 2005). Em paralelo, ocorre a transativação de genes relacionados as citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10, e de genes envolvidos na regulação do metabolismo (Czock *et al.*, 2005; De Bosscher *et al.*, 2010).

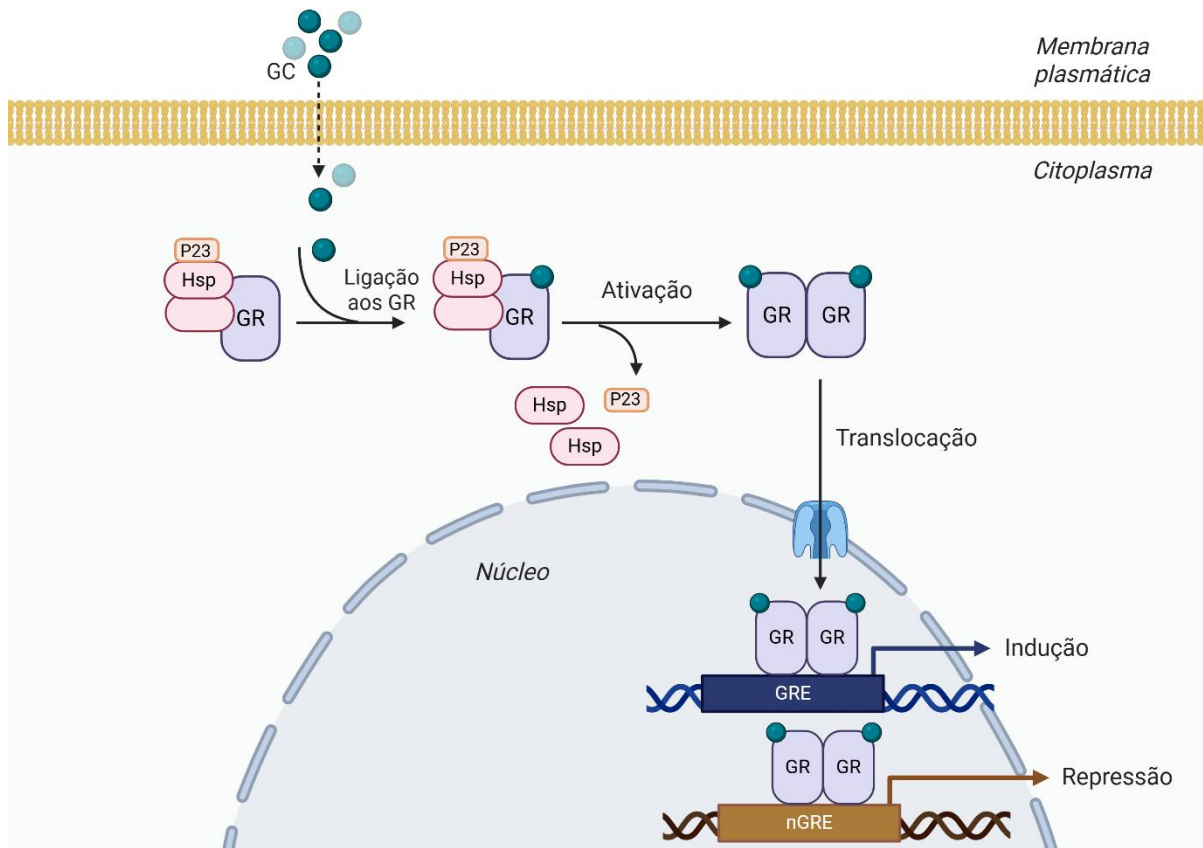


Figura 1: Mecanismo de ação dos GCs. Em condições basais, os receptores de glicocorticoides (GR) permanecem inativos no citoplasma, associados às proteínas de choque térmico (Hsp). A ligação dos glicocorticoides (GC), incluindo a dexametasona (DEX), ao GR promove a dissociação desse complexo e a translocação do GR ativado para o núcleo. No núcleo, o complexo GC-GR se liga aos elementos responsivos aos glicocorticoides (GRE) ou aos elementos negativos (nGRE), modulando a expressão gênica. Essa modulação resulta na inibição de genes pró-inflamatórios e na ativação de genes anti-inflamatórios e relacionados à regulação metabólica. Fonte: elaborado pela autora

Além dos efeitos genômicos clássicos, os GCs também exercem ações não genômicas, caracterizadas por seu efeito rápido e independente da modulação transcricional. Esses efeitos são mediados por mecanismos que incluem a interação dos GCs com receptores de membrana ou por modificações diretas nas propriedades físico-químicas da membrana celular. Tais interações podem influenciar o fluxo de íons, especialmente o cálcio (Ca^{2+}), cuja concentração intracelular pode ser aumentada ou reduzida, de acordo com cada célula alvo (Löwenberg *et al.*, 2008; Panettieri *et al.*, 2019).

Outro componente essencial para a compreensão da dinâmica dos GCs é o equilíbrio funcional entre os GR e os receptores de mineralocorticoides (MR), bem como as respectivas afinidades dos seus ligantes endógenos por esses receptores. O cortisol e a corticosterona apresentam afinidade significativamente maior pelos MR do

que pela isoforma GR- α (De Kloet *et al.*, 1984). Em condições basais, os MR estão predominantemente ocupados pelos GCs, dado que sua afinidade pelos MR é superior à afinidade pelos GR. Para que a ativação mediada por GR- α ocorra de forma significativa, é necessário que a concentração plasmática de GCs livres ultrapasse o limiar de saturação dos MR — aproximadamente 300 nM de cortisol livre (Garbrecht *et al.*, 2006). Essa dinâmica entre ligantes e receptores é modulada de forma tecido-específica. Por exemplo, em tecidos classicamente alvos da aldosterona, como os túbulos distais renais, a enzima 11 β -HSD2 é altamente expressa e converte o cortisol ativo em sua forma inativa (cortisona), impedindo a ativação dos MR pelos GCs. Com isso, há a interação da aldosterona — que não é substrato da 11 β -HSD2 — com os MR. No contexto dos GCs exógenos, observa-se uma variabilidade nas afinidades por GR- α : enquanto compostos como a hidrocortisona apresentam perfil farmacodinâmico semelhante ao cortisol, fármacos como a dexametasona (DEX) exibem alta afinidade pelos GR, afinidade muito reduzida pelos MR e não são substratos da 11 β -HSD2 (Chapman; Holmes; Seckl, 2013; Agnew *et al.*, 2018; Martinez *et al.*, 2024).

A compreensão dessas especificidades farmacodinâmicas é fundamental para contextualizar os efeitos clínicos dos GCs, cuja ampla aplicação terapêutica é reflexo direto das suas propriedades farmacológicas. Os fármacos GCs constituem uma classe de fármacos amplamente empregada na prática clínica, sobretudo por suas potentes propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, sendo classificados como anti-inflamatórios esteroidais (AIE). Devido a esses efeitos, os GCs são utilizados como terapias de primeira linha no manejo de diversas doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo asma, lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide, além de terem sido incorporados aos protocolos terapêuticos da COVID-19. No contexto pediátrico, os GCs também desempenham um papel relevante, sendo indicados para o tratamento da artrite idiopática juvenil (Batu; Ezgi, 2019) e para o controle de episódios de sibilância, frequentemente associados a doenças respiratórias como asma, bronquite e infecções virais (Beigelman; Bacharier, 2016; Kaiser *et al.*, 2016). A aplicação dos GCs em crianças pode ocorrer de forma contínua, intermitente ou em regimes agudos, dependendo do quadro clínico e da gravidade da manifestação respiratória. O uso clínico de diferentes tipos de GCs e seus desfechos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais GCs utilizados na clínica.

GC	Potência	Principais doenças	Posologia	Eventos adversos	Autores
HiC	1*	Insuficiência adrenal, Pneumonia, Dermatite atópica	5 mg 3x ao dia, VO; 10mg/hora, 7 dias, IV.	-Dermatite de contato, hipertensão e hipertensão ocular, osteoporose, -Desfechos metabólicos: Ganho de peso e DM2	Confalonieri 2005; Williams, 2018; Brazzini, Pimpinelli, 2002.
BUD	3,75	Asma, DPOC, Rinite, Hepatite autoimune	0,5 a 2mg/dia VO, por 12 semanas; 2 a 4mg VO, dose única, 2 a 8 mg/dia vo, 30mg a cada 12h, VO, 100ug/ dia, VI; 3-9 mg, uso diário ou intervalado, de 24 semanas a 8 anos;	-Candidíase oral (suspensão inalatória), -Desfechos metabólicos: intolerância à glicose (uso sistêmico)	Hvizdos, Jarvis, 2000; Clissold, Heel, 1984; Zandieh 2008; Canis 2007.
PRED	4	Lúpus eritematoso sistêmico, Artrite reumatoide, Bronquite eosinofílica Asma	15–20 mg/dia, VO; 3-10 mg-dia, VO; 30-80mg/dia, vo 3-14 dias	-Náuseas, dor abdominal nasofaringite, dores de cabeça, rubor, retenção de água -Desfechos metabólicos: ganho de peso, intolerância à glicose	Ruiz-Irastoza 2021; Krasselt, Baerwald, 2016; Sakae, 2014.
DEX	25-30	Asma, Inflamação de garganta e tosse persistente, COVID-19, síndrome respiratória aguda grave	0.6-1.7 mg/kg, im 1-5 dias; 10mg/vo; 6mg/dia 7 dias, VO; 20 mg/dia IV por 5 dias seguido de 10mg/dia 5 dias	-Dor de cabeça, dores abdominais. - Desfechos metabólicos: intolerância à glicose, DM2	Keeney et al., 2014; Sadeghirad 2017, Quek, 2021; Villar, 2020.

Legenda: *Relativa à hidrocortisona. HiC: hidrocortisona, BUD: budesonida, PRE: prednisona, DEX: dexametasona, DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica, DM2: Diabetes Mellitus tipo 2, VO: via oral, VI: via intranasal, IM: intramuscular, IV: intravenosa.

Apesar da reconhecida eficácia dos GCs no controle de processos inflamatórios e imunológicos, seu uso terapêutico está frequentemente associado a uma ampla gama de efeitos adversos, particularmente em relação à regulação da homeostase glicêmica e ao metabolismo energético. Os GCs exercem ações metabólicas em tecidos-alvo como fígado, músculo esquelético, tecido adiposo e pâncreas. No fígado, promovem a gliconeogênese, enquanto nos tecidos periféricos — como músculo esquelético e tecido adiposo — inibem a captação de glicose, contribuindo para um estado de resistência à insulina (Kuo *et al.*, 2015; Magomedova; Cummins, 2015). No músculo esquelético, os GCs induzem a proteólise, fornecendo substratos para a gliconeogênese hepática. No pâncreas, a administração de GCs exógenos aumenta a secreção de glucagon por células α , o que, em conjunto com a resistência periférica à insulina, induz uma resposta compensatória das células β com aumento da secreção de insulina (Karlsson *et al.*, 2001; Rafacho *et al.*, 2010b; Rafacho *et al.*, 2011).

Além a ação no metabolismo glicêmico, os GCs também modulam o metabolismo lipídico de maneira tecido-específica: promovem lipólise no tecido adiposo subcutâneo por meio da regulação da expressão e atividade de lipases como a lipase do triacilglicerol adiposa (ATGL), lipase sensível a hormônios (HSL) e lipase do monoacilglicerol (MGL), aumentando a concentração plasmática de ácidos graxos livres (Peckett; Wright; Riddell, 2011). Enquanto no tecido adiposo visceral os GCs favorecem a lipogênese, particularmente em contexto pós-prandial em sinergia com a insulina (Magomedova; Cummins, 2015; Mir *et al.*, 2021). Essas ações resultam em um padrão de redistribuição de gordura corporal que caracteriza condições hipercortisolêmicas, como a síndrome de Cushing, associada à exposição crônica a níveis elevados de cortisol (Newell-Price *et al.*, 2006).

Os GCs exercem efeitos metabolicamente antagônicos aos da insulina, sendo assim reconhecidos como compostos diabetogênicos, característica bem descrita em indivíduos adultos. Modelos experimentais em roedores demonstram de forma bem consolidada esses efeitos: ratos Wistar tratados com DEX na dose de 1,0 mg/kg por cinco dias desenvolvem intolerância à glicose, redução da sensibilidade à insulina e

perda de peso corporal. Essa redução ponderal decorre tanto da diminuição da ingestão alimentar quanto da perda de massa muscular esquelética (Dos Santos *et al.*, 2014; Rafacho *et al.*, 2014b). Além disso, esses animais exibem acúmulo lipídico hepático, dislipidemia e elevação das proteínas plasmáticas, associados à indução de vias gliconeogênicas hepáticas — evidenciada pela supraregulação das enzimas fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) (Rafacho *et al.*, 2014a; Rafacho *et al.*, 2014b; Magomedova; Cummins, 2015). Apesar da predominância de efeitos contrarregulatórios em relação à insulina, há evidências de uma interação sinérgica entre DEX e insulina na indução da lipogênese. Estudos *in vitro* demonstram que a exposição prolongada de adipócitos à insulina (7 nM) e DEX (25 nM) por sete dias resulta no aumento da expressão de fatores de transcrição lipogênicos como STAT5 e FoxO1, bem como na elevação da atividade da lipase lipoproteica (LPL) no tecido adiposo (Mi-Jeong *et al.*, 2011; Appel & Fried, 1992; Fried *et al.*, 1993). Esses achados reforçam a complexidade dos efeitos dos GCs sobre o metabolismo lipídico, que podem depender do contexto hormonal e do tipo celular envolvido.

A administração de DEX em animais adultos impacta significativamente a função pancreática. Em ratos tratados por cinco dias com 1 mg/kg, observam-se alterações morfofuncionais nas células β , incluindo aumento da secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS), maior massa celular, elevação do cálcio intracelular e acúmulo de grânulos de insulina ancorados à membrana plasmática — características que intensificam a fase inicial da secreção de insulina (Rafacho *et al.*, 2010a; Dos Santos *et al.*, 2014). Paralelamente, a DEX também promove expansão da massa de células α e elevação das concentrações plasmáticas de glucagon, o que pode contribuir para a hiperinsulinemia observada em jejum (Rafacho *et al.*, 2014a), que ocorre devido ao tônus parácrino das células α sobre as células β . Destaca-se que tais mecanismos compensatórios são reversíveis após a suspensão do tratamento (Rafacho *et al.*, 2010b). Contudo, ainda não se conhece a extensão das alterações induzidas por múltiplos tratamentos com DEX, nem como seria a resposta e se tais adaptações morfofuncionais se manteriam em indivíduos adultos previamente expostos ao fármaco. Os principais desfechos metabólicos da DEX em roedores estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 - Desfechos metabólicos reportados em estudos pré-clínicos com DEX

Tratamento	Desfechos	Autores
<i>DEX: 1 mg/kg, ip – 5 dias, Ratos Wistar machos e fêmeas, 3 e 12 meses..</i>	-Hiperinsulinemia, -Hipertriacilgliceridemia, -↓ da ingesta alimentar e massa corporal -Intolerância à glicose em machos (3 e 12 meses), e fêmeas (12)	Dos Santos <i>et al.</i> , 2014
<i>DEX: 1mg/kg, ip - 5 dias, Ratos Wistar machos</i>	-Hiperglucagonemia -↓ sensibilidade à insulina -↑ Massa de células α	Rafacho <i>et al.</i> , 2014a
<i>DEX: 1mg/kg, ip - 5 dias, Ratos Wistar machos</i>	-↑ GSIS -↑ Concentração de Ca^{2+} em ilhotas -↑ Grânulos de insulina âncorados a membrana plasmática	Rafacho <i>et al.</i> , 2010a
<i>DEX: 1mg/kg, ip - 5 dias, Ratos Wistar machos</i>	-↓ Massa corporal - Hiperinsulinemia -↓ Sensibilidade à insulina -↑ Intolerância a glucose -↑ Massa de células β - Efeitos reversíveis após tto.	Rafacho <i>et al.</i> , 2010b
<i>DEX: 1.5 mg/kg/ 3, 5 e 7 dias, Ratos Sprague Dawley machos 3 e 24 meses</i>	-Hiperleptinemia persistente -↓ Ingesta alimentar (revertida em machos de 3 meses) -↓ Ingesta alimentar persistente (24 meses)	Caldefie-CH <i>et al.</i> , 2001
<i>DEX: 1mg/kg por 7 dias, Ratos Hannover machos</i>	-↑ G6PDH -↑ IBAT (↑ lipídeos IBAT e ↓ conteúdo proteico IBAT) -↑ Ácidos graxos não esterificados e glicerol	Assis <i>et al.</i> , 2022

Legenda: GSIS: secreção de insulina estimulada pela glicose; G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase; IBAT: tecido adiposo marrom interescapular.

