



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

Priscila Laiz Zimath

**Impacto do furoato de mometasona sobre a homeostase glicêmica e lipídica:  
busca por um glicocorticoide com menos efeitos adversos**

Florianópolis  
2022

Priscila Laiz Zimath

**Impacto do furoato de mometasona sobre a homeostase glicêmica e lipídica:  
busca por um glicocorticoide com menos efeitos adversos**

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

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho

Coorientador: Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho

Florianópolis

2022

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

Zimath, Priscila Laiz

Impacto do furoato de mometasona sobre a homeostase glicêmica e lipídica: busca por um glicocorticoide com menos efeitos adversos / Priscila Laiz Zimath ; orientador, Alex Rafacho, coorientador, Alfeu Zanotto Filho, 2022.

100 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Glicocorticoides. 4. Homeostase glicêmica. 5. Anti-inflamatório. I. Rafacho, Alex. II. Zanotto Filho, Alfeu. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Priscila Laiz Zimath

**Impacto do furoato de mometasona sobre a homeostase glicêmica e lipídica:  
busca por um glicocorticoide com menos efeitos adversos**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Bruno Sarmento  
Universidade do Porto

Prof. Dr. Daniel Fernandes  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Gabriel Forato Anhô  
Universidade Estadual de Campinas

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

---

Prof. Rui Prediger  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Alex Rafacho  
Orientador

Florianópolis, 2022

## AGRADECIMENTOS

Após 4 anos de dedicação a essa importante etapa da minha vida, gostaria de expressar meu profundo agradecimento a todos que me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao meu supervisor, Prof. Alex Rafacho, por ter aberto as portas do laboratório e por dedicar muito do seu tempo para me orientar, ensinar e encorajar a não desistir dos meus objetivos. Agradeço a confiança em mim depositada;

Àqueles que prestaram seu apoio técnico e científico: Prof. Alfeu Zanotto Filho e Rosângela Gonçalves pelo suporte na técnica de citometria de fluxo; Agradeço a Prof. Elenara Lemos Senna que me acolheu em seu laboratório e a Rafaela Costa pela colaboração no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, ensaio farmacocinético e inúmeras quantificações por HPLC; Prof. Fernando Spiller por ceder a carragenina; Ao doutorando Rodrigo Formiga, pela parceria e dicas no modelo de colite; Agradeço também àqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Bruno Sarmento por prontamente me receber em seu laboratório e permitir que parte desse trabalho fosse desenvolvido com sua supervisão. Também agradeço aos demais integrantes do *Nanomedicines & Translational Drug Delivery Group* por me acolherem durante os 6 meses de trabalho;

Aos parceiros e amigos de trabalho: Milena Almeida, Flávia Natividade, Cinthia Correa, Maciel Bruxel, Ana Paula Taschetto, Marcella Amorim;

Aos colegas do Laboratório de Investigação em Doenças Crônicas (LIDoC): Renata Silvério, José Rodrigo Martins, Lenara Souza, Morgana Contini, Natália Tonet, Aline Lima, Cristiane dos Santos, Danilo Marçal, Herver Brunetta, Prof. Gustavo dos Santos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, professores e coordenação.

À Aché Indústria Farmacêutica, por gentilmente ceder o fármaco para o nosso estudo.

À equipe técnica do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e a equipe do Biotério Central da UFSC.

Às agências de fomento CNPq e CAPES e à UFSC.

Aos professores membros da banca examinadora do doutorado, Dr. Bruno Sarmiento, Dra. Cristiane dos Santos, Dr. Daniel Fernandes, Dr. Gabriel Anê e Dr. Jamil Assreuy pela leitura da tese, discussões e sugestões para o aprimoramento da versão final deste documento e para a minha formação profissional;

Às minhas amigas e confidentes Adrielli Tenfen, Ana Paula Dalmagro, o apoio de vocês, científico e pessoal, sempre foi muito importante para mim.

À toda minha família e minhas amigas que levo para a vida, Pamella e Maria Augusta, agradeço o apoio emocional e por compreenderem meus momentos de ausência;

Ao Junior, pelo apoio experimentos, por discutir ciência diariamente comigo e por ter me acompanhado no desenvolvimento desse trabalho; tua ajuda foi imprescindível.

Aos meus pais, pelo carinho, apoio, compreensão, paciência e confiança depositados em mim. Obrigada por sempre apoiarem minhas escolhas!

## RESUMO

Os glicocorticoides (GCs) exógenos, incluindo a dexametasona (DEX), são amplamente utilizados devido às suas ações anti-inflamatórias e imunossupressoras. Apesar de seus efeitos terapêuticos, os GCs em excesso resultam em distúrbios metabólicos, como intolerância à glicose, resistência à insulina e dislipidemias. Assim, novos ligantes com potencial aplicação terapêutica e menores efeitos adversos são necessários. O furoato de mometasona (FM) é um GC utilizado para fins tópicos e inalatórios e, com base em evidências *in vitro*, apresenta potencialmente menores efeitos colaterais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar 1) o impacto anti-inflamatório e/ou no metabolismo de glicose e lipídios de ratos machos e fêmeas; 2) o envolvimento de GR nesses possíveis efeitos; 3) se os possíveis efeitos metabólicos são reversíveis após a interrupção do tratamento; 4) desenvolver, caracterizar e avaliar a permeabilidade intestinal de uma nanopartícula (NP) contendo FM. O efeito anti-inflamatório foi avaliado pelo teste agudo de peritonite induzida por carragenina (Cg) (500 µg/cavidade, intraperitoneal (ip)) em ratos Wistar machos e fêmeas (3 meses de idade) previamente tratados com FM (0,1, 0,3, 1,0 ou 3,0 mg/kg de massa corporal (mc) por gavagem oral (og) ou 1,0 mg/kg mc ip ou sc (subcutâneo), diluído em óleo de milho) ou DEX (1,0 mg/kg mc og ou ip, diluído em solução salina). Também foi utilizado o modelo de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS, 3% m/v em água de beber) em camundongos machos (2 meses de idade) tratados concomitantemente com DEX ou FM (1,0 mg/kg og) por 8 dias. Para analisar parâmetros metabólicos relacionados ao metabolismo de glicose e lipídeos, os animais foram tratados diariamente com FM (0,1 ou 1,0 mg/kg mc ip ou og) ou DEX (1 mg/kg mc ip ou og, apenas machos) por 7 dias. No 5º dia foi realizado o teste de tolerância a glicose (ipGTT), no 6º dia o teste de tolerância a insulina (ipITT) e após a eutanásia foram avaliados parâmetros *ex vivo* relacionados ao metabolismo de glicose e lipídeos. Para avaliar o envolvimento do GR, os ratos foram pré-tratados com mifepristona (MIFE - antagonista do GR, 20 mg/kg mc ip) 30 min antes dos GCs. Esses animais foram submetidos ao ensaio de peritonite induzida por Cg e análises metabólicas como descrito anteriormente. Para avaliar se os possíveis desfechos metabólicos desenvolvidos após tratamento com FM são reversíveis com a interrupção do tratamento, os ratos foram submetidos ao mesmo protocolo de 7 dias supracitado e foram mantidos por 10 dias sem tratamento para análise dos desfechos metabólicos. Dando sequência, uma nanopartícula (NP) de zeína contendo FM foi desenvolvida por método de nanoprecipitação e posteriormente caracterizada. A permeabilidade intestinal foi verificada em modelo 2D *in vitro* em células Caco-2 e HT29-MTX. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFSC (CEUA Nº 5012250518). O tratamento com o FM (ip e og) preveniu o processo inflamatório visto na peritonite em ratos de ambos os sexos e no modelo de colite em camundongos. Independentemente da via de administração e sexo, os animais tratados com FM apresentaram diminuição da sensibilidade à insulina, mas apenas os grupos FM ip machos e FM ip e og fêmeas apresentaram hiperinsulinemia compensatória. Ratos tratados com FM ip apresentaram diminuição da tolerância à glicose e machos e fêmeas desenvolveram dislipidemia. A ação anti-inflamatória de FM ip e og não é dependente exclusivamente de GR e pré-tratamento com MIFE preveniu a maioria dos desfechos metabólicos desenvolvidos a partir da administração de FM ip. Observamos que esses efeitos metabólicos são reversíveis após a interrupção do tratamento. Concluímos que o FM mantém atividade anti-inflamatória quando administrado por via sistêmica e apresenta menor impacto no metabolismo quando administrada por via oral (em machos e fêmeas). Além disso, o FM não atua

exclusivamente no GR, sugerindo que efeitos anti-inflamatórios podem ocorrer por outra via farmacológica.

Palavras-chave: furoato de mometasona, glicocorticoides, disglicemia, dislipidemia, efeito anti-inflamatório.



## ABSTRACT

Exogenous glucocorticoids (GCs), including dexamethasone (DEX), are widely used for their anti-inflammatory and immunosuppressive actions. Despite their therapeutic effects, GCs excess can result in metabolic disorders such as glucose intolerance, insulin resistance, and dyslipidemias. Thus, new ligands with potential therapeutic application and fewer adverse effects are needed. Mometasone furoate (MF) is a GC used for topical and inhalational purposes and based on *in vitro* evidence, potentially has fewer side effects. Thus, the objective of this work was to evaluate 1) the anti-inflammatory impact and/or on glucose and lipid metabolism in male and female rats; 2) the involvement of GR in these possible effects; 3) whether the possible metabolic effects are reversible after interruption of treatment; 4) to develop, characterize and evaluate the intestinal permeability of a nanoparticle (NP) containing MF. The anti-inflammatory effect was evaluated by the carrageenan-induced peritonitis model (Cg, 500 µg/well, intraperitoneal (ip)) in male and female Wistar rats (3 months old) previously treated with MF (0.1, 0.3, 1.0 or 3.0 mg/kg body mass (bm) by oral gavage (og) or 1.0 mg/kg bm ip or sc (subcutaneously, diluted in corn oil) or DEX (1.0 mg/kg bm og or ip, diluted in saline). We also used dextran sulfate sodium (DSS, 3% w/v in drinking water) induced colitis model and male mice (2 months old) were treated concomitantly with DEX or MF (1.0 mg/kg og) for eight days. To analyze metabolic parameters related to glucose and lipid metabolism, rats were treated daily with MF (0.1 or 1.0 mg/kg bm ip or og) or DEX (1 mg/kg bm ip or og, only males) for seven days. On the 5<sup>th</sup> day, the glucose tolerance test (ipGTT) was performed; on the 6<sup>th</sup> day, the insulin tolerance test (ipITT) was performed, and on the 7<sup>th</sup> day after euthanasia, *ex vivo* parameters related to glucose and lipid metabolism were evaluated. To assess GR involvement, rats were pretreated with mifepristone (MIFE - GR antagonist, 20 mg/kg bm ip) 30 min before GCs. These animals were submitted to the Cg-induced peritonitis and metabolic analyses described above. To assess whether the metabolic outcomes developed after MF treatment are reversible upon interruption of treatment, the rats were submitted to the 7-day protocol mentioned above and were maintained for ten days without treatment. The MF-loaded zein NP was developed by nanoprecipitation method and further characterized. Intestinal permeability was verified in a 2D *in vitro* model using Caco-2 and HT29-MTX cells. The study was approved by the UFSC Ethics Committee (CEUA N° 5012250518). Treatment with MF (ip and og) prevented the inflammatory process seen in peritonitis in rats of both sexes and in the mouse colitis model. Regardless of the route of administration and sex, the animals treated with MF showed decreased insulin sensitivity. Still, only the MF ip male and MF ip and og female groups showed compensatory hyperinsulinemia. Rats treated with MF ip showed reduced glucose tolerance, and males and females developed dyslipidemia. The anti-inflammatory action of MF ip and og is not exclusively dependent on GR and pretreatment with MIFE prevented most of the metabolic outcomes developed from the administration of MF ip. We observed that these metabolic effects are reversible after treatment interruption. We conclude that MF maintains anti-inflammatory activity when administered systemically and has less impact on metabolism when administered orally (in males and females). In addition, MF does not act exclusively on the GR, suggesting that anti-inflammatory effects may occur through another pharmacological route.

Keywords: mometasone furoate, glucocorticoids, dysglycemia, dyslipidemia, anti-inflammatory effect.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos genômicos dos GCs .....	21
Figura 2. Efeitos dos GCs no metabolismo glicêmico e lipídico .....	24
Figura 3. Estrutura química do cortisol e FM.....	27
Figura 4. Desenho experimental do modelo de peritonite induzida por carragenina.	35
Figura 5. Desenho experimental do modelo de colite induzida por DSS em camundongos.....	35
Figura 6. Desenho experimental: impacto do tratamento com FM no metabolismo glicêmico e lipídico de ratos machos e fêmeas .....	39
Figura 7. Desenho experimental: manutenção dos desfechos metabólicos desenvolvidos em ratos após a interrupção do tratamento com FM .....	43
Figura 8. Ensaio de permeabilidade intestinal.....	49
Figura 9. Efeito anti-inflamatório da administração sistêmica de FM em machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo de peritonite induzida por carragenina.....	52
Figura 10. Efeito anti-inflamatório da administração oral de DEX ou FM (1 mg/kg) em camundongos submetidos ao modelo de colite induzida por DSS.....	54
Figura 11. Imagens representativas do efeito do tratamento subcrônico com FM em cortes histológicos de cólon corados com HE após 8 dias de exposição ao DSS ....	55
Figura 12. Impacto do tratamento sistêmico com FM na massa corpórea e consumo alimentar de machos e fêmeas. ....	57
Figura 13. Impacto do tratamento sistêmico com FM na homeostase glicêmica de machos e fêmeas .....	58
Figura 14. Perfil metabólico plasmático de machos e fêmeas em jejum após 7 dias de tratamento. ....	61
Figura 15. Análise histológica hepática e conteúdo de glicogênio e triacilglicerol de machos após 7 dias de tratamento. ....	62
Figura 16. Análise histológica hepática e conteúdo de glicogênio e triacilglicerol de fêmeas após 7 dias de tratamento.. ....	63
Figura 17. Massa de órgãos de machos e fêmeas após 7 dias de tratamento.. ....	64
Figura 18. Envolvimento de vias de sinalização em fígado de machos após 7 dias de tratamento.. ....	65
Figura 19. Análises in vivo após a interrupção do tratamento com FM ou DEX.....	66

Figura 20. Impacto da interrupção do tratamento intraperitoneal com FM em parâmetros <i>ex vivo</i> .....	67
Figura 21. Envolvimento de GR no efeito anti-inflamatório de FM em ratos submetidos ao modelo de peritonite induzida por carragenina.....	68
Figura 22. Envolvimento de GR na massa corpórea, consumo alimentar e homeostase glicêmica de machos tratados após 7 dias de tratamento.....	70
Figura 23. Envolvimento de GR em parâmetros bioquímicos de machos após 7 dias de tratamento.....	71
Figura 24. Envolvimento de GR na massa de órgãos de machos após 7 dias de tratamento.....	72
Figura 25. Imagens representativas de NPs de zeína vazias (A e B) e 5% FM (C e D)..	73
.....	
Figura 26. Características de NPs de zeína contendo FM após a produção e 30 dias armazenadas a 4°C.....	74
Figura 27. Análises <i>in vitro</i> de FM livre e NPs de zeína contendo FM: perfil de liberação de FM em pH gástrico e intestinal, permeabilidade em células intestinais e atividade metabólica de células tratadas com FM ou NPs contendo 5 e 10% de FM. ....	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. GCs administrados pela via sistêmica e inalatória.....	18
Tabela 2. Desenvolvimento de formulações contendo GCs, SEGRAs e ligantes de GRs .....	26
Tabela 3. Pontuação para cálculo do IAD .....	36
Tabela 4. Tamanho, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ZP), eficiência de associação (AE) e concentração de fármaco (DL) de NPs de zeína contendo FM...	73