A utilização clínica dos GCs, como a DEX, decorre de sua comprovada eficácia anti-inflamatória e imunossupressora em diversas condições patológicas ao longo da vida. Entretanto, os potenciais efeitos adversos, sobretudo aqueles relacionados à homeostase metabólica, exigem atenção contínua. Embora os efeitos metabólicos de regimes de administração aguda ou prolongada de GCs em adultos sejam bem documentados na literatura clínica e experimental, a exposição repetida em diferentes fases da vida permanece pouco explorada, apesar de ser uma prática comum. Patologias crônicas, como a asma, frequentemente requerem múltiplos ciclos terapêuticos com GCs desde a infância até a idade adulta, seja por recorrência ou por

agravamento do quadro clínico. Além disso, outras condições como infecções, doenças autoimunes e dor neuropática também demandam intervenções intermitentes com GCs ao longo da vida. Estudos clínicos já demonstraram a eficácia do uso intermitente de DEX em adultos com dor associada ao herpes-zóster (Choi *et al.*, 2020) e em protocolos terapêuticos para pêfigo vulgar (Pasricha; Thanzama; Khan, 1998). Ainda, a Síndrome de Cushing cíclica exemplifica um modelo endógeno de exposição intermitente a níveis elevados de cortisol (Światkowska-Stodulska *et al.*, 2021; Velez; Mayberg; Ludlam, 2007). Considerando esse contexto, torna-se fundamental compreender os desfechos metabólicos da reexposição a GCs na vida adulta após tratamentos prévios, uma vez que adaptações morfofuncionais estabelecidas precocemente podem modular a resposta à novas exposições. Assim, investigar essas respostas é crucial para embasar estratégias terapêuticas mais seguras e individualizadas em indivíduos com histórico de uso recorrente de GCs.

Apesar de vasta literatura dedicada aos efeitos adversos da DEX na vida adulta, ainda há uma lacuna no entendimento dos impactos metabólicos decorrentes da exposição repetida a esses fármacos ao longo da vida. Nesse contexto, a presente investigação propõe como pergunta central: **qual é o impacto da reexposição à DEX na vida adulta sobre a homeostase glicêmica e lipídica em ratos previamente tratados com o fármaco?** Com relação à pergunta central da pesquisa e com base na literatura pré-clínica, hipotetizamos que os efeitos metabólicos serão exacerbados nos animais submetidos a múltiplos ciclos de tratamento com DEX.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar como o histórico de exposição repetida à DEX ao longo da vida impacta a homeostase glicêmica e lipídica após o tratamento com DEX na vida adulta

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar se as diferentes variações de exposição repetida de DEX altera parâmetros biométricos dos animais;
- Avaliar se tratamentos prévios com DEX em diferentes estágios da vida somado ao tratamento com DEX aos 90 dias impacta a homeostase glicêmica e lipídica, bem como parâmetros bioquímicos plasmáticos e hepáticos;
- Caracterizar a influência de vários tratamentos com DEX sobre a morfologia hepática e do pâncreas endócrino;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MARCO REGULATÓRIO

Os procedimentos adotados seguiram as regulamentações vigentes para utilização de animais em pesquisas científicas e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFSC (nº. 8396201023).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) provenientes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (30 x 19 x 13 cm) com sistema de grade elevada, com maravalha, dispondo de água e ração *ad libitum*, permanecendo no Biotério Setorial de Ratos do Departamento de Ciências Fisiológicas “Adair Roberto Soares dos Santos”, com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12:12 horas (luzes acesas às 6:00 e desligadas às 18:00). Os animais foram solicitados com 21 dias de vida para aclimação no biotério e foram examinados regularmente nos momentos de manipulação. Todos os animais passaram por adaptação com o pesquisador, de acordo com o enriquecimento ambiental sobre relação homem-animal. Ainda, foram fornecidos tubos de PVC para promover enriquecimento ambiental físico conforme consta no Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica (2023).

3.3 TAMANHO AMOSTRAL

O número de animais para cada grupo experimental foi estabelecido de acordo com o ‘n’ estimado em publicações da área, bem como confirmado pelo cálculo amostral. Para o cálculo foi considerado erro α 0,05 e β 0,2, desvio padrão estimado de 10% e diferença mínima a ser detectada na ordem de 15%. Dessa forma, cada grupo experimental foi composto por 10 animais por grupo, totalizando 50 animais no experimento, divididos em 5 grupos. Com isso, seguimos o princípio de “redução” dos 3Rs da ética de experimentação em animais, sendo utilizado o mínimo de animais possíveis para produzir um resultado conclusivo.

3.4 PROTOCOLO DE TRATAMENTO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais passaram por três ciclos de tratamento, com cinco dias de tratamento em cada ciclo. O tratamento consistiu em injeções diárias de DEX (dexametasona fosfato, Decadron®, Aché, São Paulo, SP) na dose equivalente a 1,0 mg de DEX por kilo de massa corpórea (m.c.) pela via intraperitoneal (i.p.) ou solução veículo (salina 0,9% NaCl, 1 mL/kg, p.c., i.p.), administrada entre 7:00 e 8:00 da manhã. Os ciclos de tratamento ocorreram aos 30, 60 e 90 dias de idade. Ou seja, dos 30 aos 34, 60 aos 64 e 90 aos 94 dias de idade ocorreu o primeiro, segundo e terceiro ciclos de tratamento. Os grupos foram compostos da seguinte forma (Figura 2): **Grupo Controle:** recebeu apenas solução salina em todos os ciclos de tratamento, aos 30, 60 e 90 dias de vida; **Grupo 90:** recebeu tratamento com solução salina aos 30 e 60 dias de vida e tratamento com DEX no ciclo de tratamento aos 90 dias de vida; **Grupo 30+90:** recebeu tratamento com solução salina aos 60 dias de vida e tratamentos com DEX nos ciclos de 30 e 90 dias de vida; **Grupo 60+90:** recebeu tratamento com solução salina aos 30 dias de vida, seguido de tratamento com DEX nos ciclos aos 60 e 90 dias de vida; **Grupo 30+60+90:** recebeu o tratamento com DEX nos três momentos, aos 30, 60 e 90 dias de vida.

A dose de referência (1 mg/kg, m.c.) é a mesma de trabalhos prévios Rafacho *et al.*, 2008, Rafacho *et al.*, 2010a, de Paula *et al.*, 2011, dos Santos *et al.* 2014, da Silva *et al.*, 2023 e foi selecionada para que possamos ter uma referência das alterações esperadas no grupo 90, considerando o objetivo de avaliar o efeito dos históricos de tratamento ao realizar o tratamento de 90 dias.

O escalonamento alométrico consiste em determinar a dose equivalente em humanos (HED) a partir da normalização da dose administrada com base na área de superfície corporal. Dessa forma, representa uma maneira de estimar uma dose preditiva aproximada, relacionando a dose utilizada no estudo experimental com a correspondente em humanos (Nair; Jacob, 2016). O fator de conversão (K_m) é obtido pela estimativa que divide o peso corporal médio da espécie pela sua respectiva área de superfície corporal. O cálculo é feito da seguinte maneira: $HED (mg/kg) = dose utilizada no animal (mg/kg) * (K_m humano/K_m rato)$.

Para o nosso estudo, temos que: $HED (mg/kg) = 1 \times (6/37) = 0,162 mg/kg$.

Ou seja, para um humano de 60kg, a dose aproximada equivalente seria de aproximadamente 9,7 mg.

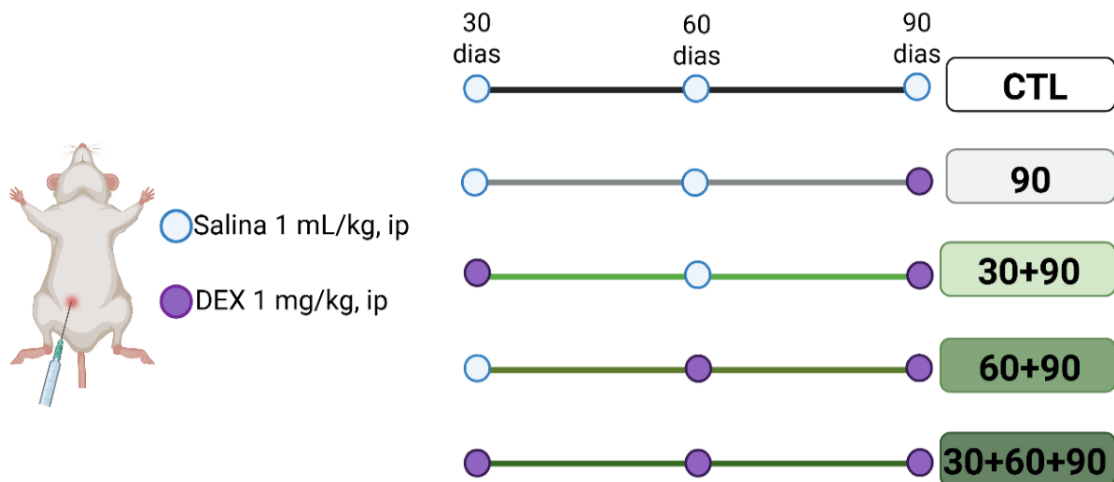


Figura 2: Grupos experimentais. Os animais receberam DEX ou salina por cinco dias consecutivos em até três ciclos, aos 30, 60 e 90 dias de idade. Formaram-se cinco grupos: Controle (salina em todos os ciclos), 90 (DEX apenas aos 90 dias), 30+90 (DEX aos 30 e 90 dias), 60+90 (DEX aos 60 e 90 dias) e 30+60+90 (DEX nos três ciclos). **Fonte:** Elaborado pela autora.

3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram aclimatados no biotério durante uma semana. Ao completarem 28-30 dias de vida, os procedimentos de avaliação de massa corpórea e da ingesta alimentar foram realizados diariamente, seguido do início do tratamento com solução salina ou DEX como descrito no item 3.4. O mesmo procedimento foi repetido quando os animais completarem 60 e 90 dias de vida. Ao final do terceiro ciclo de tratamento, no final da tarde do quinto dia de tratamento foi realizado o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT). Posteriormente, no dia seguinte ao fim do tratamento, o teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT) foi realizado às 16 horas. Após o término do ipGTT, os animais foram encaminhados para a eutanásia e coleta de órgãos (Figura 3).

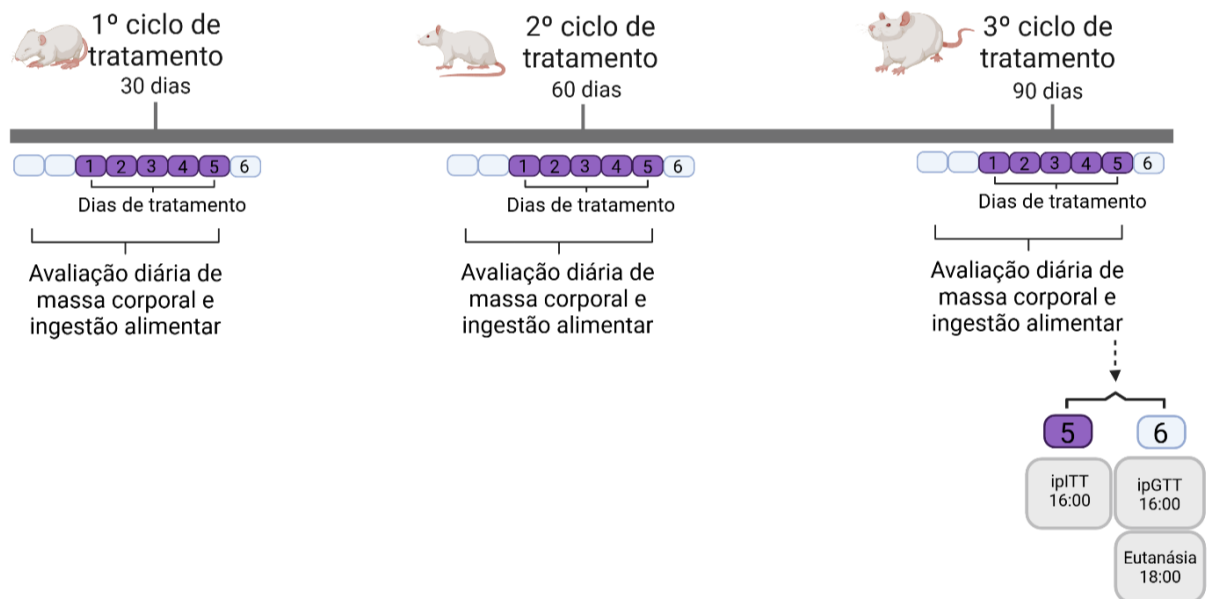


Figura 3: Delineamento experimental. Os animais foram monitorados a partir dos 30 dias para o monitoramento diário de peso e consumo alimentar, seguido do tratamento com salina ou DEX. Esse protocolo se repetiu aos 60 e 90 dias. Ao final do terceiro ciclo, realizaram-se o ipITT e, no dia seguinte, o ipGTT, seguidos da eutanásia e coleta de órgãos. **Fonte:** elaborado pela autora.

3.6 PARÂMETROS MURINOMÉTRICOS E METABÓLICOS

3.6.1 Massa corpórea

A avaliação do peso corporal dos animais iniciou três dias antes de cada protocolo e seguiu diariamente durante cada ciclo de tratamento. Com os valores obtidos durante o tratamento, foi calculado a somatória do ganho de peso corporal durante os cinco dias de tratamento: Δ da massa corporal = massa corporal ao final do tratamento - massa corporal ao início do tratamento.

3.6.2 Ingesta alimentar

A determinação da ingesta alimentar ocorreu nos mesmos dias da quantificação da massa corporal. Para a avaliação da ingesta alimentar foi adicionada uma quantidade pré-determinada de ração em um dia e 24 h após foi pesado a quantidade remanescente. Para definir estimativa de consumo dos animais em uma caixa foi utilizado o seguinte cálculo: [(quantidade de ração adicionada inicialmente - quantidade final da ração) / número de animais na caixa]. Os valores da ingestão alimentar foram normalizados de acordo com o peso individual dos animais com o seguinte cálculo: [(estimativa do consumo alimentar x 100) / peso do animal]. Além disso, a quantidade total em gramas ração consumida durante os cinco dias de tratamento também foi contabilizada.

3.6.3 Teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT)

O ipITT foi realizado no quinto dia do último ciclo de tratamento (terceiro ciclo). Foi realizado as 16 horas para trabalharmos com os animais mais próximo do horário ativo (acender das luzes) respeitando assim sua cronobiologia, além de evitar os efeitos agudos da DEX. Para este experimento os animais passaram por privação alimentar (jejum) de apenas 2 horas para mitigar a variabilidade glicêmica no minuto 0 (basal) do estudo. Para a avaliação da glicemia no tempo zero uma amostra de sangue caudal foi coletada a partir de um pequeno pique na ponta da cauda (< 0,5 mm) após anestesia com lidocaína. Para tal, a primeira gota de sangue foi descartada e a segunda aplicada sobre uma glicofita com auxílio do monitor digital Accu-Check Guide (ROCHE, Brasil). Em seguida, foi aplicada uma injeção intraperitoneal de insulina humana regular (Humulin® 0,75 IU/kg de massa corporal). Posteriormente novas amostras de sangue foram coletadas aos 0, 15, 30, 45 e 90 minutos. Após o término do experimento a área sob a curva (AUC) do experimento foi calculada considerando a variação da glicemia em relação ao valor basal de cada animal. Para isso, os valores de glicemia obtidos em cada tempo foram corrigidos pela glicemia de jejum individual (glicemia basal), para o cálculo da AUC incremental (da Silva *et al.* 2023, Rafacho *et al.*, 2010a, Rafacho *et al.*, 2014).

3.6.4 Teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT):

O ipGTT foi realizado um dia após o término do último ciclo de tratamento (terceiro ciclo), as 16 horas. A determinação da glicemia basal foi realizada como descrito para o ipITT, exceto pelo fato de que os animais foram submetidos por um jejum de 8 horas (iniciado as 08:00). Logo após a determinação da glicemia basal, foi administrada pela via ip uma solução de glicose a 50% (1,5 g/kg massa corporal, ip) seguida de uma nova coleta de sangue da ponta da cauda aos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. Com os dados obtidos foi calculado a área sob a curva glicêmica normalizada pelos valores de partida (AUC incremental). Este procedimento está em acordo com publicações prévias do grupo (da Silva *et al.* 2023, Rafacho *et al.*, 2010a, Rafacho *et al.*, 2014).