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC: acetil-CoA carboxilase  
AE: eficiência de associação  
AGL: ácidos graxos livres  
AKT: proteína cinase B  
ALT: alanina aminotransferase  
AP-1: proteína ativadora 1  
AST: aspartato aminotransferase  
AUC: área-sob-a-curva  
Cg: carragenina  
COX-2: enzima ciclooxigenase 2  
CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP  
CT: colesterol total  
DEX: dexametasona  
DL: concentração do fármaco - drug loading  
DMT2: diabetes mellitus tipo 2  
DSS: dextran sulfato de sódio  
Fas: ácido graxo sintetase  
FM: furoato de mometasona  
FT: fator de transcrição  
FXR: receptor Farnesoid X  
G6Pase: glicose-6-fosfatase  
GC: glicocorticoide  
Glut2: transportador de glicose 2  
GR: receptor glicocorticoide  
GRE: elementos responsivos ao GC  
GSIS: síntese de insulina estimulada por glicose  
HDL: lipoproteína de alta densidade  
HE: hematoxilina e eosina  
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência  
HSL: lipase sensível a hormônio  
HTAB: tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio  
IAD: índice de atividade da doença

IDE: enzima degradadora de insulina  
Ip: via intraperitoneal  
ipGTT: teste de tolerância a glicose intraperitoneal  
ipITT: teste de tolerância a insulina intraperitoneal  
kITT: constante de decaimento de glicose  
Mc: massa corpórea  
MIFE: mifepristona  
MPO: mieloperoxidase  
MR: receptor mineralocorticoide  
MT: maquinaria transcricional  
MTT: corante brometo azul de triazolil tetrazólio  
NF-κB: fator de transcrição kappa B  
nGRE: elementos negativos responsivos ao GC  
NO: óxido nítrico  
NP: nanopartículas  
Og: via oral  
PDI: índice de polidispersão  
PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinase  
RE: elemento responsivo  
RI: resistência à insulina  
Sc: via subcutânea  
SEGRA: agonista seletivo de receptores de glicocorticoide  
STAT: fatores de transcrição ativados por tirosinas cinases  
 $t_{1/2}$ : tempo de meia-vida  
TEER: resistência elétrica transepitelial  
TEM: microscopia eletrônica de transmissão  
TG: triacilglicerol  
VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade  
ZP: potencial zeta

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 Aspectos gerais dos glicocorticoides .....	17
1.2 Mecanismo de ação dos GCs em receptores intracelulares .....	18
1.3 Efeitos dos GCs no metabolismo de glicose e lipídeos .....	21
1.4 Busca por moléculas alternativas .....	24
1.5 Furoato de mometasona .....	27
<b>2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1 Objetivo geral .....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 Animais experimentais .....	33
4.1.1 Tamanho de amostra .....	33
4.2 Desenhos experimentais e ensaios <i>ex vivo</i> .....	33
4.2.1 Pergunta experimental 1: O tratamento sistêmico com FM previne processos inflamatórios em roedores? .....	34
4.2.2 Pergunta experimental 2: O tratamento sistêmico com FM influencia a homeostase glicêmica e lipídica de ratos? .....	38
4.2.3 Pergunta experimental 3: Os desfechos metabólicos desenvolvidos a partir da administração intraperitoneal de FM são reversíveis após a interrupção do tratamento? .....	43
4.2.4 Pergunta experimental 4: O efeito anti-inflamatório e desfechos metabólicos desenvolvidos a partir da administração sistêmica de FM são dependentes da ativação de GR? .....	43
4.2.5 Pergunta experimental 5: O desenvolvimento de uma formulação contendo FM aumenta a biodisponibilidade do fármaco quando administrado por via oral? .....	45
4.3 Análises estatísticas .....	49
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
5.1 Resposta à pergunta experimental 1: O tratamento sistêmico com FM previne processos inflamatórios em roedores submetidos ao modelo de peritonite e colite induzida por DSS .....	51

5.2 Resposta à pergunta experimental 2: O tratamento oral com FM apresenta pouco impacto no metabolismo glicêmico e lipídico de machos e fêmeas .....	55
5.3 Resposta à pergunta experimental 3: Os desfechos metabólicos desenvolvidos a partir da administração ip de FM são reversíveis após a interrupção do tratamento .....	66
5.4 Resposta à pergunta experimental 4: Os efeitos anti-inflamatório e metabólicos de FM dependem em parte da ativação de GR .....	68
5.5 Resposta à pergunta experimental 5: O desenvolvimento de NP de zeína contendo FM para administração oral foi bem-sucedido .....	72
<b>6. SUMÁRIO DE RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>9 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO .....</b>	<b>91</b>
<b>10 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS GERAIS DOS GLICOCORTICOIDES

Há aproximadamente 90 anos foram iniciados os primeiros estudos relacionados a extração e utilização clínica de um hormônio obtido do córtex adrenal, a cortisona (HARTMAN; BROWNELL, 1930). A cortisona foi descrita como um hormônio essencial para vida e em 1950 resultou na concessão do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina aos pesquisadores Hench, Kendall e Reichstein (“THE NOBEL PRIZE IN PHYSIOLOGY OR MEDICINE 1950,” [S.D.]). Em 1948 foi administrada pela primeira vez em uma mulher diagnosticada com artrite reumatoide e a melhora significativa dos sintomas foi observada após o terceiro dia de administração (Hench; Kendall 1949). No entanto, o seu uso crônico ou em elevadas doses foi limitado devido ao desenvolvimento de efeitos adversos, como desbalanço mineral e retenção de fluídos devido a ativação de receptores mineralocorticoides (MR) nos rins. Outros efeitos apresentados foram o desenvolvimento de osteoporose, hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2), ganho de peso e aspecto cushingoide (BONAVENTURA; MONTECUCCO, 2018).

Desde então, indústrias farmacêuticas buscam desenvolver glicocorticoides (GCs) sintéticos análogos ao cortisol (cortisona na forma ativa) e que apresentem menos efeitos adversos. Dentre eles destaca-se a prednisolona, prednisona e a dexametasona (BUNIM, PECHET E BOLLET, 1955), os quais foram aprovados para uso clínico e se mostraram eficazes no tratamento dos sintomas de artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias. Esses compostos apresentam modificações estruturais que alteram suas propriedades farmacológicas, melhorando a solubilidade, tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) e afinidade à receptores.

Os GCs se tornaram uma das opções de tratamento mais utilizadas e eficazes para vários distúrbios inflamatórios e autoimunes, sendo muitas vezes a única opção de tratamento. São amplamente indicados em doses fisiológicas na terapia de reposição em insuficiência adrenal, bem como em doses supra fisiológicas para o manejo de doenças dermatológicas, oftalmológicas, reumatológicas, pulmonares, distúrbios hematológicos e gastrointestinais. Devido sua ação imunossupressora também são indicados no tratamento de pacientes transplantados (LIU et al., 2013).

Há inúmeros GCs disponíveis para uso terapêutico. Devido a alterações estruturais, eles apresentam diferenças em propriedades físico-químicas e potência,

pois foram otimizados para serem administrados por diferentes vias (oral, intramuscular, intra-articular, intravenosa, inalatória e tópica). As propriedades farmacocinéticas desses fármacos diferem das do cortisol, pois apresentam  $t_{1/2}$  prolongados. Classicamente, as diferentes formulações de GC empregados pela via sistêmica e inalatórias são comparadas tomando por base suas potências anti-inflamatórias relativas às da hidrocortisona (para via sistêmica) e beclometasona (para via inalatória) e as equivalências entre suas doses (vide Tabela 1).