3.7 EUTANÁSIA E ANÁLISES *POST-MORTEM*

3.7.1 Eutanásia

Após a finalização do ipGTT, os animais foram anestesiados com isoflurano e mediante confirmação do aprofundamento anestésico com avaliação dos reflexos palpebral, pupilar e interdigital, com o animal em plano anestésico cirúrgico, realizou-se uma punção cardíaca para coleta de sangue. Em seguida, a eutanásia foi realizada por decapitação com guilhotina. As amostras de sangue foram transferidas em tubos contendo anticoagulante (EDTA), seguido de centrifugação a 2.500 rpm por 10 minutos (centrífuga de ângulo fixo modelo ML4000) em temperatura de 25°C. As alíquotas de plasma foram então armazenadas a -80°C para posterior quantificações bioquímicas.

3.7.2 Testes colorimétricos

As alíquotas de plasma foram utilizadas para quantificação das concentrações de colesterol total e triacilglicerol de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Kit comercial, Labtest).

3.7.3 Quantificação de corticosterona e insulina plasmática

Alíquotas do plasma armazenados também foram utilizadas para quantificação de corticosterona (Rat Corticosterone ELISA Kit 80554) e insulina plasmática (ELISA Milipore Rat/Mouse Insulin 4164375). A quantificação foi realizada por imunoenensaio enzimático de acordo com as instruções fornecidas do fabricante. Os resultados de corticosterona e insulina estão expressos em ng/mL.

3.7.4 Massa absoluta e relativa dos órgãos

Após a eutanásia dos animais, o tecido adiposo visceral (peri-gonadal, retroperitoneal e omental), fígado, pâncreas, adrenais e baço foram cuidadosamente coletados e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL, Campinas, SP, Brasil). Os resultados foram representados pela massa relativa de acordo com o peso do animal (g ou mg do órgão/100g massa corporal do animal).

3.7.5 Triglicerídeos hepáticos

Ao realizar a coleta do fígado, um fragmento de 100 mg (respeitado sempre o mesmo lóbulo no momento da coleta) foi transferido para um tubo contendo 0,7 mL de NaCL 1M e homogeneizado UltraTurrax® (IKA®; Staufen, Alemanha). Em seguida, foi adicionado 2 mL de solução metanol/clorofórmio (1:2 v/v). O tubo foi centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos, seguido da coleta da fase metanólica para outro tubo, que foi adicionado em banho maria para evaporação do solvente. O conteúdo restante foi ressuspenso com uma solução de Triton X100/metanol (2:1). A quantificação dos triglicerídeos hepáticos foi realizada por ensaio colorimétrico conforme a bula fornecida pelo fabricante (Kit comercial, Labtest). Os resultados estão representados por mg/g de tecido.

3.7.6 Glicogênio hepático

Além da amostra coletada para a quantificação dos triglicerídeos hepáticos, outra amostra do fígado (100 mg) foi coletada e transferida para um tubo de ensaio contendo KOH a 30% e fervida durante 1 hora para homogeneização. Em seguida, foi adicionado Na₂SO₄ e etanol para a precipitação do glicogênio. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, seguido do descarte do sobrenadante, e o precipitado contendo glicogênio foi dissolvido com água destilada quente. Por fim, o conteúdo de glicogênio foi adicionado ao reagente fenol e H₂SO₄, e quantificado em espectrofotômetro com absorvância a 490 nm. Os resultados estão representados por mg/g de tecido.

3.7.7 Morfologia hepática e massa de ilhotas pancreáticas

Fragmentos do fígado e da porção esplênica do pâncreas foram cuidadosamente coletados e destinadas a cassetes histológicos. Os tecidos foram fixados em formalina tamponada a 10%, pH 7,4 por 48 horas, desidratados com concentrações crescentes de etanol, diafanizados com xilol e impregnados em parafina. Secções de 3 µm (fígado) e 5 µm (pâncreas) foram obtidas com o auxílio de um micrótomo rotativo (Leica, IL, EUA) e adicionadas em lâminas de vidro. Após a montagem das lâminas, foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação morfológica. Para o pâncreas, porção esplênica do pâncreas foi cuidadosamente coletada, seguindo os passos de processamento das amostras

descritos anteriormente. As secções foram fotografadas em microscópio Olympus BX41 (Olympus, Japão) para análise quantitativa das ilhotas pancreáticas, que depois foram complementadas com as quantificações realizadas por imunofluorescência (Item 3.8.8). Já para o tecido hepático, após as secções foram fotografadas em microscópio Olympus BX41 (Olympus, Japão), verificou-se qualitativamente acúmulo de lipídeos e glicogênio hepáticos (Rafacho *et al.*, 2009).

3.7.8 Imunofluorescência

As amostras de pâncreas foram coletadas como descritas no item anterior e seccionadas em 5 µm em micrótomo rotativo Leica. Foram coletados dois cortes sequências, em seguida foi avançado 150 µm do tecido, seguido da coleta de mais dois cortes sequenciais. Com isso, conseguimos obter dois planos para melhor avaliação das ilhotas pancreáticas. Todos os cortes foram aderidos em lâminas sinalizadas. Em seguida, as lâminas passaram pelo processo de desparafinação, seguida de recuperação antigênica com tampão citrato. Em seguida, as amostras foram bloqueadas por 1 hora em PBST 0,2% contendo 3% de albumina, à temperatura de 25°C, dentro de uma câmara úmida. Após essa etapa, realizou-se lavagem em PBS. Os anticorpos primários para insulina e glucagon (Dako código A0564 e Santa Cruz código sc-7779R, respectivamente) foram incubados por 4 horas à temperatura de 25°C, diluídos em PBST com 3% de albumina (insulina 1:500 e glucagon 1:750). Em seguida, uma nova lavagem em PBS foi realizada antes da incubação com o anticorpo secundário por 1 hora, também em PBST com 3% de albumina, utilizando os fluoróforos Alexa Fluor 488 Anti-Guinea Pig (Jackson ImmunoResearch, código: 106-545-003) e Cy-3 Anti-Rabbit (Jackson ImmunoResearch, código: 11-165-003) diluídos em 1:250 e 1:500, respectivamente. Após mais uma lavagem em PBS, foi aplicado o DAPI (1:1000) em solução PBST com 3% de albumina por 5 minutos na câmara úmida. Por fim, realizou-se uma última lavagem em PBS, seguida da aplicação do meio de montagem '*antifading*' armazenamento das lâminas. As lâminas foram escaneadas manualmente utilizando filtros específicos de emissão de fluorescência, com a aquisição de imagens realizada separadamente para cada fluoróforo de interesse, a fim de garantir a distinção espectral e permitir a análise subsequente das marcações. Para quantificação da área total do pâncreas foi somado o valor total das áreas das secções imunomarcadas com o núcleo celular, em seguida foi feita a média das duas secções de cada animal. Para quantificação da massa de células β e α foi

feito a somatória das áreas imunomarcadas para insulina ou glucagon, dividido pela área total do pâncreas e multiplicado por 100 (massa relativa de células β). A partir desses resultados, foi multiplicado a massa relativa de células β (%) pela massa total do pâncreas em miligramas (Natividade da Silva et al., 2019).

3.7.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism versão 10.0.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos). Para avaliar a simetria dos dados foram utilizados os testes de normalidade Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e D'Agostino e Pearson. Os dados foram considerados simétricos quando aprovados em ao menos dois testes. Para verificar se as variâncias são homogêneas, foram utilizados os testes de Brown-Forsythe e teste de Bartlett. Os dados foram considerados paramétricos quando apresentaram distribuição normal e variância homogênea, e não paramétricos quando não apresentaram distribuição normal e/ou caracterizados como heterocedásticos. Em dados paramétricos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) de uma via seguido de pós teste de Tukey, enquanto para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. O nível de significância adotado foi de 95% ($p < 0,05$). A apresentação dos dados paramétricos foi estipulada como média \pm desvio padrão, enquanto resultados não paramétricos foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IIQ).

4 RESULTADOS

4.1 ACOMPANHAMENTO MURINOMÉTRICO DURANTE OS CICLOS DE 30 DIAS

A partir do segundo dia de tratamento, os grupos tratados com DEX (30+90 e 30+60+90) tiveram o ganho de peso interrompido em relação aos grupos não tratados (CTL, 90 e 60+90), efeito que se estendeu durante todo o tratamento (Figura 4A). Ao final do tratamento, os grupos tratados com DEX não acumularam ganho de massa corpórea (Figura 4B, $p < 0,0001$), enquanto os grupos que receberam salina apresentaram ganho de massa corpórea, conforme esperado para o estágio de desenvolvimento dos animais. Quanto a ingesta alimentar, o consumo alimentar relativo dos animais tratados com DEX não diferiu dos animais tratados com salina durante o tratamento (Figura 4C). Contudo, o consumo alimentar total durante o tratamento com DEX (grupos 30+90 e 30+60+90) foi menor comparado aos demais grupos tratados com salina (Figura 4D, $p < 0,0001$).

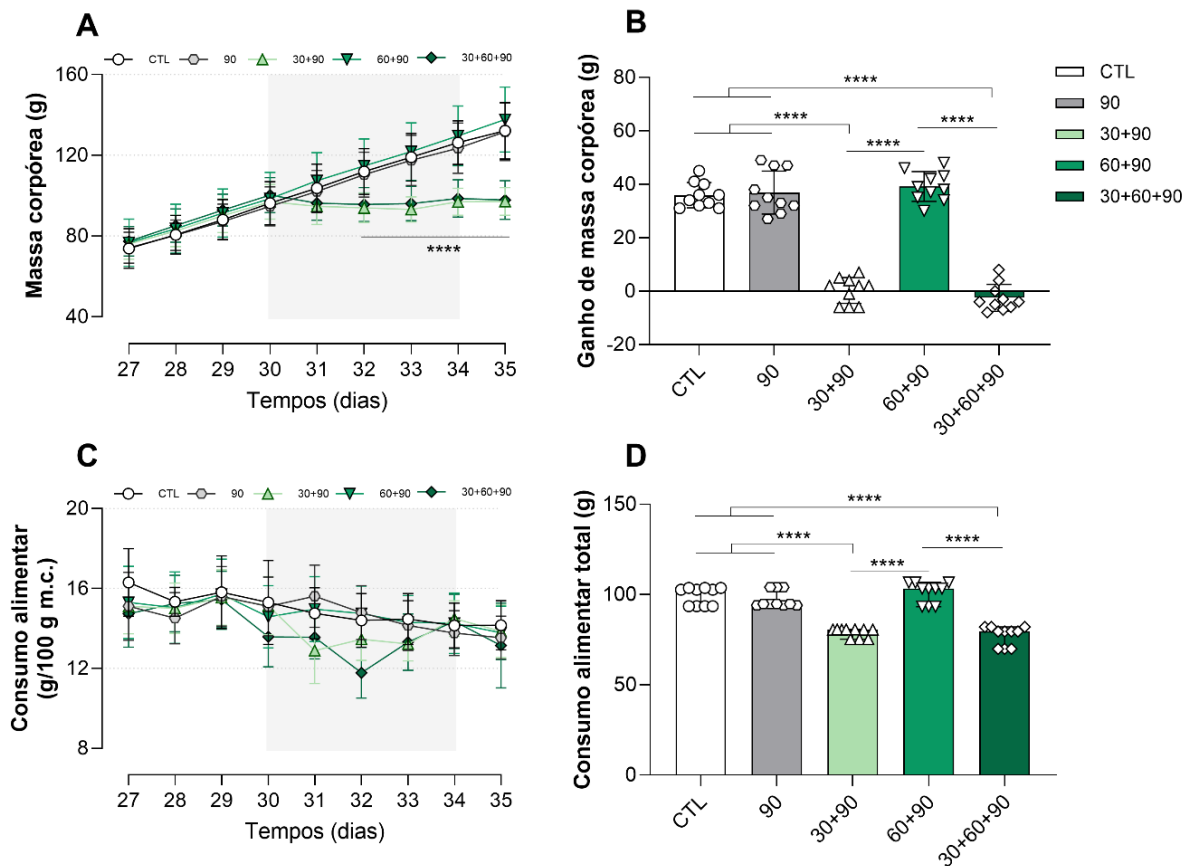


Figura 4: Avaliação murinométrica durante o primeiro ciclo de tratamento com DEX ou salina aos 30 dias de idade. Evolução da massa corpórea durante o tratamento (A); ganho total de massa corpórea (B); consumo alimentar relativo à massa corporal (C); consumo alimentar total (D). Análise

por ANOVA de uma via com medidas repetidas (A, C) e Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (B, D). Os dados estão expressos como média \pm DP (A, C) e mediana \pm IIQ (B, D). **** $p < 0,0001$.

4.2 ACOMPANHAMENTO MURINOMÉTRICO NO CICLO DE TRATAMENTO AOS 60 DIAS

A análise do ganho de massa corpórea aos 60 dias de vida indicou um efeito persistente do tratamento com DEX sobre o crescimento ponderal dos animais (Figura 5, $p = 0,0005$).

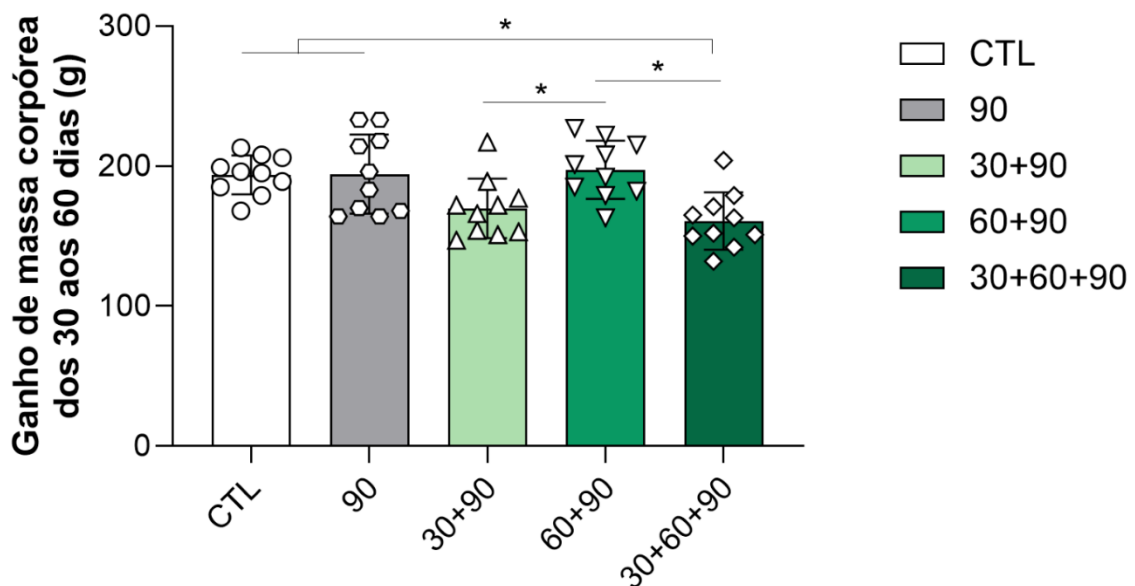


Figura 5: Ganho de massa corpórea total durante o intervalo entre 30 e 60 dias de idade. Análise realizada por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. Os dados estão expressos como média \pm DP. * $p < 0,05$

Aos 60 dias de vida, os grupos que passaram pelo tratamento com DEX no ciclo de 30 dias apresentaram menor peso corpóreo quando comparados aos grupos tratados com salina (Figura 6A). A partir do 3º dia de tratamento, os grupos tratados com DEX, 60+90 e 30+60+90, apresentaram redução da massa corpórea comparados aos demais grupos, incluindo o grupo 30+90, que recebeu tratamento com DEX aos 30 dias e tratado com salina nesse ciclo. Os grupos tratados com DEX mantiveram a redução de peso corpóreo até o fim do segundo ciclo de tratamento, dado corroborado pela perda de massa corpórea total (Figura 6B, $p < 0,0001$). O consumo alimentar foi similar antes do início do tratamento e reduziu a partir do 3º dia de tratamento com DEX nos grupos 60+90 e 30+60+90 em relação aos grupos que receberam salina neste ciclo (Figura 6C), dado corroborado pelo consumo alimentar total (Figura 6D, $p < 0,0001$).