**Tabela 1. GCs administrados pela via sistêmica e inalatória**

Composto	Ação GC	Dose equivalente (mg)*	Ação MR	Duração de ação (horas)
GCs administrados pela via oral				
<b>Cortisol</b>	<b>1.0</b>	<b>20</b>	<b>1.0</b>	<b>8</b>
Cortisona	0.8	25	1.0	8
Prednisona	3.5 – 5	5	0.8	16 – 36
Prednisolona	4.0	5	1.0	16 – 36
Metilprednisolona	5 – 7.5	4	0	18 – 40
Triancinolona	5	4	0.8	12 – 36
Betametasona	30	0.60	0	36 – 54
<b>Dexametasona</b>	<b>30</b>	<b>0.75</b>	<b>0</b>	<b>36 – 54</b>
		<b>Dose equivalente (µg)**</b>		
GCs administrados pela via inalatória				
Budesonida	3750	400	0	1.5 – 2.8
Fluticasona	7200	200	0	3.1 – 14
<b>Furoato de mometasona</b>	<b>8800</b>	<b>200/400</b>	<b>0</b>	<b>4.5</b>
Ciclesonida	4800	320	0	0.7-7
Dipropionato de beclometasona	2100	400	0	0.5

\*equivalente à hidrocortisona; \*\*equivalente à beclometasona; MR: receptor mineralocorticoide  
Adaptado de ADCOCK; MUMBY, 2016.

## 1.2 MECANISMO DE AÇÃO DOS GCS EM RECEPTORES INTRACELULARES

Clinicamente, os GCs são utilizados como potentes anti-inflamatórios, pois regulam processos durante todas as fases da inflamação; desde fases iniciais, diminuindo a liberação de mediadores pró-inflamatórios, até fases terminais e de resolução, removendo detritos celulares. Durante a fase aguda da inflamação, a ação dos GCs é reduzir permeabilidade vascular, portanto, diminuindo o extravasamento de proteínas e células sanguíneas para o sítio da inflamação. Também suprime vias

de sinalização envolvidas na detecção de agentes nocivos e propagação de agentes inflamatórios, além de modular a transativação ou transrepressão gênica para a síntese de proteínas anti- ou pró-inflamatórias, respectivamente.

Os efeitos farmacológicos ocorrem por mecanismos genômicos e não-genômicos, a partir da interação do GC com os receptores de glicocorticoides (GR) intracelulares (efeitos genômicos) ou de membrana (efeitos não-genômicos) presentes em todas as células. Os efeitos genômicos são bem estabelecidos e suas ações se iniciam a partir do momento em que ocorre a tradução proteica, o que leva no mínimo 60 minutos. No entanto, os GCs também apresentam respostas não-genômicas, as quais são observadas segundos após administração. Isso devido ao fato de não exigir nenhum processo de transcrição e tradução. Na ação não-genômica ocorre, por exemplo, modificação no fluxo de íons por canais de membrana (SCHULZ et al., 2001). Os efeitos no metabolismo de glicose e lipídeos são majoritariamente dependentes de vias genômicas.

Devido a estrutura lipofílica, os GCs difundem-se através da membrana plasmática ligando-se aos GRs citosólicos, expressos em todas as células nucleadas. Os efeitos genômicos ocorrem pela ligação da molécula de GC ao GR, resultando na modulação da expressão gênica. O GR humano é composto por três domínios: N-terminal, que interage com fatores co-reguladores e maquinaria transcricional; o domínio de ligação ao DNA contendo dois dedos de zinco, onde ocorrem interações genômicas; e o último domínio C-terminal, onde ocorre a interação do ligante por meio de uma bolsa hidrofóbica. Entre os dois últimos domínios há uma região de dobradiça flexível, que permite a homodimerização do receptor e sua translocação ao núcleo (KUMAR; THOMPSON, 2005; OAKLEY; CIDLOWSKI, 2011). O gene que codifica o GR humano contém 9 éxons localizados no cromossomo 5 e *splicing* alternativos podem resultar em 5 diferentes isoformas: GR $\alpha$ , GR $\beta$ , GR $\gamma$ , GR-A e GR-P. As isoformas GR $\alpha$  (isoforma predominante) e GR $\gamma$  estão associadas aos efeitos canônicos do receptor, portanto os hormônios têm a capacidade de se ligar a esses receptores e regular a expressão gênica. Já as demais isoformas não interagem com GCs (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2011). Na ausência de ligante o GR $\alpha$  localiza-se no citoplasma em um complexo multiproteico que contém proteínas de choque térmico. Classicamente, o acoplamento de um ligante resulta em alteração conformacional no GR, dissociando-se de chaperonas, o que permite a translocação nuclear. No entanto, há evidências de que a ligação à essas proteínas são importantes para a translocação

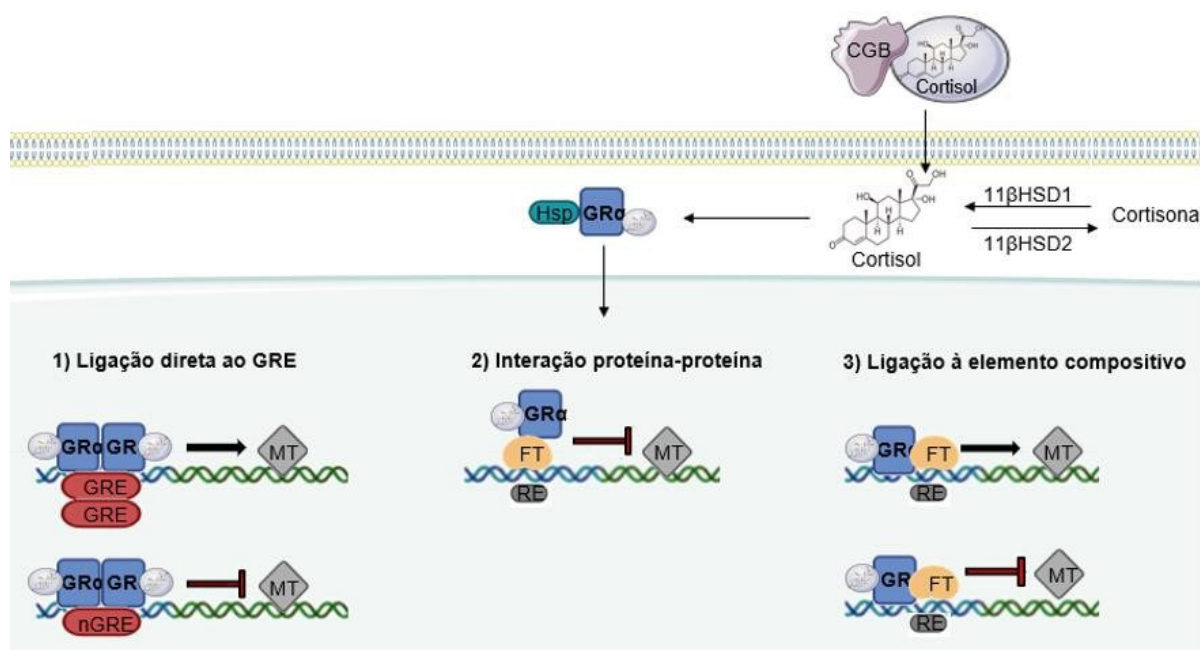
nuclear do complexo GR-GC (VANDEVYVER; DEJAGER; LIBERT, 2012). No núcleo, o complexo GR-GC interage com o DNA e maquinarias transcricionais para exercer os efeitos biológicos.

Os efeitos genômicos dos GCs estão representados na Figura 1 e são divididos em três mecanismos:

1) Transativação ou transrepressão gênica: O homodímero do complexo GR $\alpha$ -GC age como um fator de transcrição ligando-se diretamente a elementos responsivos ao GC (GREs), os quais recrutam co-ativadores que iniciam a transcrição de genes (transativação) (LUIZI et al., 1991). No entanto, este complexo também pode interagir com GREs negativos (nGRE) que atuam por meio do recrutamento de co-repressores levando à inibição da transcrição gênica (transrepressão) (SURJIT et al., 2011).