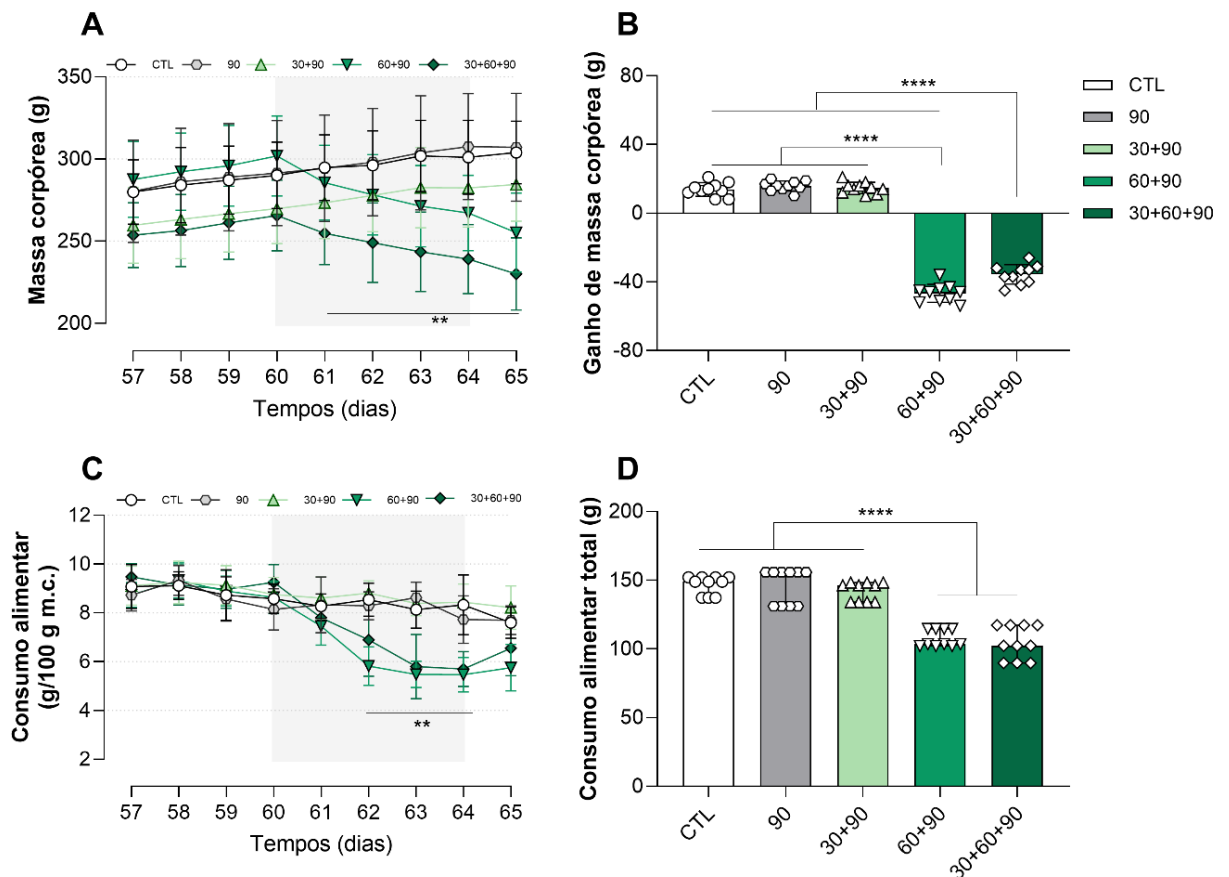


Figura 6: Avaliação murinométrica durante o segundo ciclo de tratamento com DEX ou salina aos 60 dias de idade. Evolução da massa corpórea durante o tratamento (A); ganho total de massa corpórea (B); consumo alimentar relativo à massa corporal (C); consumo alimentar total (D). Análise por ANOVA de uma via com medidas repetidas (A, C), ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey (B) e Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (D). Os dados estão expressos como média \pm DP (A, B, C) e mediana \pm IIQ (D). ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

4.3 IMPACTO DO HISTÓRICO DE EXPOSIÇÕES PRÉVIAS COM DEX AO REALIZAR O TRATAMENTO AOS 90 DIAS

4.3.1 Resposta murinométrica no ciclo de tratamento aos 90 dias

Apenas o grupo 30+60+90 apresentou menor peso corpóreo no estágio equivalente a vida adulta como pode ser depreendido pelo dado de variação corporal entre os dias 30 e 90 (Figura 7, $p < 0,0001$). Os demais grupos experimentais apresentaram ganho de massa corporal similar ao controle.

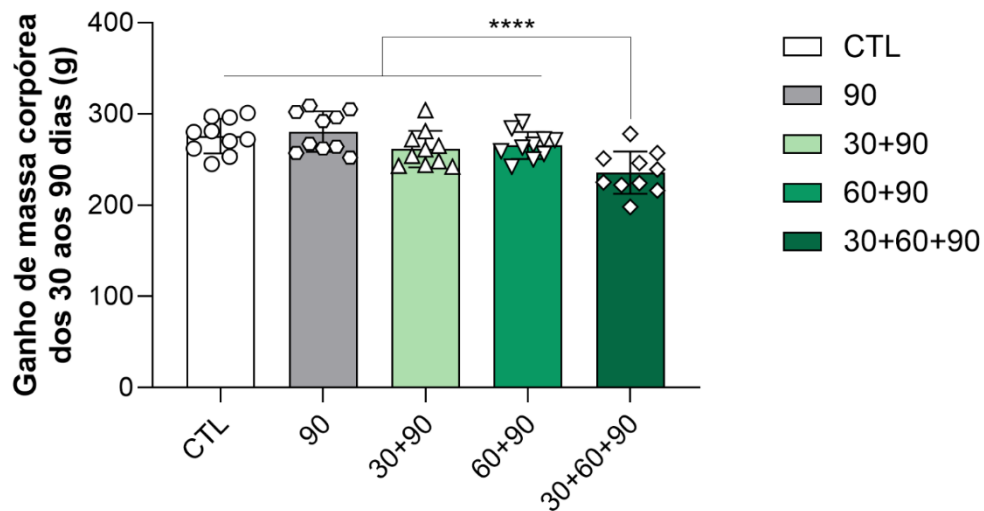


Figura 7: Avaliação do desenvolvimento murinométrico pela análise de ganho de massa corpórea total durante o intervalo de 30 a 90 dias de idade. Análise realizada por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. Os dados estão expressos como média \pm DP. **** $p < 0,05$

Aos 87 dias de vida, antes do início do último ciclo de tratamento, o grupo 30+60+90 apresentou massa corpórea menor comparado aos grupos CTL, 90 e 60+90, e apenas uma tendência comparada ao grupo 30+90 (Figura 8A, $p=0,08$). Este peso menor em relação aos demais grupos persistiu nos dias que antecederam ao início do tratamento. Nos primeiros dias de tratamento, os grupos 30+90 e 30+60+90 apresentaram massa corpórea menor comparado ao grupo controle. A partir do 3º dia de tratamento, todos os grupos tratados com DEX apresentaram massa corpórea menor que o grupo controle, que se estendeu até o final do tratamento.

Os grupos tiveram com consumo alimentar similar antes do início do tratamento (Figura 8C). A partir da 3ª aplicação de DEX, todos os grupos tratados com DEX apresentaram consumo alimentar menor quando comparado ao grupo controle, efeito que persistiu até o fim do tratamento. Não foram encontradas diferenças no consumo alimentar entre os demais grupos durante o tratamento. O consumo alimentar total dos grupos tratados foi menor comparado ao grupo controle, e o grupo 30+60+90 apresentou menor consumo alimentar total comparado ao grupo 90 (Figura 8D, $p < 0,0001$).

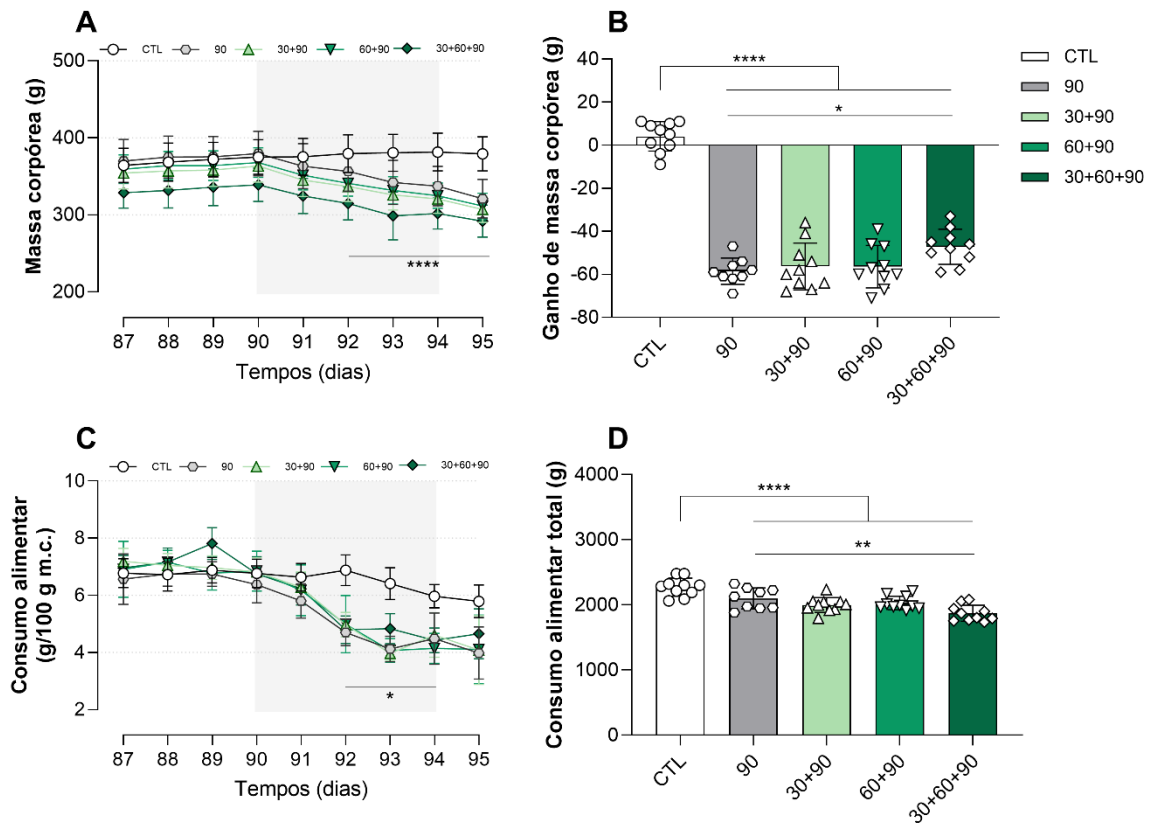


Figura 8: Avaliação murinométrica durante o terceiro ciclo de tratamento com DEX ou salina aos 90 dias de idade. Evolução da massa corpórea durante o tratamento (A); ganho total de massa corpórea (B); consumo alimentar relativo à massa corporal (C); consumo alimentar total (D). Análise por ANOVA de uma via com medidas repetidas (A, C) e ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey (B, D). Os dados estão expressos como média \pm DP (A-D). **** $p < 0,0001$.

4.3.2 Resposta à insulina aos 90 dias

Os grupos 90, 30+90 e 60+90 apresentaram valores elevados de glicemia basal comparados ao grupo controle (Figura 9A). Após a sobrecarga de insulina, todos os grupos tratados com DEX, incluindo o grupo 30+60+90, mantiveram valores glicose sanguínea maiores na fase de decaimento quando comparados ao grupo controle. A área-abaxio-da-curva (AUC) da glicose sanguínea apontou intolerância à insulina apenas nos grupos que passaram por um (90) ou dois ciclos de tratamento com DEX (30+90 e 60+90) (Figura 9B, $p = 0,0001$).

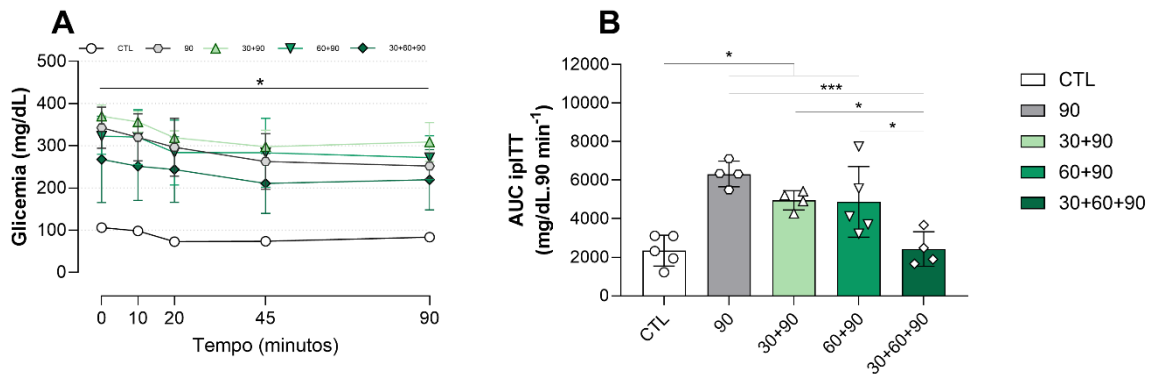


Figura 9: Resposta à insulina em ratos com exposição repetida à DEX. Glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal à insulina (ipITT, A); área sob a curva (AUC) calculada a partir dos valores corrigidos em relação à glicemia basal durante o ipITT (B). Análise por ANOVA de uma via com medidas repetidas (A) e ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey (B). Os dados estão expressos como média \pm DP (A, B). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.3.3 Tolerância à glicose aos 90 dias

Os valores de glicemia basal foram similares entre todos os grupos experimentais (Figura 10A). Contudo, nos minutos 15 e 30, os grupos 30+90 e 60+90 apresentaram glicemia maior em resposta à sobrecarga de glicose comparado aos demais grupos. Aos 60 minutos, o grupo 60+90 persistiu com valores glicêmicos maior comparado ao grupo controle, o que foi observado também no grupo 90. Aos 120 minutos, os valores de glicose sanguínea se equipararam entre todos os grupos. Pela análise da AUC obtida no ipGTT, encontramos efeito em todos os grupos que receberam o tratamento com o corticoide neste terceiro ciclo (Figura 10B, $p < 0,0001$). A análise da razão de variação da AUC em relação ao grupo controle indicou menor incremento glicêmico nos grupos 30+90 e 30+60+90 em relação aos demais grupos expostos a DEX (Figura 10C, $p < 0,0001$).

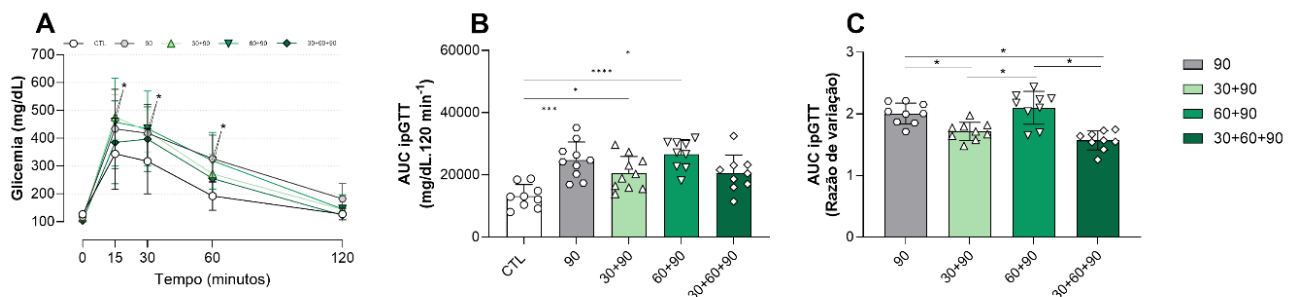


Figura 10: Avaliação da tolerância à glicose em ratos com exposição repetida de dexametasona. Glicemia durante o teste de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT, A); área sob a curva (AUC) corrigida pela glicemia basal (B); razão de variação da AUC dos grupos experimentais em relação ao grupo controle (C). Análise por ANOVA de uma via com medidas repetidas (A) e ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey (B, C). Os dados estão expressos como média \pm DP (A-C). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.4 AVALIAÇÕES POST-MORTEM

Após a eutanásia e coleta dos órgãos, encontramos menores valores para as massas adrenal e esplênica em todos os grupos tratados com DEX comparados ao grupo controle (Figura 11A e B, respectivamente, $p < 0,0001$). Exceto pelo grupo 30+60+90, todos os grupos tratados com a DEX apresentaram maior massa hepática em relação ao grupo controle (Figura 11D, $p = 0,0002$). As massas de pâncreas (Figura 11C), tecido adiposo retroperitoneal, perigonadal e omental (Figura 12A-C) mantiveram-se inalteradas nos grupos tratados com o corticoide.

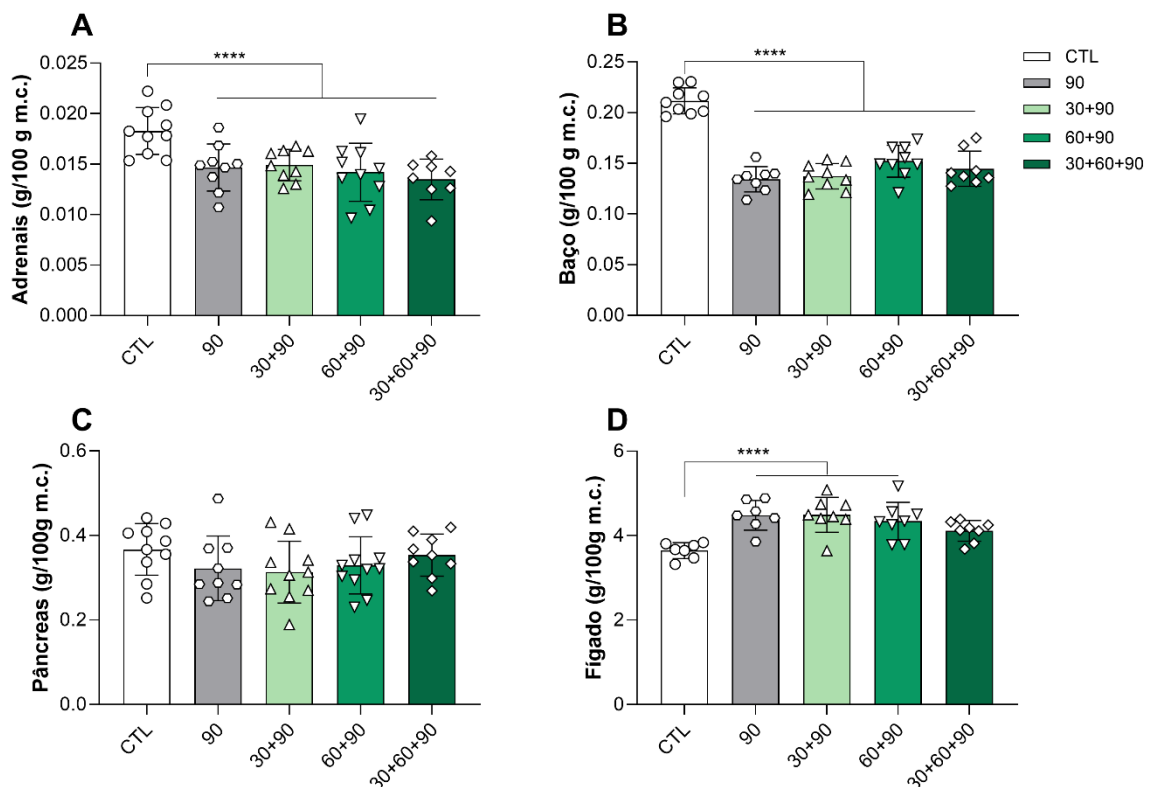


Figura 11: Massa de órgãos periféricos ao término do último ciclo de tratamento com DEX. Massa das glândulas adrenais (A); baço (B); pâncreas (C); fígado (D) corrigida pelo peso dos animais. Análise por ANOVA de uma via seguido de pós teste de Tukey (A-D). Os dados estão expressos como média \pm DP (A-D). **** $p < 0,0001$.

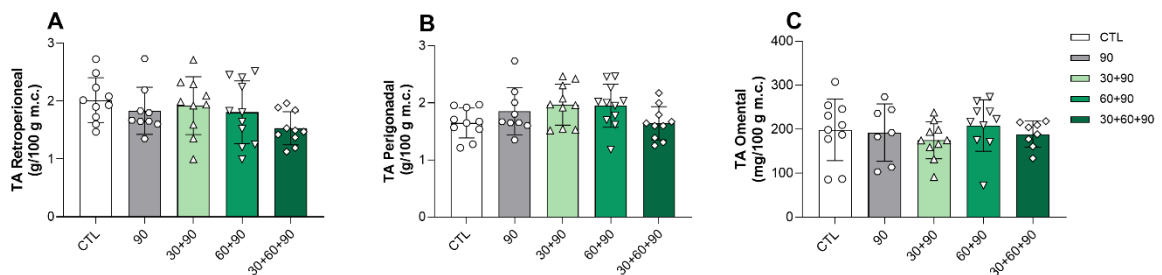


Figura 12: Massa do tecido adiposo visceral ao término do último ciclo de tratamento com DEX. Massa do tecido adiposo retroperitoneal (A); perigonadal (B) e omental (C) corrigidas pelo peso dos

animais. Análise estatística por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey (A-C). Os dados estão expressos como média \pm DP (A-C).

Ao analisar o perfil bioquímico dos animais, identificamos que o tratamento com DEX, independentemente do número de ciclos a que foi exposto, resultou em aumento das concentrações de triglicerídeos plasmáticos em todos os grupos em relação ao controle (Figura 13A, $p = 0,0009$). O colesterol plasmático total foi similar em todos os grupos (Figura 13B). Em relação ao perfil hormonal, apenas o grupo 90 apresentou valores menores de corticosterona plasmática em relação ao grupo controle (Figura 13C), enquanto o grupo 30+60+90 alcançou uma tendência ao aumento de valores de corticosteronemia em relação ao grupo 90 (Figura 13C, $p = 0,0540$) e similares ao grupo controle. Exceto pelo grupo 30+60+90, os demais grupos tratados com DEX apresentaram hiperinsulinemia em relação ao grupo controle (Figura 13D).

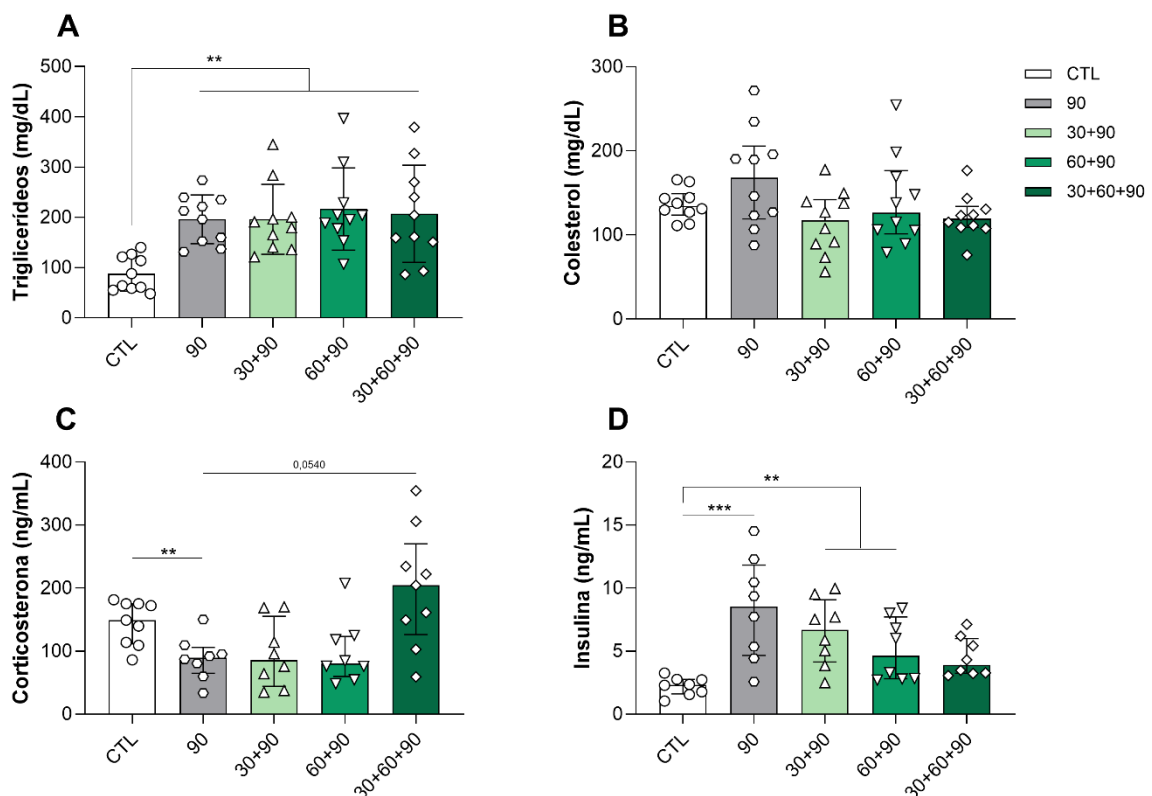


Figura 13: Avaliação de parâmetros bioquímicos plasmáticos ao término do último ciclo de tratamento com DEX. Triglicerídeos plasmáticos (A), colesterol total (B), corticosterona (C), insulina (D). Análise estatística por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey (A). Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (B, C, D), Teste T de Student não pareado (C, CTL vs 90) e Teste de Mann-Whitney (D, CTL vs 60+90). Os dados estão expressos como média \pm DP (A) e mediana \pm IIQ (B, C, D). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

O tratamento com DEX também influenciou a morfologia e parâmetros bioquímicos hepáticos. A análise qualitativa da morfologia hepática revelou que os

grupos submetidos a até dois ciclos de DEX acumularam lipídeo e glicogênio neste órgão, enquanto a exposição ao corticoide por três ciclos resultou em um fenótipo mais brando, com aspecto equivalente ao grupo controle (Figura 14A).

A quantificação bioquímica dos triglicerídeos hepáticos indicou aumento do conteúdo deste lipídeo nos grupos que receberam até dois ciclos de tratamento com DEX em relação ao grupo controle e ao grupo 30+60+90 (Figura 14B, $p = 0,0001$). Padrão equivalente de resultados foi observado para a quantificação de glicogênio hepático (Figura 14C, $p < 0,0001$).

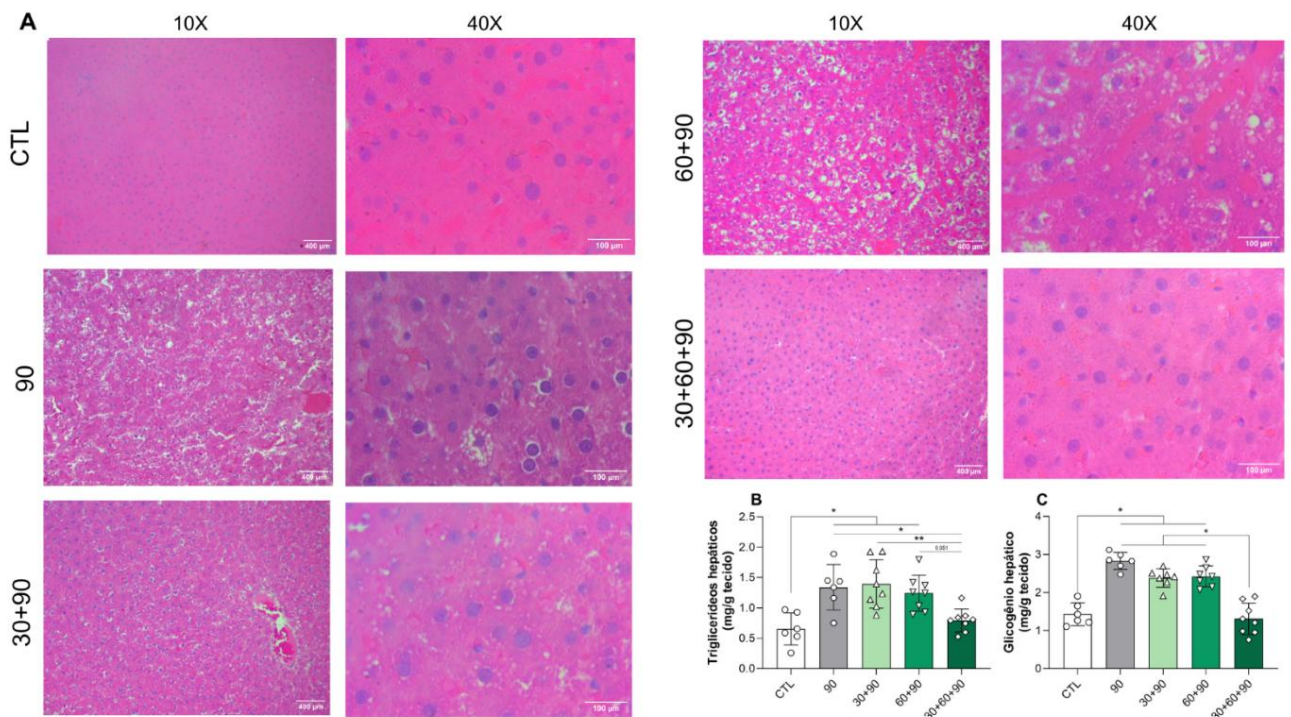


Figura 14: Avaliação histológica e bioquímica do fígado ao término do último ciclo de tratamento com DEX. Imagens representativas de seções hepáticas coradas com hematoxilina e eosina, com ampliação final de 100x e 400x, barra de escala: 100 μ m (A); conteúdo de triglicerídeos hepáticos (B) conteúdo de glicogênio hepático (C). Análise estatística por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey (B) e teste de Brown-Forsythe and Welch ANOVA seguido de pós teste de Dunn (C). Os dados estão expressos como média \pm DP (B) e Os dados estão expressos como mediana \pm IIQ (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Também foram avaliadas a morfologia e a fração endócrina do pâncreas (Figura 15). A análise histológica revela ilhotas hipertrofiadas nos grupos tratados com DEX, com algumas perdendo o formato circular/ovoide típico, especialmente nos grupos 90 e 60+90 (Figura 15A). A quantificação da fração endócrina (obtida pelas somatórias das massas de células $\alpha + \beta$) confirmou aumento significativo da massa de ilhotas nos grupos 90, 60+90 e 30+60+90 em comparação ao grupo controle (Figura 15B; $p = 0,0019$).

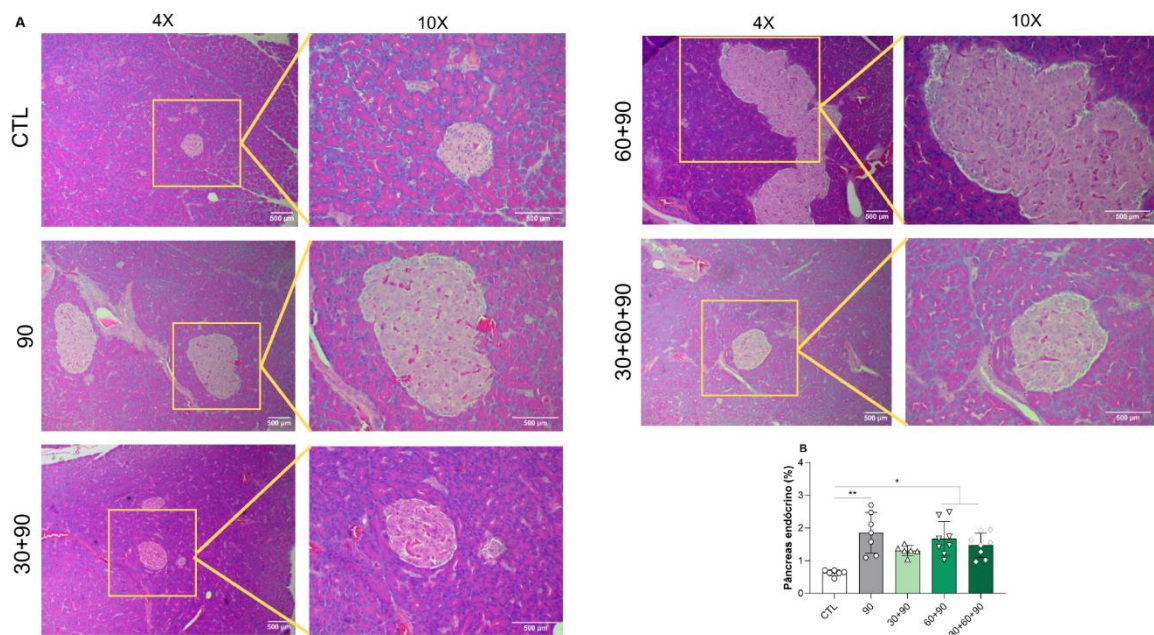


Figura 15: Avaliação histológica do pâncreas total ao término do último ciclo de tratamento com DEX. Imagens representativas de secções pancreáticas coradas com hematoxilina e eosina, com ampliações de 40x (primeira coluna) e 100x (segunda coluna), barra de escala: 500 µm (A). Fração de pâncreas endócrino (B). Análise estatística por Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn (B). Os dados estão expressos como mediana ± IIQ (B). *p < 0,05; **p < 0,01.