2) Transrepressão gênica por interação proteína-proteína: Caracterizado por ligação direta do monômero GR-GC à um fator de transcrição, diminuindo assim a capacidade de ligação do fator de transcrição ao DNA, ou diminuindo o recrutamento de co-reguladores e/ou da maquinaria transcricional. Esse é considerado o principal mecanismo pelo qual os GCs medeiam as respostas imunes, pois interfere na ativação dos principais fatores de transcrição inflamatórios, incluindo o fator de transcrição *kappa* B (NF- $\kappa$ B), proteína ativadora 1 (AP-1) e fatores de transcrição ativados por tirosinas cinases (STAT) (LUIZI et al., 1991; RATMAN et al., 2013).

3) Ligação à elemento compositivo: Já o último mecanismo de ação ocorre quando o monômero GR-GC se liga a elementos compositivos, ou seja, uma sequência de DNA que contém um GRE ou nGRE e um elemento responsivo (RE) de resposta para um fator de transcrição distinto (RATMAN et al., 2013).



**Figura 1. Efeitos genômicos dos GCs**

CGB: transcortina; 11βHSD: 11β-hidroxidehidrogenase; Hsp: proteínas de choque térmico; GR: receptor de glicocorticoide; GRE: elemento positivo responsivo à glicocorticoide; nGRE: elemento negativo responsivo à glicocorticoide MT: maquinaria transcricional; FT: fator de transcrição; RE: elemento responsivo. Imagem produzida a partir de Biorender.com  
Adaptado de CAIN; CIDLOWSKI, 2017.

### 1.3 EFEITOS DOS GCS NO METABOLISMO DE GLICOSE E LIPÍDEOS

Apesar de ser uma classe medicamentosa muito eficaz no tratamento de várias doenças de base inflamatória, os GCs apresentam um perfil extenso de efeitos adversos, os quais variam desde sintomas leves e reversíveis com a interrupção do tratamento, até manifestações irreversíveis, como o desenvolvimento de DMT2 (ANDREWS et al., 1999; PASIEKA; RAFACHO, 2016; SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002a). Esses efeitos indesejáveis são dependentes de dose, duração de tratamento e susceptibilidade do indivíduo (ex. possuir intolerância à glicose ou diminuição da sensibilidade a insulina, gravidez, obesidade). Alterações metabólicas mais comumente observadas são a diminuição dos efeitos supressores da insulina sobre a gliconeogênese, alterações na sensibilidade periférica à insulina, redução da captação de glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo e dislipidemia (PASIEKA; RAFACHO, 2016; PROTZEK et al., 2014; VAN RAALTE; OUWENS; DIAMANT, 2009). Uma combinação típica de efeitos indesejáveis ocasionados pelo excesso de GCs em humanos é observado na Síndrome de Cushing ou hipercortisolemia medicamentosa; onde os pacientes apresentam fenótipo de face de

lua e corcunda de búfalo, obesidade abdominal, hirsutismo, osteoporose, retardo de crescimento, hipertensão arterial e intolerância a glicose (SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002a).

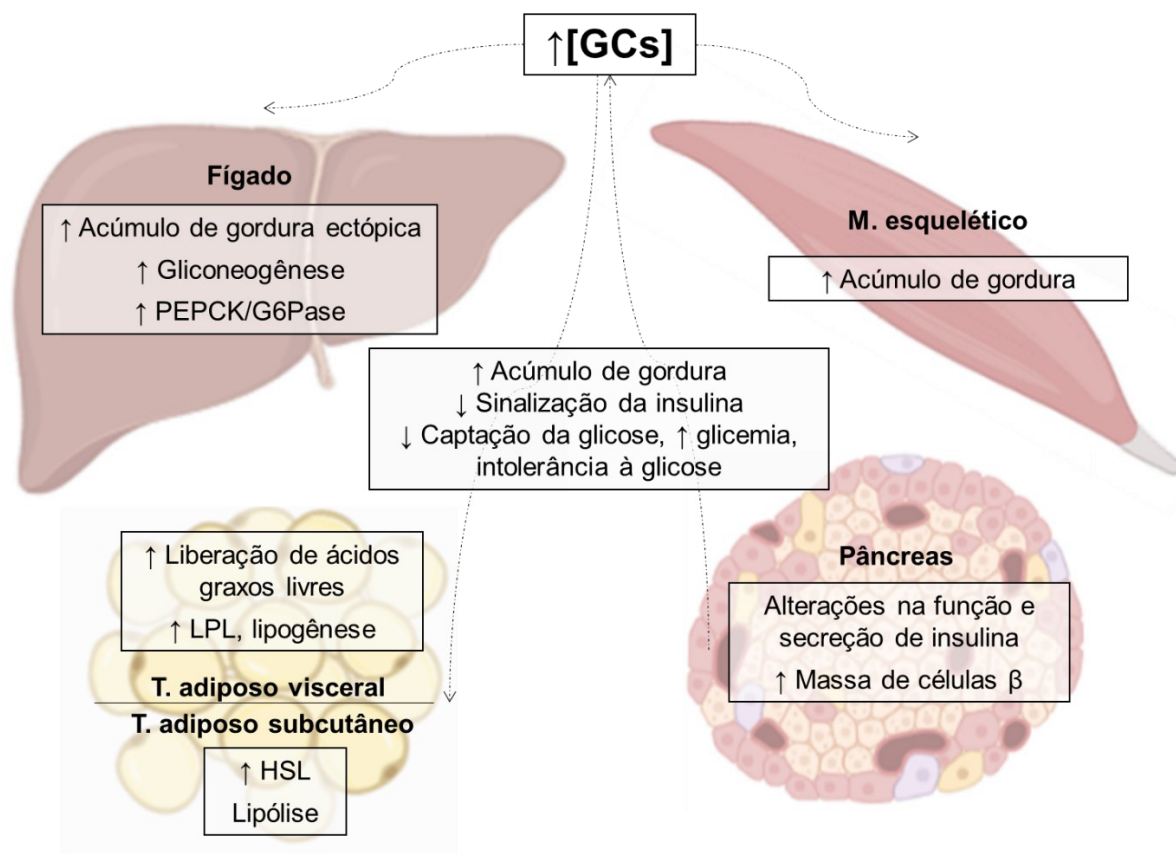
A elaboração de protocolos crônicos para investigações de mecanismo de ação de GCs em humanos é impossibilitado considerando o elevado risco de desenvolvimento de efeitos adversos irreversíveis (RAFACHO, A; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, 2012; VAN RAALTE; OUWENS; DIAMANT, 2009). Portanto, são realizados ensaios experimentais (com linhagens celulares e/ou roedores) para investigar desfechos metabólicos desenvolvidos a partir da administração de GCs. O impacto da administração de dexametasona na homeostase glicêmica de roedores está consolidado e esse fármaco é utilizado como modelo experimental de resistência à insulina e intolerância à glicose (ANGELINI et al., 2010; BURÉN et al., 2008; KORACH-ANDRÉ et al., 2005; PASIEKA; RAFACHO, 2016; RAFACHO et al., 2008, 2014; RAFACHO, A; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, 2012; RAFACHO; C.; ORTSATER, 2012) e a magnitude dos efeitos negativos sobre a homeostase glicêmica é dependente da idade e do sexo dos animais (DOS SANTOS et al., 2014; STOPA et al., 2019).

Acredita-se que a maioria desses efeitos observados ocorra por mecanismos de transativação gênica (RHEN; CIDLOWSKI, 2005) aumentando, por exemplo, a transcrição de genes como das enzimas fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase), envolvidas no processo de gliconeogênese hepática (JITRAPAKDEE, 2012). Ainda, há a redução da captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo e, portanto, a exposição crônica a essa classe pode resultar em hiperglicemia (KUO; HARRIS; WANG, 2013). Em resposta ao contexto de resistência à insulina induzido pelo GC é possível observar um aumento compensatório na massa e a função secretória das células  $\beta$  pancreáticas (RAFACHO et al., 2014; RAFACHO, A; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, 2012; RAFACHO; C.; ORTSATER, 2012).