Imagens representativas de pâncreas imunomarcados para insulina e glucagon (Figura 16). O tratamento com DEX na vida adulta (grupo 90), e o tratamento nos ciclos de 60 e 90 dias (grupo 60+90) resultaram em maiores valores de massa de células β , indicado nas imagens pelo aumento da área imunomarcadas para insulina (verde) (Figura 16B, $p = 0,0140$). Nos grupos 30+90 e 30+60+90, a massa de células β permaneceu inalterada. A massa de células α não foi afetada pelo tratamento com DEX em nenhum grupo avaliado (Figura 16C). Entretanto, todos os grupos tratados com DEX apresentaram valores maiores de razão β/α (Figura 16D; $p < 0,0001$).

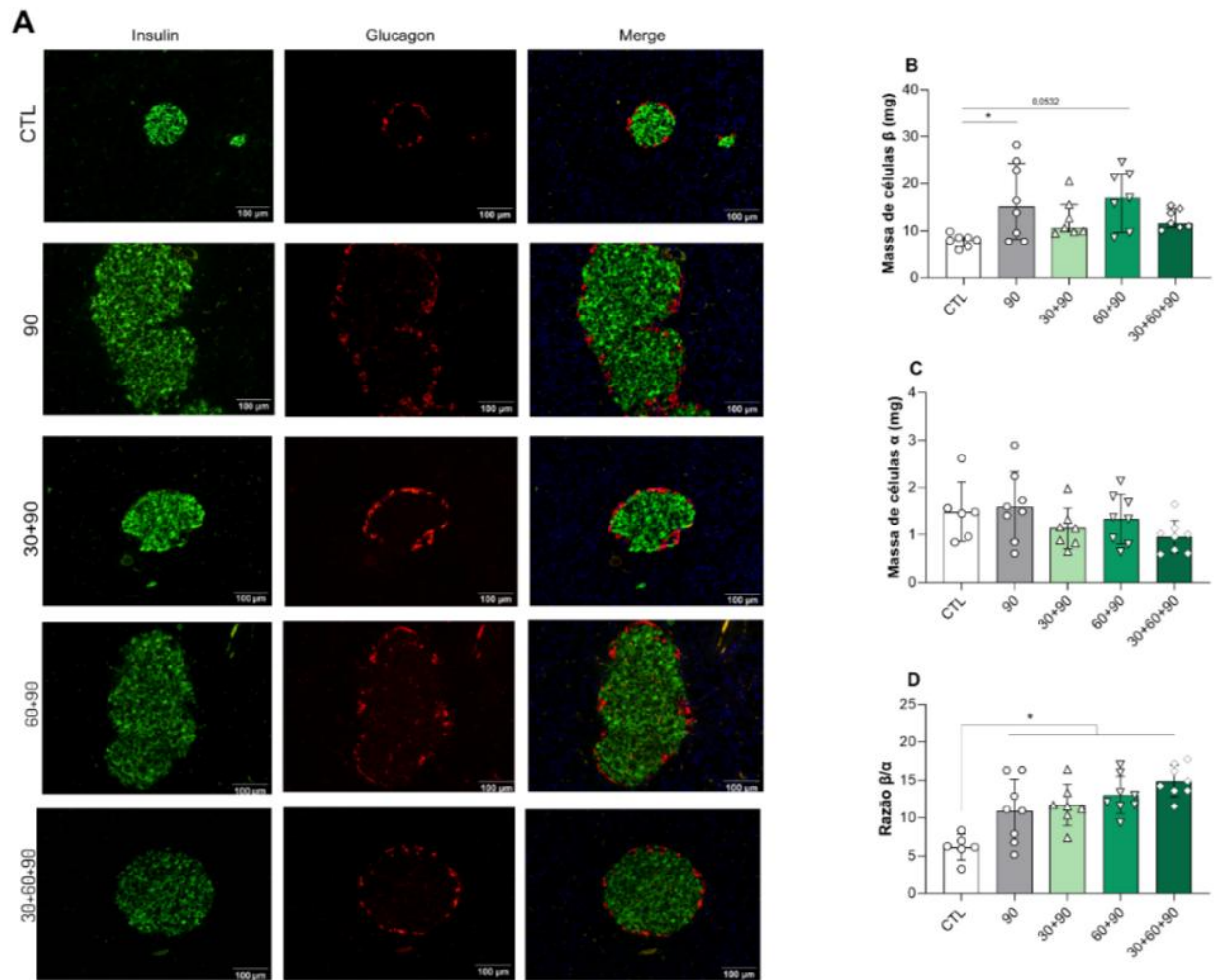


Figura 16: Avaliação da distribuição de células α e β pancreáticas ao término do último ciclo de tratamento com DEX. Imagens representativas de secções pancreáticas com imunomarcção para insulina (verde, primeira coluna) e glucagon (vermelho, segunda coluna), com sobreposição das imagens na terceira coluna e ampliação de 200X barra de escala: 100 μ m (A), massa de células β pancreáticas (B), células α (C) e razão β/α (D). Análise estatística por Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn (B, D) e ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey (C). Os dados estão expressos como média \pm DP (C) e mediana \pm IIQ (B, D). * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Os GCs possuem relevância indiscutível na prática clínica para o tratamento de diversas doenças autoimunes, infecções e processos inflamatórios. São altamente eficazes e, dentro da classe terapêutica, a DEX se destaca pela potência elevada em comparação as demais GCs clinicamente disponíveis. Contudo, como qualquer medicamento há efeitos adversos e estes incluem os efeitos diabetogênicos. Neste estudo, demonstramos que a administração de DEX em períodos críticos do desenvolvimento, como infância e adolescência, impacta negativamente o crescimento corporal, de forma proporcional à precocidade e à frequência dos tratamentos ao longo da vida. Observamos que todos os regimes, independentemente do histórico prévio, levaram a efeitos agudos na fase adulta, como redução de peso, menor ingestão alimentar, supressão adrenal e esplênica, hipertrigliceridemia e intolerância à glicose. Os grupos com até dois ciclos de exposição (90, 30+90 e 60+90) apresentaram recuperação do crescimento e desenvolveram um perfil metabólico caracterizado por hiperinsulinemia, menor sensibilidade à insulina, acúmulo hepático de glicogênio e lipídeos, e expansão da massa de ilhotas e de células β — exceto no grupo 30+90, que não apresentou este último achado. Por outro lado, o regime com exposições sucessivas e contínuas (30+60+90) resultou em comprometimento persistente até os 95 dias no crescimento corporal e sem desenvolvimento dos desfechos metabólicos típicos dos demais grupos. Especificamente, este grupo não apresentou alterações nos níveis plasmáticos de insulina, na massa de células β nem acúmulo de glicogênio ou triglicerídeos hepáticos.

Já é sabido que o tratamento de curta duração com DEX (5 dias), na dose de 1,0 mg/kg, reduz tanto a ingestão alimentar quanto a massa corporal em ratos machos adultos (com 90 dias) e idosos (com 120 dias) (Rafacho, 2008; dos Santos, 2014). Nosso estudo revelou que esta resposta é distinta quando o tratamento é realizado em fases iniciais da vida, onde observamos que não há alteração na massa corpórea dos animais, diferente da clássica perda absoluta de massa corporal. O tratamento no primeiro ciclo, aos 30 dias de vida, foi conduzido uma semana após o desmame dos animais, correspondente ao período pré-puberal (Sengupta, 2013), o qual é caracterizado por níveis elevados de secreção do hormônio do crescimento (GH). Considerando que os GCs atenuam a secreção de GH, é plausível que o tratamento com DEX tenha interferido nesse eixo, suprimindo temporariamente o crescimento

corporal por meio da redução da biodisponibilidade de GH. De fato, a redução das concentrações de GH circulante foi apontado como um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos deletérios dos GCs sobre o crescimento corporal na primeira infância (Wehrenberg et al. 1990). Neste estudo os autores demonstraram que a administração de DEX (40 µg/kg) em ratos de 21 dias de vida, por 28 dias contínuos, resultou em menor ganho de peso. Este efeito foi parcialmente revertido pela administração de um inibidor farmacológico de somatostatina, haja vista que associaram menor secreção de GH com aumento do tônus inibitório da somatostatina (que estava elevada no modelo animal). A interrupção no crescimento observada no primeiro ciclo de tratamento com DEX não esteve associada a redução da ingestão alimentar dos animais. De forma similar, ratos tratados com 40 µg/kg de DEX por três 21 dias contínuos também apresentaram menor ganho de peso corporal que pôde ser parcialmente revertido por meio da administração concomitante de um análogo de grelina, hormônio orexígeno e que também atua como estimulador da liberação de GH (Tulipano, 2007).

O comprometimento do ganho de massa corpórea nos animais tratados com DEX no primeiro ciclo também pode estar associado aos efeitos diretos dos GCs sobre o crescimento ósseo. Evidências provenientes de observações clínicas (Hua, 2023) e pré-clínicas (Jia *et al.*, 2006; Malkawi, 2018; Baek, 2024) indicam que os GCs são capazes de limitar o crescimento ósseo e atuam diretamente sobre os osteoclastos, prolongando sua vida útil, o que contribui para a redução da densidade óssea e favorece o desenvolvimento de osteoporose secundária. Além disso, ao suprimirem o eixo GH/ fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), os GCs atenuam o crescimento ósseo longitudinal pós-natal, uma vez que o eixo regula a proliferação, diferenciação e hipertrofia dos condrócitos na placa de crescimento (Wong *et al.*, 2016; Wood *et al.*, 2018). Mesmo a administração exógena de GH e IGF-1 não é capaz de reverter completamente os efeitos deletérios dos GCs sobre o osso cortical (Jia *et al.*, 2006), evidenciando a potência dessa inibição. Dados experimentais mostram que o tratamento com DEX por apenas sete dias em camundongos pré-púberes é capaz de reduzir a expressão gênica de IGF-1 nos condrócitos em todas as fases da placa de crescimento (Smink *et al.*, 2003).

Os efeitos negativos da DEX sobre o crescimento também incluem ações catabólicas dos GCs, que inclui a indução de proteólise e a lipólise de forma tecido-específica (Hochberg, 2015). De fato, as consequências deste atraso no crescimento

são duradouras e perceptíveis ainda aos 60 dias de idade, uma vez que os animais tratados aos 30 dias de vida apresentam massa corporal inferior aos controles e menor ganho de peso no intervalo entre os 30 e 60 dias. Posteriormente, aqueles animais que não foram submetidos ao tratamento com DEX no segundo ciclo (grupo 30+90) demonstraram recuperação ponderal na fase adulta, equivalente ao do grupo 60+90 que recebeu o tratamento em um período mais tardio de desenvolvimento, equivalente ao período pós-puberal em transição para início da vida adulta em humanos. Vale destacar que o grupo exposto aos dois ciclos consecutivos ao tratamento com DEX não conseguiu recuperar sua massa corpórea ao atingir idade de 90 dias.

Nos animais que passaram pelo tratamento com DEX a partir do segundo ciclo ocorreu redução do peso corpóreo associado a hipofagia, evento corroborado por estudos prévios (Jahng *et al.*, 2008; Nunes *et al.*, 2013). Os mecanismos envolvidos na hipofagia em animais tratados com DEX envolve os sinais anorexígenos da insulina (Rafacho *et al.*, 2011). Adicionalmente, a exposição ao excesso de GCs também resulta em aumento da leptina, que assim como a insulina, tem uma ação orexígena robusta sobre o núcleo arqueado hipotalâmico. Tais achados foram confirmados tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Jahng *et al.*, 2008; Tomabechi *et al.*, 2018). Vale destacar que ratos submetidos ao tratamento subcrônico com 15 mg/kg de hidrocortisona resultou em redução da expressão de mRNA de neuropeptídeos hipotalâmicos anorexígenos - *Npy* e *Agrp* (Liu *et al.*, 2011).

É importante destacar que não foram observadas diferenças significativas na massa adiposa visceral entre os grupos experimentais. Com isso, tal achado sugere uma ação catabólica seletiva da DEX, refletida predominantemente na perda de massa muscular e óssea. A perda de tecido muscular e ósseo é demonstrada em contextos de uso crônico de GCs, especialmente com compostos de menor potência, como a prednisolona. Por exemplo, o tratamento com prednisolona (2,1 mg/kg, s.c.) ou metilprednisolona (10 mg/kg, s.c.) por quatro semanas em diferentes linhagens de camundongos resultou em redução da massa magra, associada à atrofia muscular e óssea, bem como à diminuição da densidade mineral óssea. Esses efeitos foram atribuídos à ativação de vias moleculares envolvidas na transcrição de genes relacionados à degradação muscular e óssea (Sato *et al.*, 2017; Adhikary *et al.*, 2019). Ainda que de forma aguda, o tratamento com DEX por apenas cinco dias, nas doses de 600 e 1.200 µg/kg, também promoveu perda de massa muscular, por meio da inibição da expressão de miostatina — um efeito que pôde ser revertido pela

coadministração do RU-486, um antagonista dos receptores de GCs (Ma *et al.*, 2003). Adicionalmente, é plausível que o balanço hídrico negativo induzido pelo tratamento com a DEX contribua para a redução da massa corporal. Estudos demonstram que a administração de DEX resulta em pronunciada diurese, acompanhada do aumento da excreção de sódio, porém sem o aumento na ingestão de água, resultando em depleção de volume extracelular e perda de peso corporal (Thunhorst *et al.*, 2007). Esse efeito é potencializado pela ação da DEX na inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona, promovendo excreção de sódio e água (Liu *et al.*, 2016). Considerando que o grupo exposto aos 3 ciclos (grupo 30+60+90) não recuperou sua massa corpórea, é possível afirmar que a exposição precoce seguida de eventos futuros pode repercutir permanentemente no crescimento corpóreo.

A confirmação de hipotrofia adrenal e esplâncnica confirmaram a efetividade do protocolo, uma vez que o excesso de GCs suprime HPA e promove potente ação imunossupressora. Contudo, a análise da corticosteronemia revelou supressão do eixo apenas no grupo tratado aos 90 dias. A exposição aos três ciclos de tratamento com a DEX resultou em valores de corticosterona comparáveis aos do grupo controle e superiores aos do grupo 90. Tal resultado sugere o desenvolvimento de uma aparente resistência aos GCs na medida em que foram sendo reexpostos. Acreditamos que tal achado é particularmente relevante, pois aponta para um possível processo adaptativo à exposição intermitente e prolongada à DEX neste grupo. Vale observar que o grupo 30+90, embora tenha sido exposto ao primeiro ciclo durante sua vida precoce, parece ter sido suficiente para escapar desse desfecho.

Diversos mecanismos têm sido associados ao desenvolvimento de resistência aos GCs. A resistência pode estar relacionada à estabilidade do GR, à expressão do gene do receptor e a mecanismos pós-transducionais alterando a via de sinalização. (Yang; Ray; Matthews, 2012; Donner *et al.*, 2013). Alterações na expressão e/ou mutações associadas a isoforma GR- β são apontadas como candidatas moleculares para à resistência aos GCs tanto em humanos quanto em camundongos (mGR β) (Longui *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2000; Hinds *et al.*, 2010). A mutação e consequente perda de função da isoforma GR- β , assim como a superexpressão desta subunidade contribuem para uma hiper- e hiporresponsividade aos GCs, respectivamente (Hinds *et al.*, 2010; Sepúlveda-Quiñenao *et al.*, 2022). Dessa forma, especulamos que os animais submetidos aos três ciclos possam ter adquirido algum tipo de resistência aos

GCs que explique menor magnitude das respostas metabólicas adversas, ou até mesma a inexistência de alguma delas ao serem tratados no terceiro ciclo.