A administração de GCs também pode influenciar o metabolismo lipídico. O efeito lipolítico de GCs no tecido adiposo resulta na liberação de glicerol e ácidos graxos livres (AGL) na circulação sanguínea (XU et al., 2009). Esses AGL podem ser realocados no compartimento visceral ou órgãos periféricos como o músculo esquelético ou fígado e armazenados na forma de triglicerídeos (gordura ectópica) (MASSART; ZIERATH; CHIBALIN, 2014; PASIEKA; RAFACHO, 2016). Também

induzem a diferenciação de células estromais em adipócitos, contribuindo para adipogênese, podendo culminar em aumento da adiposidade. O aumento da expressão de proteínas como a acetil-CoA carboxilase (ACC) e ácido graxo sintetase (Fas) ativam vias de lipogênese *de novo*, resultando em hipertrofia de adipócitos pré-existentes (URBANET et al., 2010). Portanto, os GCs são considerados moléculas lipolíticas e adipogênicas, e esses desfechos podem ser associados ao desenvolvimento de síndrome metabólica e resistência à insulina. Um resumo dos principais desfechos metabólicos dos GCs está representado na Figura 2.

O estabelecimento de efeitos indesejados no metabolismo glicêmico e lipídico não é exclusivo de fármacos administrados por vias sistêmicas. Um estudo desenvolvido por Suissa e colaboradores (2010) acompanhou 388 mil pacientes com doença respiratória e tratados com GCs inalatórios durante 10 anos. Dentre eles, 30 mil pacientes (aproximadamente 8%) desenvolveram DM2 em 5,5 anos e 2 mil pacientes que já eram diabéticos no início do estudo progrediram do uso de medicações orais para a insulino terapia. Com isso, o uso de GCs inalatórios como a fluticasona (dose equivalente a 1 mg/dia) foi associado a um aumento no desenvolvimento ou na progressão do DM2 (SUISSA; KEZOUH; ERNST, 2010).



**Figura 2. Efeitos dos GCs no metabolismo glicêmico e lipídico**

GCs: glicocorticóides; PEPCK: fosfoenol piruvato carboxicinase; G6Pase: glicose 6 fosfatase; LPL: lipoproteína lipase; HSL: lipase sensível a hormônio; Imagem produzida a partir de Biorender.com Adaptado de RAFACHO et al., 2014.

Considerando que os efeitos indesejados da terapia com GCs são fatores limitantes para o uso desses potentes fármacos anti-inflamatórios, há uma corrida para o desenvolvimento ou achado de moléculas com as ações clássicas dos GCs, mas com efeitos adversos reduzidos, quando comparados aos GCs já disponíveis na clínica.

#### 1.4 BUSCA POR MOLÉCULAS ALTERNATIVAS

Atualmente têm sido priorizadas as modificações estruturais de moléculas de GCs e o desenvolvimento de novos compostos promissores, visando a otimização da relação benefício/risco ao paciente. Algumas alterações estruturais visando redução dos efeitos mineralocorticóides, além do desenvolvimento de formulações para administrações mais localizadas (inalatória, tópica, intra-articular) já foram desenvolvidas de forma bem-sucedida. Contudo, os efeitos adversos, principalmente relacionados ao metabolismo da glicose e lipídeos, continuam comprometendo a qualidade de vida de pacientes que utilizam essa classe terapêutica em doses



elevadas ou por períodos prolongados. Uma abordagem chave para o tratamento com o GC é reduzir a dose a ser administrada, a fim de reduzir os efeitos adversos de acordo com o princípio “o quanto for necessário, mas o mínimo possível” (BUTTGEREIT et al., 2004).

Nesse sentido, os esforços estão centrados no uso de GCs que apresentem mais benefícios do que riscos, especialmente nos casos em que os GCs são as únicas opções de tratamento. As diretrizes que preconizam o uso clínico de GCs em procedimentos/tratamentos fazem referência as doses ideais utilizadas; além de trazerem recomendações sobre o monitoramento de efeitos adversos, estratégias de prevenção e/ou gerenciamento destes eventos (SMOLEN et al., 2017).

Dentre as estratégias que vem sendo desenvolvidas com o objetivo de reduzir efeitos indesejados, encontra-se os GCs lipossomais de longa circulação. Sabe-se que nanocarreadores extravasam pela vasculatura do tecido inflamado e são captados por células inflamatórias, principalmente macrófagos. Com isso, essas formulações podem ser empregadas para modificar a biodisponibilidade de fármacos nelas carregados pois acumulam diretamente no local da inflamação, aumentando localmente a concentração de GCs (PRASAD; O'MARY; CUI, 2015; YANG et al., 2017). Essas formulações visam melhorar o risco-benefício, reduzindo a prevalência e gravidade dos efeitos terapêuticos sem perder a eficácia. Algumas formulações já estão disponíveis na prática clínica, enquanto outras estão em via de desenvolvimento e sendo testadas em animais (Tabela 3).

A segunda estratégia para a busca por um GC com menos efeitos adversos se baseia na teoria farmacológica que os GCs exercem efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores por reduzirem a expressão de genes pró-inflamatórios (transrepressão gênica), enquanto os efeitos adversos ocorrem devido a ativação gênica via ligação aos GREs (transativação gênica). Portanto, vem sendo desenvolvidas moléculas denominadas agonistas tendenciosos ou agonistas seletivos de receptores de glicocorticoides (do inglês *selective glucocorticoid receptor agonists*, SEGRAs). Essas moléculas causam alterações conformacionais no GR, levando a uma preferência de interação GR-proteína e menor interação entre GR-DNA (RHEN; CIDLOWSKI, 2005; STAHN et al., 2007). Consequentemente, a vantagem dessas é a capacidade de induzir transrepressão gênica, enquanto a indução de transativação é insignificante. Essas moléculas promissoras podem ter a eficácia de dosagens mais

altas, mas o perfil de segurança de dosagens mais baixas de GCs convencionais (BELVISI et al., 2001).

Os primeiros SEGRAs desenvolvidos (RU 24782, RU 24858 e RU 40066) se apresentaram promissores *in vitro*, mas não alcançaram os objetivos quando estudados *in vivo* (BELVISI et al., 2001). No entanto, nos últimos anos, um número crescente de SEGRAs vêm sendo desenvolvidos (Tabela 2).

SEGRAs são substâncias promissoras e podem ser introduzidas na clínica em breve, mas estudos que garantam sua segurança precisam ser finalizados e destaca-se que estudos com animais não garantem eficácia na complexa situação da doença humana. Ainda, alguns dos efeitos benéficos do GC são mediados por via de transativação (síntese de moléculas anti-inflamatórias), por isso pode-se supor que os SEGRAs, ao agir “exclusivamente” via transrepressão podem não atingir o a ação anti-inflamatória observada com o uso de GCs convencionais.

**Tabela 2. Desenvolvimento de formulações contendo GCs, SEGRAs e ligantes de GRs**

Classificação	Molécula	Fase de estudo	Referência
Lipossomas	Prednisolona fosfato em lipossomas	Modelo animal	(METSELAAR et al., 2004; ULMANSKY et al., 2012)
	Nano-lipossomas contendo GCs		(MOALLEM et al., 2016)
	Metilprednisolona em lipossomas		(VAN DER GEEST et al., 2015)
	Prednisolona em lipossomas	Fase 2	(HOFKENS et al., 2011)
SEGRAs	RU24858	Descontinuado	(SCHÄCKE et al., 2009; VAYSSIÈRE et al., 1997)
	PF-00251802	Descontinuado após fase 2*	(BAIULA; SPAMPINATO, 2014; CAVET et al., 2013; SPINELLI et al., 2014)
	PF-04171327		(HU et al., 2011)
			(CONRADO et al., 2016)

\*Os resultados obtidos a partir dos estudos ainda não foram publicados, mas o estudo foi descontinuado SEGRAs: agonistas seletivos de receptores de glicocorticoides, estudos obtidos a partir de <http://clinicaltrials.gov>

A terceira estratégia desenvolvida na tentativa de minimizar tais efeitos colaterais, foi o desenvolvimento de uma nova geração de GCs que exibem não só potência terapêutica aumentada, mas também taxas de depuração mais rápidas da circulação sistêmica (AUSTIN et al., 2002). Nessa geração encontram-se o propionato

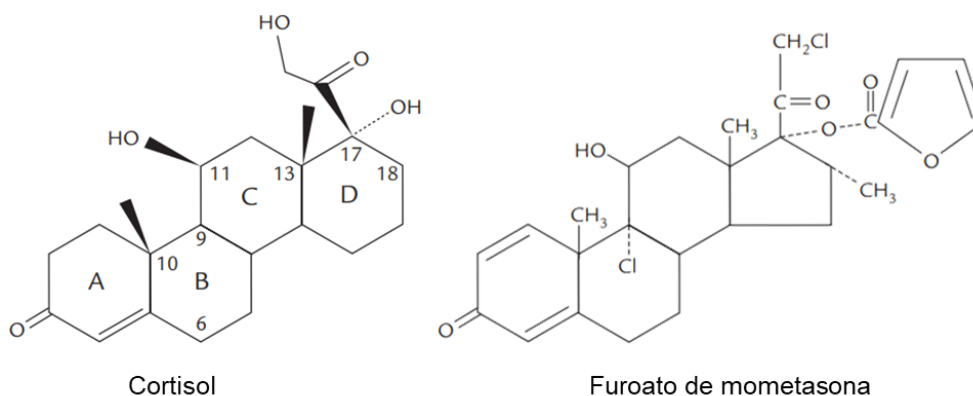
de fluticasona (JOHNSON, 1998) e o furoato de mometasona (FM) (FISH et al., 2000). Ambos vêm sendo amplamente utilizados em formulações intranasais e inalatórias para tratar processos inflamatórios do trato respiratório (AUSTIN et al., 2002).

### 1.5 FUROATO DE MOMETASONA

O FM é utilizado na clínica em formulações de administração tópica para o tratamento de dermatoses (dermatite atópica, seborreica, psoríase) e distúrbios inflamatórios alérgicos das vias aéreas (asma, bronquite, rinite alérgica) devido sua atividade anti-inflamatória, antipruriginosa e vasoconstritora (AUSTIN et al., 2002; BOURKE; COULSON; ENGLISH, 2009; MADAUSS et al., 2004).

A estrutura química do FM é semelhante ao cortisol, mas alterações foram realizadas para aumentar a afinidade da molécula por GR (Figura 3). Estudos de estrutura-atividade demonstram que um grupo metil no carbono C16 resultou em aumento da seletividade para o receptor mineralocorticoide, e a ligação dupla na posição 1,2 no anel A levou ao aumento da atividade GC (BODOR; BUCHWALD, 2006). A fração furoato na posição 17 também é responsável pelo aumento da afinidade por GR e a presença de grupo halogênio (POPPER et al., 1987).

Valotis e Högger (2004) utilizaram ressecções de pulmões de humanos para determinar a afinidade relativa do FM e seu metabólito majoritário (6 $\beta$ -hidroxi FM) ao receptor GR. Foi demonstrado que o FM e o 6 $\beta$ -hidroxi FM apresentam uma afinidade relativa ao receptor (constante calculada a partir da afinidade de dexametasona ao GR) de 2244 e 206, enquanto a afinidade da dexametasona é ao GR é 100 (VALOTIS; HÖGGER, 2004). Apesar da elevada afinidade ao receptor GR, a relevância de 6 $\beta$ -hidroxi FM na clínica ainda não está estabelecida.



**Figura 3. Estrutura química do cortisol e FM.**

Adaptado de HOCHHAUS, 2008.

Além das ações em GR, FM também apresenta afinidade por receptor de progesterona, de mineralocorticoide e receptor Farnesoid X (FXR) (AUSTIN et al., 2002; BIJSMANS et al., 2015). O FXR é um receptor nuclear envolvido na melhora de aspectos metabólicos relacionados a homeostase glicêmica e lipídica pois sabe-se que sua ativação controla a absorção intestinal de colesterol da dieta (LAMBERT et al., 2003), modula o metabolismo de lipoproteína de alta densidade (HDL) (KOK et al., 2003) e já foi descrito que a deficiência de FXR leva à redução da tolerância à glicose e resistência à insulina (LEFEBVRE et al., 2009). Além da modulação de fatores metabólicos, FXR apresenta ação anti-inflamatória por reduzir a atividade de NF- $\kappa$ B (WANG et al., 2008). Bijsmans e colaboradores (2015) concluíram através de ensaios com luciferase que o FM é um potencial agonista de FXR com ação anti-inflamatória e menor efeito metabólico, quando utilizados sistemicamente. Porém, ainda não existem estudos comprovando sua ação anti-inflamatória quando administrado por outras vias, que não tópicas.

Apesar do FM não ser utilizado na clínica por vias sistêmicas, Affrime e colaboradores (2000) desenvolveram um estudo de farmacocinética em 24 indivíduos saudáveis, no qual compararam uma administração por inalação oral utilizando dois dispositivos comercializados e uma injeção intravenosa (iv) de FM (400  $\mu$ g). Após 25 min da administração iv de FM em humanos, foi atingida a concentração máxima de fármaco no plasma, o  $t_{1/2}$  foi de 4,45 h, e concentrações de FM foram detectadas até 8 h após a administração. Já quando administrado por via inalatória, a concentração de FM plasmático está abaixo do limite de detecção do método utilizado (50 pg/ml) (AFFRIME et al., 2000). Estudos demonstraram que a administração tópica de FM, seja por via dérmica ou inalatória, resulta em uma exposição sistêmica de FM insignificante, com biodisponibilidade muito baixa (<1%) (AFFRIME et al., 2000; ONRUST; LAMB, 1998; PRAKASH; BENFIELD, 1998). Portanto o FM é considerado um fármaco seguro e com baixo risco de desenvolvimento de efeitos adversos relacionados ao uso prolongado de GCs e a supressão do eixo HHA, quando administrado por vias dérmica, intranasal ou inalatória (IKEDA et al., 2019; SPADA; BARNES; GREIVE, 2018).

A baixa biodisponibilidade de FM quando administrado pela via inalatória se deve ao metabolismo hepático através de enzimas citocromo P450 3A4 após a absorção pelos tratos respiratório (inspiração) e gastrointestinal (decorrente da deglutição paralela a inspiração) (AFFRIME et al., 2000). O metabólito majoritário

formado é o 6 $\beta$ -hidroxi FM, o qual também exhibe afinidade por GR, sendo considerado um metabólito ativo (TENG; DAVIES; CUTLER, 2003; VALOTIS; HÖGGER, 2004).

## 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Mesmo após décadas da introdução dos GCs sintéticos na prática clínica, esta classe de fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores segue sendo muito relevante e amplamente indicada no tratamento de inúmeras doenças, de dermatites a doenças autoimunes, como a artrite reumatoide. Em 2013, foi estimado que até 0,9% da população geral poderia estar submetida a alguma terapia baseada em GCs, esse percentual sobe para 2,5% nos indivíduos entre 70 e 79 anos de idade (KWON; HERMAYER; HERMAYER, 2013). A prescrição desses medicamentos ainda deve aumentar, como conclui um estudo clínico recente em que a dexametasona, um GC sintético de baixo custo, se mostrou eficaz em algum momento da terapêutica para pacientes graves com infecção pelo vírus SARS-CoV-2 (LEDFOORD, 2020).