Nossos dados corroboram as evidências existentes, que descrevem os efeitos diabetogênicos da DEX quando administrada nessa fase da vida adulta. Durante o ipGTT, observamos que o tratamento com DEX foi capaz de provocar intolerância à glicose em todos os grupos, a despeito da quantidade de reexposições. Entretanto, uma análise mais cuidadosa, baseada na razão de variação da AUC em relação ao grupo controle, revelou que os grupos expostos ao primeiro ciclo (grupos 30+90 e 30+60+90) tiveram menores incrementos. Isto nos sugere que a exposição pode guardar alguma influência sobre esta resposta futura. Esses achados são consistentes com a hipótese de algum grau, exposição-dependente, de resistência aos GCs, que explicariam consequências metabólicas menos pronunciadas. Em conformidade, estudo realizado em zebrafish por Chatzopoulou e colaboradores (2015) demonstrou que a isoforma GR β atua como inibidor funcional do GR α , reduzindo os efeitos metabólicos típicos da ativação dos GCs. A superexpressão de GR β resultou em menor aumento nas concentrações de metabólitos, como glicose, lactato, colesterol e ácidos graxos livres, após incubação com 100 μ M de DEX por 24 horas.

A intolerância à glicose induzida pelo tratamento com GCs resulta de uma combinação clássica de vários fatores. O aumento da glicose sanguínea induzida pelo tratamento com DEX decorre do aumento da gliconeogênese hepática (Vegiopoulos; Herzig, 2007; Nunes *et al.*, 2013), hiperglucagonemia (Rafacho *et al.*, 2014) e menor capacidade secretória de insulina in vivo (Angelini *et al.*, 2010; Nunes *et al.*, 2013; Rafacho *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2014). Os dados glicêmicos obtidos no ipITT complementam as evidências dos efeitos diabetogênicos da DEX. Tais efeitos já foram demonstrados em modelos pré-clínicos. No músculo esquelético, o tratamento com DEX está associado à redução da captação de glicose, à síntese de glicogênio e à diminuição da fosforilação nos resíduos de serina 473 e treonina 308, ambos estimulados pela insulina, além da redução de IRS-1 e PI3K (Weinstein *et al.*, 1998; Ruzzin; Wagman; Jensen, 2005; Burén *et al.*, 2008). No tecido adiposo, reduz a fosforilação de fatores como IRS-1, PI3K e PKB, e diminuindo a captação de glicose (Burén *et al.*, 2008; Motta *et al.*, 2015).

Contudo, destaca-se que o grupo exposto aos três ciclos de tratamento com DEX exibiram valores glicêmicos intermediários, entre o grupo controle e os demais grupos corroborando para nossa hipótese de uma resistência parcial aos GCs.

Achados recentes com células HepG2 demonstraram que uma expressão maior da isoforma GR β promoveria um efeito positivo sobre a sinalização insulínica, com aumento da fosforilação de Akt e P70S6K independentemente do estímulo ou não com insulina. Os autores também revelaram que a exposição à insulina nessas condições elevou a expressão de mRNA dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT2 e aumentou a captação de glicose (Sepúlveda-Quiñenao *et al.*, 2022).

Além disso, é possível que essa resistência parcial aos GCs esteja relacionada à menor expressão da isoforma GR α . Estudos mostram que a exposição prolongada aos GCs leva à redução desse receptor, tanto por degradação proteossomal quanto por supressão na síntese de mRNA (Mifsud *et al.*, 2016; Spies *et al.*, 2021). Adicionalmente, alterações na SUMOilação do GR comprometem sua função de transrepressão, contribuindo para menor sensibilidade aos GCs (Hua *et al.*, 2016). Ainda, a participação de mecanismos epigenéticos, como a metilação do promotor do gene NR3C1, também podem reduzir a expressão do GR α em tecidos periféricos (Mifsud *et al.*, 2012).

Considerando seu papel essencial na regulação da homeostase glicêmica, o pâncreas endócrino pode representar um fator relevante para a homeostase glicêmica e comprometimento de sua massa ou função poderia apoiar a hiperglicemia observada no ipGTT. O grupo exposto aos três ciclos de tratamento com DEX foi o único normoinsulinêmico, sendo os demais hiperinsulinêmicos de maneira reexposição dependente, neste caso maior o número de exposição, menor a hiperinsulinemia. A hiperinsulinemia induzida pela DEX decorre de um efeito compensatório a resistência à insulina, que exige ajustes celulares para suprir maior resposta secretória (Rafacho *et al.*, 2008; 2010; 2011), menor depuração hepática de insulina (Protzek *et al.*, 2016) e aumento da massa de células β (Rafacho *et al.*, 2009).

Embora tenhamos encontrado hiperinsulinemia em três dos quatro grupos tratados, os mecanismos compensatórios envolvidos parecem divergir. Nos grupos expostos ao último ciclo (grupo 90) ou dois últimos ciclos (grupo 60+90), encontramos um aumento na massa de células β , sugerindo uma adaptação morfofuncional, conforme já descrito em estudos com protocolos semelhantes (Da Silva *et al.*, 2019; Zimath *et al.*, 2023). Por outro lado, no grupo 30+90 não foi detectada expansão da massa de células β , sugerindo que, neste grupo, a hiperinsulinemia decorre apenas do aumento da capacidade secretória das células β , bem como, nos três grupos, pelo aumento da razão de células β/α . Os dados morfológicos condisseram com os dados

bioquímicos, haja vista que a inalteração da insulinemia se deu em concomitância com a inalteração da massa de células β nesse grupo. Ainda, apesar do aumento da fração endócrina no grupo 30+60+90, não houve incremento na massa de células α ou β isoladamente, indicando uma expansão proporcional de ambas, preservando a proporção fisiológica entre os tipos celulares

A exposição a doses elevadas de DEX está associada com o acúmulo de glicogênio e triglicerídeos hepáticos (Da Silva *et al.*, 2019; Dos Santos *et al.*, 2021; Zimath *et al.*, 2023). Mesmo em cenários de resistência hepática à insulina, a via da lipogênese *de novo* permanece funcional e, diante da hiperinsulinemia, tende a ser superativada, favorecendo o desenvolvimento de esteatose hepática (Titchenell, Lazar e Birnbaum, 2017; Rahimi, RajPal e Ismail-Beigi, 2020). Tais características morfológicas e bioquímicas foram encontradas nos grupos expostos a um ou dois ciclos de tratamentos com DEX (90, 30+90 e 60+90) e corroboram estudos prévios do laboratório usando o mesmo regime de tratamento (Da Silva *et al.*, 2019; Zimath *et al.*, 2023).

Novamente, observamos que os animais expostos aos três ciclos não desenvolveram agravamento dos desfechos hepáticos avaliados no estudo. Há evidência indicando que a predominância da isoforma β na sinalização do GC exerce um efeito dominante-negativo sobre a isoforma α , inibindo a sinalização DEX-GR e, conseqüentemente, reduzindo a transcrição de genes clássicos-alvo dos GCs, como *PEPCK* e *G6Pase* (Vegiopoulos e Herzig, 2007; Nunes *et al.*, 2013). De fato, camundongos que foram transfetados com a isoforma β apresentaram redução da expressão gênica de *G6Pase*, *PEPCK*, *PTEN* e *AKT2* (Marino *et al.*, 2016).

Como já discutido anteriormente, a isoforma β do GR pode exercer efeitos independentes da presença de GCs, com ações insulínomiméticas em linhagens celulares de hepatocarcinoma HepG2 (Sepúlveda -Quiñenao *et al.*, 2022). Assim, o fenótipo observado no grupo 30+60+90 — com morfologia hepática semelhante ao grupo controle, apesar do tratamento com DEX — pode ser atribuído não apenas à uma possível menor ação dos GCs, mas também ao potencial aumento da atividade metabólica positiva da isoforma β . Isso forma um círculo vicioso em que ausência de hiperinsulinemia, enfraqueceria o tônus para a lipogênese *de novo* e acúmulo hepático de triglicerídeos nesses animais.

Outro ponto que devemos considerar para a menor incidência de efeitos metabólicos adversos no grupo 30+60+90 seria inexistência de supressão do eixo

HPA. Nos animais do grupo 30+60+90 há elementos para supor que os receptores mineralocorticoides estejam susceptíveis a corticosterona endógena (maior neste grupo do que nos demais expostos a DEX). A adição de corticosterona em um tratamento com DEX em camundongos mitigou os efeitos da DEX, com redução da lipólise no tecido adiposo subcutâneo e atenuação da hiperglicemia (Koorneef e colaboradores (2022). Esses achados reforçam a hipótese de que a hipoativação de MR — típica do tratamento com DEX — pode contribuir para os desfechos metabólicos adversos, enquanto sua preservação, como observado no grupo 30+60+90, pode atenuar tais efeitos.

Nossa hipótese de que a exposição repetida a DEX ao longo da vida evocaria desfechos mais deletérios foi refutada. O racional para uma possível piora se baseava em extensa literatura sobre “múltiplos hits” e programação metabólica, que aponta que exposições repetidas a sobrecargas metabólicas aumentam a suscetibilidade do organismo a desfechos adversos subsequentes. Ainda, já foi demonstrado, em animais adultos, que alterações induzidas pela DEX podem ser revertidas após sua suspensão (Rafacho *et al.*, 2010a; Zimath *et al.* 2023). Nossos achados abrem caminho para o cenário de hormese, onde ocorre uma adaptação metabólica suficiente ao ponto de construir resiliência. Esse conceito foi anteriormente explorado em células β sob condições de glicolipototoxicidade e estresse oxidativo e foi sugerido que mecanismos de defesa celular evitariam a falência destas células e, possivelmente protegeriam contra o desenvolvimento de DM2 (Li; Stojanovski; Maechler, 2012; Kolb; Eizirik, 2012). Tais achados não estão descritos no contexto do uso de GCs.

Guardadas limitações de extrapolação, nossos dados sugerem um efeito não monotônico relacionado ao uso repetido de DEX, efeitos não relacionados a diferentes concentrações do fármaco, mas ao que parece, há uma resposta diferencial em função da frequência e momento da exposição a DEX. No momento hipotetizamos que esta configuração se deve a uma resistência ao GC.

Embora nossos achados pareçam benéfico sob a ótica metabólica, é fundamental destacar que a resistência aos GCs representa, por si só, uma condição potencialmente preocupante. Esse desfecho pode representar riscos tão significativos quanto os efeitos diabetogênicos da DEX *per se*. A resistência implicaria na necessidade de doses progressivamente maiores para alcançar efeitos terapêuticos (taquifilaxia), o que comprometeria a segurança farmacológica e aumentaria o risco

de efeitos colaterais. Além disso, poderia comprometer a eficácia terapêutica da DEX em tratamentos futuros, nos quais o uso desse fármaco seja imprescindível para o manejo de diversas condições clínicas.

Dessa forma, nossos achados reforçam a importância de se considerar não apenas os efeitos imediatos da DEX, mas também o impacto cumulativo de exposições prévias ao longo da vida. O uso recorrente e prolongado de GCs pode gerar um cenário de dessensibilização que, apesar de mitigar efeitos deletérios em curto prazo, pode comprometer seriamente a resposta terapêutica futura — tornando essencial uma abordagem cautelosa quanto à prescrição frequente desses fármacos.

6 CONCLUSÃO

Exposições repetidas, desde que iniciadas na primeira infância, comprometem o crescimento dos animais, enquanto atenuam os desfechos metabólicos na vida adulta. Apesar de qual seja o mecanismo subjacente, é importante considerar tais achados no contexto clínico, visando mitigar prejuízos no crescimento bem como a necessidade de superdosagem futura.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARY, Sulekha et al. Glucocorticoid aggravates bone micro-architecture deterioration and skeletal muscle atrophy in mice fed on high-fat diet. **Steroids**, v. 149, p. 108416, 2019.
- AGNEW, Emma J. et al. Glucocorticoids, antenatal corticosteroid therapy and fetal heart maturation. **Journal of molecular endocrinology**, v. 61, n. 1, p. R61-R73, 2018;
- APPEL, Burton; FRIED, Susan K. Effects of insulin and dexamethasone on lipoprotein lipase in human adipose tissue. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 262, n. 5, p. E695-E699, 1992.
- ANGELINI, Nagela et al. Involvement of the cholinergic pathway in glucocorticoid-induced hyperinsulinemia in rats. **Diabetes research and clinical practice**, v. 87, n. 2, p. 184-191, 2010.
- ASSIS, Ana Paula et al. Glucocorticoids decrease thermogenic capacity and increase triacylglycerol synthesis by glycerokinase activation in the brown adipose tissue of rats. **Lipids**, v. 57, n. 6, p. 313-325, 2022.
- BAEK, Chae Yun et al. Astragalus Extract Mixture HT042 Alleviates Dexamethasone-Induced Bone Growth Retardation in Rat Metatarsal Bones. **Nutrients**, v. 16, n. 14, p. 2333, 2024.
- BATU, Ezgi Deniz. Glucocorticoid treatment in juvenile idiopathic arthritis. **Rheumatology international**, v. 39, n. 1, p. 13-27, 2019.
- BEIGELMAN, Avraham; BACHARIER, Leonard B. Management of preschool children with recurrent wheezing: lessons from the NHLBI's asthma research networks. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2016.
- BERTOGLIO, Leandro J.; CAROBREZ, Antonio P. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 108, n. 2, p. 197-203, 2000.
- BRAZZINI, Benedetta; PIMPINELLI, Nicola. New and established topical corticosteroids in dermatology: clinical pharmacology and therapeutic use. **American journal of clinical dermatology**, v. 3, p. 47-58, 2002.

- BURÉN, Jonas et al. Insulin action and signalling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 474, n. 1, p. 91-101, 2008.
- CALDEFIE-CH, F. et al. Dexamethasone treatment induces long-lasting hyperleptinemia and anorexia in old rats. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 50, n. 9, p. 1054-1058, 2001
- CANIS, Recep et al. Effects of inhaled budesonide on insulin sensitivity in nondiabetic patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Advances in therapy**, v. 24, p. 560-570, 2007.
- CASTRO-VALE, Ivone et al. Genetics of glucocorticoid regulation and posttraumatic stress disorder—what do we know?. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 63, p. 143-157, 2016.
- CHAPMAN, Karen; HOLMES, Megan; SECKL, Jonathan. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. **Physiological reviews**, v. 93, n. 3, p. 1139-1206, 2013.
- CHATZOPOULOU, Antonia et al. Transcriptional and metabolic effects of glucocorticoid receptor α and β signaling in zebrafish. **Endocrinology**, v. 156, n. 5, p. 1757-1769, 2015.
- CHOI, Eun Mi et al. Efficacy of intermittent epidural dexamethasone bolus for zoster-associated pain beyond the acute phase. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1811, 2020.
- CLISSOLD, S. P.; HEEL, R. C. Budesonide: a preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in asthma and rhinitis. **Drugs**, v. 28, p. 485-518, 1984.
- CONFALONIERI, Marco et al. Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia: a preliminary randomized study. **American journal of Respiratory and critical care medicine**, v. 171, n. 3, p. 242-248, 2005.
- CZOCK, David et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. **Clinical pharmacokinetics**, v. 44, p. 61-98, 2005
- DA SILVA, Flávia Natividade et al. Impact of glucocorticoid treatment before pregnancy on glucose homeostasis of offspring exposed to glucocorticoid in adult life. **Life Sciences**, v. 237, p. 116913, 2019.

- DE BOSSCHER, Karolien. Selective glucocorticoid receptor modulators. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 120, n. 2-3, p. 96-104, 2010.
- DE KLOET, E. Ronald et al. Stress, glucocorticoids and development. **Progress in brain research**, v. 73, p. 101-120, 1988.
- DOS SANTOS, Cristiane et al. Age-and gender-related changes in glucose homeostasis in glucocorticoid-treated rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 92, n. 10, p. 867-878, 2014.
- DOS SANTOS, Cristiane et al. Impact of combined long-term fructose and prednisolone intake on glucose and lipid homeostasis in rats: benefits of intake interruption or fish oil administration. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 90, p. 108572, 2021.
- DONNER, Kati M. et al. Generalized glucocorticoid resistance caused by a novel two-nucleotide deletion in the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor gene NR3C1. **European journal of endocrinology**, v. 168, n. 1, p. K9-K18, 2013.
- FRIED, Susan K. et al. Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 5, p. 2191-2198, 1993.
- GARBRECHT, Mark R. et al. Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: implications for lung development and the pulmonary surfactant system. **Neonatology**, v. 89, n. 2, p. 109-119, 2006.
- HINDS JR, Terry D. et al. Discovery of glucocorticoid receptor- β in mice with a role in metabolism. **Molecular endocrinology**, v. 24, n. 9, p. 1715-1727, 2010.
- HU, Yajie; LIU, Yang; LI, Shize. Effect of acute cold stress on neuroethology in mice and establishment of its model. **Animals**, v. 12, n. 19, p. 2671, 2022.
- HUA, Guoqiang; GANTI, Krishna Priya; CHAMBON, Pierre. Glucocorticoid-induced tethered transrepression requires SUMOylation of GR and formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 5, p. E635-E643, 2016.
- HVIZDOS, Karen M.; JARVIS, Blair. Budesonide inhalation suspension: a review of its use in infants, children and adults with inflammatory respiratory disorders. **Drugs**, v. 60, n. 5, p. 1141-1178, 2000.

- JAHNG, Jeong Won et al. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. **European journal of pharmacology**, v. 581, n. 1-2, p. 64-70, 2008.
- JAMES, Caitlin M.; OLEJNICZAK, Scott H.; REPASKY, Elizabeth A. How murine models of human disease and immunity are influenced by housing temperature and mild thermal stress. **Temperature**, v. 10, n. 2, p. 166-178, 2023.
- JIA, D. et al. Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5592-5599, 2006.
- KARLSSON, Sven et al. Beta cell adaptation to dexamethasone-induced insulin resistance in rats involves increased glucose responsiveness but not glucose effectiveness. **Pancreas**, v. 22, n. 2, p. 148-156, 2001.
- KAISER, Sunitha V. et al. Preventing exacerbations in preschoolers with recurrent wheeze: a meta-analysis. **Pediatrics**, v. 137, n. 6, 2016.
- KEENEY, Grant E. et al. Dexamethasone for acute asthma exacerbations in children: a meta-analysis. **Pediatrics**, v. 133, n. 3, p. 493-499, 2014
- KOLB, Hubert; EIZIRIK, Décio L. Resistance to type 2 diabetes mellitus: a matter of hormesis? **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 3, p. 183-192, 2012.
- KOORNEEF, Lisa L. et al. Dexamethasone-associated metabolic effects in male mice are partially caused by depletion of endogenous corticosterone. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, p. 960279, 2022.
- KUO, Taiyi et al. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. **Glucocorticoid signaling**, p. 99-126, 2015.
- LONGUI, CA et al., Low glucocorticoid receptor α/β ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. **Horm Metab Res.** 32(10):401-6, 2000;
- LÖWENBERG, Mark et al. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. **Steroids**, v. 73, n. 9-10, p. 1025-1029, 2008.
- LI, Ning; STOJANOVSKI, Suzana; MAECHLER, Pierre. Mitochondrial hormesis in pancreatic β cells: does uncoupling protein 2 play a role?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, n. 1, p. 740849, 2012
- LIU, Chao et al. Dexamethasone-induced diuresis is associated with inhibition of the renin–angiotensin–aldosterone system in rats. **The Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 32, n. 12, p. 614-619, 2016.

- LIU, Xiao-Yan et al. Glucocorticoids decrease body weight and food intake and inhibit appetite regulatory peptide expression in the hypothalamus of rats. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 2, n. 5, p. 977-984, 2011.
- MA, Kun et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 2, p. E363-E371, 2003.
- MAGOMEDOVA, Lilia; CUMMINS, Carolyn L. Glucocorticoids and metabolic control. **Metabolic Control**, p. 73-93, 2015.
- MALKAWI, Abeer K. et al. Metabolomics based profiling of dexamethasone side effects in rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 46, 2018.
- MARTINEZ, Genesee J. et al. Glucocorticoids, their uses, sexual dimorphisms, and diseases: new concepts, mechanisms, and discoveries. **Physiological Reviews**, v. 104, n. 1, p. 473-532, 2024.
- MARINO, Joseph S. et al. Glucocorticoid Receptor β Induces Hepatic Steatosis by Augmenting Inflammation and Inhibition of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) α^* . **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 50, p. 25776-25788, 2016.
- MIFSUD, Karen R. et al. Rapid down-regulation of glucocorticoid receptor gene expression in the dentate gyrus after acute stress in vivo: role of DNA methylation and microRNA activity. **Neuroendocrinology**, v. 104, n. 2, p. 157-169, 2016.
- MIR, Negar et al. Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8503, 2021.
- Mi-Jeong et al. Pathways regulated by glucocorticoids in omental and subcutaneous human adipose tissues: a microarray study. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 3, p. E571-E580, 2011.
- MOTTA, Katia 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.
- NAIR, Anroop B.; JACOB, Shery. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.
- NEWELL-PRICE, John et al. Cushing's syndrome. **The Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1605-1617, 2006.

NUNES, Everson A. et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with β -hydroxy- β -methylbutyrate in rats.

Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism, v. 38, n. 11, p. 1137-1146, 2013.

PANETTIERI, Reynold A. et al. Non-genomic effects of glucocorticoids: an updated view. **Trends in pharmacological sciences**, v. 40, n. 1, p. 38-49, 2019.

PASRICHA, J. S.; THANZAMA, J.; KUMAR KHAN, UTTAM. Intermittent high-dose dexamethasone-cyclophosphamide therapy for pemphigus. **British Journal of Dermatology**, v. 119, n. 1, p. 73-77, 1988.

PECKETT, Ashley J.; WRIGHT, David C.; RIDDELL, Michael C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism**, v. 60, n. 11, p. 1500-1510, 2011.

PROTZEK, André Otávio Peres et al. Hyperinsulinemia caused by dexamethasone treatment is associated with reduced insulin clearance and lower hepatic activity of insulin-degrading enzyme. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, p. 1-8, 2016.

RAFACHO, Alex et al. High doses of dexamethasone induce increased β -cell proliferation in pancreatic rat islets. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 4, p. E681-E689, 2009.

RAFACHO, Alex et al. Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 85-95, 2010.

RAFACHO, A. et al. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short-and long-term dexamethasone-treated rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 43, n. 04, p. 275-281, 2011.

RAFACHO, Alex et al. Pancreatic alpha-cell dysfunction contributes to the disruption of glucose homeostasis and compensatory insulin hypersecretion in glucocorticoid-treated rats. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93531, 2014.

RAHIMI, Leili; RAJPAL, Aman; ISMAIL-BEIGI, Faramarz. Glucocorticoid-induced fatty liver disease. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, p. 1133-1145, 2020.

RAMAMOORTHY, Sivapriya; CIDLOWSKI, John A. Corticosteroids: mechanisms of action in health and disease. **Rheumatic Disease Clinics**, v. 42, n. 1, p. 15-31, 2016.

- ROMANOVSKY, Andrej A.; IVANOV, Andrei I.; SHIMANSKY, Yury P. Selected contribution: ambient temperature for experiments in rats: a new method for determining the zone of thermal neutrality. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 6, p. 2667-2679, 2002.
- RUIZ-IRASTORZA, Guillermo. Prednisone in systemic lupus erythematosus: taper quickly, withdraw slowly. **Rheumatology**, v. 60, n. 12, p. 5489-5490, 2021.
- RUZZIN, J.; WAGMAN, A. S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia**, v. 48, p. 2119-2130, 2005.
- SADEGHIRAD, Behnam et al. Corticosteroids for treatment of sore throat: systematic review and meta-analysis of randomised trials. **BMJ**, v. 358, 2017.
- SAKAE, Thiago Mamôru et al. Effects of prednisone on eosinophilic bronchitis in asthma: a systematic review and meta-analysis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 40, p. 552-563, 2014.
- SANTEN, Richard J. et al. Glucocorticoid receptor mutations and hypersensitivity to endogenous and exogenous glucocorticoids. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 10, p. 3630-3639, 2018.
- SATO, Amy Y. et al. Glucocorticoids induce bone and muscle atrophy by tissue-specific mechanisms upstream of E3 ubiquitin ligases. **Endocrinology**, v. 158, n. 3, p. 664-677, 2017.
- SCHRADER, Andrew J. et al. Repeated elevated plus maze trials as a measure for tracking within-subjects behavioral performance in rats (*Rattus norvegicus*). **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e0207804, 2018.
- SENGUPTA, Pallav. The laboratory rat: relating its age with human's. **International journal of preventive medicine**, v. 4, n. 6, p. 624, 2013.
- SMINK, J. J. et al. IGF and IGF-binding protein expression in the growth plate of normal, dexamethasone-treated and human IGF-II transgenic mice. **Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 1, p. 143-154, 2002.
- SPIES, Lee-Maine L.; VERHOOG, Nicolette JD; LOUW, Ann. Acquired glucocorticoid resistance due to homologous glucocorticoid receptor downregulation: a modern look at an age-old problem. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2529, 2021.
- SEPÚLVEDA-QUIÑENAO, Claudia et al. Glucocorticoid receptor β overexpression has agonist-independent insulin-mimetic effects on HepG2 glucose metabolism. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 10, p. 5582, 2022.

- SOUSA, Ana R. et al. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor β -isoform. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 5, p. 943-950, 2000.
- ŚWIĄTKOWSKA-STODULSKA, Renata et al. Cyclic cushing's syndrome—a diagnostic challenge. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 658429, 2021.
- THUNHORST, Robert L.; BELTZ, Terry G.; JOHNSON, Alan Kim. Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 3, p. R1444-R1451, 2007.
- TITCHENELL, Paul M.; LAZAR, Mitchell A.; BIRNBAUM, Morris J. Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 7, p. 497-505, 2017.
- TOMABECHI, Yuka et al. Extra-adrenal glucocorticoids contribute to the postprandial increase of circulating leptin in mice. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 12, p. 433-439, 2018.
- TUCKER, Laura B.; MCCABE, Joseph T. Behavior of male and female C57BL/6J mice is more consistent with repeated trials in the elevated zero maze than in the elevated plus maze. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 11, p. 13, 2017.
- QUEK, E., Tahir, H., Kumar, P., Hastings, R., & Jha, R. Treatment of COVID-19: a review of current and prospective pharmacotherapies. **British Journal of Hospital Medicine**, 2021.
- VEGIOPOULOS, A; HERZIG, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. **Mol Cell Endocrinol**, v.275, n.1-2, p.:43–61, 2007.
- VELEZ, Dennis A.; MAYBERG, Marc R.; LUDLAM, William H. Cyclic Cushing syndrome: definitions and treatment implications. **Neurosurgical Focus**, v. 23, n. 3, p. 1-3, 2007
- VILLAR, Jesús et al. Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised controlled trial. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 3, p. 267-276, 2020.
- WEINSTEIN, Steven P. et al. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. **Metabolism**, v. 47, n. 1, p. 3-6, 1998.

- WOOD, Claire L. et al. Animal models to explore the effects of glucocorticoids on skeletal growth and structure. **Journal of endocrinology**, v. 236, n. 1, p. R69-R91, 2018.
- WONG, S. C. et al. Growth and the growth hormone-insulin like growth factor 1 axis in children with chronic inflammation: current evidence, gaps in knowledge, and future directions. **Endocrine reviews**, v. 37, n. 1, p. 62-110, 2016.
- WILLIAMS, Dennis M. Clinical pharmacology of corticosteroids. **Respiratory care**, v. 63, n. 6, p. 655-670, 2018.
- YANG, Nan; RAY, David W.; MATTHEWS, Laura C. Current concepts in glucocorticoid resistance. **Steroids**, v. 77, n. 11, p. 1041-1049, 2012.
- ZANDIEH, Iman et al. The use of budesonide in the treatment of autoimmune hepatitis in Canada. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, p. 388-392, 2008.
- ZGAJNAR, Nadia R. et al. Biological actions of the Hsp90-binding immunophilins FKBP51 and FKBP52. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, p. 52, 2019.
- ZIMATH, Priscila L. et al. Oral mometasone furoate administration preserves anti-inflammatory action with fewer metabolic adverse effects in rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 210, p. 115486, 2023

APÊNDICE A – LIMITAÇÕES

Inicialmente, o projeto também contou com avaliações comportamentais nos animais, que se estenderiam para avaliações morfológicas *post-mortem*. Contudo, por questões metodológicas esse eixo do trabalho não foi continuado. Foram conduzidos testes comportamentais de splash, campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevado (LCE) nos animais nos ciclos de 30, 60 e 90 dias, reexpondo os animais aos aparatos ao longo dos três ciclos. Contudo, ao realizar os testes de CA e LCE no ciclo de 60 dias, observamos que o grupo controle apresentou redução significativa na locomoção total, na locomoção e tempo gasto no centro do campo aberto, bem como menor tempo de permanência nos braços abertos do labirinto. Esses efeitos foram ainda mais pronunciados quando os testes foram repetidos no ciclo de 90 dias.

Ambos os testes, em especial o LCE, envolvem um componente de novidade que influencia o comportamento exploratório dos animais. À medida que os animais são expostos repetidamente ao mesmo aparato, ocorre um processo de aprendizado que pode modificar suas respostas comportamentais. No caso do LCE, esse fenômeno é denominado *one-trial tolerance*, no qual a reexposição em dois dias consecutivos resulta em mudanças comportamentais devido ao aprendizado prévio (Bertoglio; Carobrez, 2000). Em nosso protocolo, os animais foram reexpostos ao mesmo aparato em três momentos distintos, porém com intervalo de 30 dias entre as sessões. Optamos por esse desenho experimental baseando-nos em estudos prévios que utilizaram metodologias semelhantes (Tucker; McCabe, 2017; Schrader et al., 2018) com o objetivo de acompanhar longitudinalmente o comportamento dos animais ao longo do tempo, ainda que o foco principal da análise estivesse na comparação transversal ao término dos 90 dias.

Foi possível observar uma redução progressiva na performance dos animais ao longo dos testes, a qual pode, em parte, ser atribuída ao processo de familiarização com os aparatos. No entanto, encontramos uma marcante diminuição na locomoção e ausência quase completa de permanência nos braços abertos no LCE, indicam que outros fatores podem ter contribuído para esse resultado, exigindo uma análise mais aprofundada.

Um fator ambiental relevante foi a ocorrência de um período de frio intenso durante a execução dos testes. As instalações utilizadas não estavam equipadas

adequadamente para controlar a temperatura, o que resultou na exposição dos animais a temperaturas próximas de 15 °C antes e durante os testes, mesmo com o uso de aquecedores nos biotérios. É amplamente reconhecido que a zona de termoneutralidade para roedores situa-se em torno de 26 °C e que exposições prolongadas a 15 °C podem atuar como um estressor significativo, sendo inclusive utilizadas como modelo experimental de estresse em estudos com roedores (Romanosvsky; Ivanov; Shimansky, 2002; Hu; Liu; Li, 2022; James, Olejniczak, Repasky, 2023).

Dessa forma, é plausível considerar que os animais estavam submetidos a um estado de estresse térmico durante a realização dos testes comportamentais, o que comprometeu a validade dos dados obtidos. Consideramos que o grupo controle foi impactado, o que inviabiliza sua utilização como referencial confiável. Além disso, como todos os grupos experimentais foram igualmente expostos às baixas temperaturas, esse fator constitui uma importante limitação metodológica do presente estudo.

Diante dos resultados observados e das limitações metodológicas identificadas, optou-se por não dar continuidade à avaliação comportamental neste estudo. A impossibilidade de validação de testes fundamentais, como o CA e o LCE, comprometeu significativamente a interpretação dos dados comportamentais. Considerando a relevância desses testes para a análise de parâmetros relacionados ao comportamento do tipo ansioso, defensivo e exploratório, consideramos inviável prosseguir com esse eixo de avaliação. Assim, decidiu-se dar continuidade no desenvolvimento e análise dos parâmetros metabólicos do trabalho, os quais permaneceram tecnicamente viáveis e consistentes ao longo do experimento.

ANEXO A – CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da exposição repetida à dexametasona ao longo da vida sobre a homeostase glicêmica e lipídica de ratos ", protocolada sob o CEUA nº 8396201023 (ID 002603), sob a responsabilidade de **Alex Rafacho e equipe; Carolina Peixe** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 14/02/2024.

We certify that the proposal "Effects of repeated exposure to dexamethasone throughout life on glycemic and lipid homeostasis in rats", utilizing 77 Heterogenics rats (77 males), protocol number CEUA 8396201023 (ID 002603), under the responsibility of **Alex Rafacho and team; Carolina Peixe** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 02/14/2024.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2024 a 02/2026 Área: Farmacologia

Origem: Biotério Central

Espécie: Ratos heterogênicos

Linhagem: Ratos Wistar (Rattus norvegicus)

sexo: Machos

idade: 21 a 25 dias

Quantidade: 77

Peso: 60 a 100 g

Florianópolis, 13 de junho de 2025

Juliano Ferreira

VF

Juliano Ferreira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de
Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