Quando usado por um período prolongado, os efeitos adversos dos GCs podem superar os benefícios associados ao medicamento. Esses efeitos indesejados podem variar desde alterações metabólicas normalmente reversíveis com a interrupção do tratamento (i.e., hiperglicemia, dislipidemia, intolerância à glicose), à desfechos irreversíveis (i.e., diabetes pós-terapia imunossupressora). Como resultado, o uso de GCs na prática clínica é geralmente conduzido com cautela e o uso em longo prazo é desencorajado. Ainda, deve-se considerar as condições pré-existentes dos pacientes (ex., pacientes diabéticos) que podem torná-los mais vulneráveis aos efeitos adversos. Essa é a razão pela qual se busca encontrar ou produzir novas substâncias ou modificações estruturais nas moléculas dos GCs existentes visando aprimorar a ação anti-inflamatória ou imunossupressora sem que ocorra, ou ao menos que sejam atenuados os efeitos indesejáveis que impactam diretamente na qualidade de vida dos pacientes.

As observações iniciais apresentadas por Bijmans e colaboradores (2015) abrem um precedente para supor que essas expectativas sejam encontradas no FM. Porém, não existem estudos abordando a utilização de FM por via sistêmica e seus possíveis efeitos adversos relacionados ao metabolismo glicêmico e lipídico. Assim, nossa pergunta central nesta tese é: Qual o impacto do tratamento sistêmico *in vivo* com o FM sobre a homeostase glicêmica e lipídica em ratos machos e fêmeas? Neste sentido, a hipótese deste trabalho é que o FM mantém o efeito anti-inflamatório quando administrado por vias sistêmicas em roedores, e não resulta em efeitos

adversos de mesma magnitude relacionados ao metabolismo de glicose e lipídeos como aqueles observados pela dexametasona.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades anti-inflamatórias do tratamento sistêmico com o FM e o seu impacto sobre desfechos metabólicos da homeostase glicêmica e lipídica de roedores, bem como avaliar se os eventuais desfechos são permanentes ou transitórios e se há envolvimento do receptor de glicocorticoides (GR).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o tratamento agudo com FM em doses distintas e vias de administração sistêmica (og, ip ou sc) preserva a ação anti-inflamatória mediante o modelo de peritonite induzido por carragenina em ratos e ratas e, a partir disto, selecionar as doses mais relevantes para dar sequência nos demais objetivos.

- Avaliar a ação anti-inflamatória de FM administrado por 7 dias pela via oral em modelo subcrônico de colite em camundongos.

- Avaliar se o tratamento com o FM por 7 dias consecutivos em ratos e ratas exerce algum efeito sobre os seguintes parâmetros:

i) Parâmetros murinométricos (crescimento corpóreo, a ingestão alimentar e massa de órgãos);

ii) Homeostase glicêmica (glicemia e insulinemia em jejum, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina);

iii) Alterações pancreáticas (massa de células  $\alpha$  e  $\beta$  pancreáticas);

iv) Homeostase lipídica (triacilglicerol, colesterol total e colesterol HDL);

iv) Alterações hepáticas (conteúdo hepático de gordura, glicogênio, morfologia do tecido e marcadores bioquímicos de função: alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase - AST);

- Avaliar se eventuais desfechos metabólicos são permanentes ou transitórios após a interrupção do tratamento;

- Investigar se a ação anti-inflamatória de FM e possíveis desfechos metabólicos são dependentes da ativação de GR.

- Desenvolver e caracterizar uma nanopartícula de zeína contendo FM para controlar a liberação do fármaco e avaliar a permeabilidade em modelo com células intestinais.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Os protocolos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos para o uso de animais de experimentação preconizados nas diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com o número de protocolo 5012250518.

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos e fêmeas provenientes do Biotério Central da UFSC com aproximadamente 30 dias de vida. Os animais foram separados por sexo e de maneira randomizada alocados em caixas coletivas (50 x 30 x 10 cm), contendo 5 animais/caixa para fêmeas e 4 animais/caixa para machos. Ao atingirem 90 dias de vida, os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos experimentais, para início dos protocolos. No experimento de colite induzida por DSS, foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*) machos, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da UFSC com aproximadamente 30 dias de vida. Ao atingirem 60 dias de vida, os camundongos foram divididos aleatoriamente nos grupos experimentais, sendo 5 animais/caixa.

Todos os animais foram mantidos em biotérios destinados a cada espécie, em gaiolas coletivas cobertas de serragem e em ambiente com temperatura controlada ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo de iluminação claro/escuro de 12 horas (luz acesa entre 06:00 e 18:00), tratados com ração comercial padrão (Nuvilab®, Nuvital) e água *ad libitum*.

#### 4.1.1 Tamanho de amostra

O número de animais utilizados para cada grupo experimental e protocolo foi definido de acordo com o 'n' praticado nas publicações da área (BURÉN et al., 2008; KORACH-ANDRÉ et al., 2005; RAFACHO et al., 2008). A unidade experimental adotada foi de um animal.

### 4.2 DESENHOS EXPERIMENTAIS E ENSAIOS *EX VIVO*

Os desenhos experimentais e técnicas utilizadas (*in vivo* e *ex vivo*) foram elaborados com base em perguntas experimentais. Portanto será apresentada a

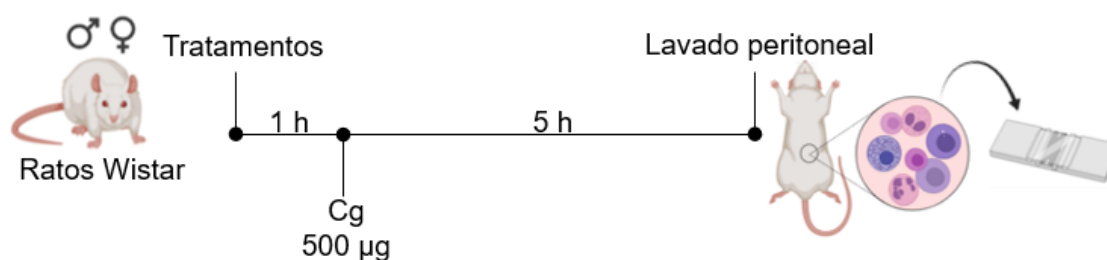
pergunta, seguida do desenho experimental e as técnicas utilizadas com o objetivo de responder as perguntas.

#### **4.2.1 Pergunta experimental 1: O tratamento sistêmico com FM previne processos inflamatórios em roedores?**

##### *4.2.1.1 Peritonite induzida por carragenina – modelo agudo*

O modelo agudo de peritonite induzida por carragenina em ratos foi utilizado com o objetivo de avaliar o efeito anti-inflamatório do tratamento sistêmico com FM e definir doses e vias de administração do fármaco. O veículo (óleo de milho) utilizado para dissolver o FM foi aplicado nos animais controles e a dexametasona (Decadron®) foi utilizada como controle positivo. Os ratos (machos e fêmeas) foram divididos randomicamente em 12 grupos por sexo e receberam os seguintes tratamentos (n=6-10 animais/grupo): os grupos controle (CTL) e controle carragenina (CG) receberam óleo de milho - 1 ml/kg de massa corpórea (mc), intraperitoneal (ip); A dexametasona (Decadron®, fosfato dissódico de dexametasona, Aché laboratórios farmacêuticos S.A.), diluída em solução salina, foi administrada nas doses de 1,0 mg/kg pela via ip (DEX 1.0 ip) ou orogástrica (og) (DEX 1.0 og) e de 2 mg/kg ip (DEX 2.0 ip) ou og (DEX 2.0 og). O FM (doação de Aché), diluído em óleo de milho, foi administrado por via oral nas doses de 0,1 (FM 0.1 og), 0,3 (FM 0.3 og), 1,0 (FM 1.0 og) ou 3,0 (FM 3.0 og) mg/kg; e 1 mg/kg pelas vias ip (FM 1.0 ip) ou subcutânea (sc) (FM 1.0 sc).

Sessenta minutos após os tratamentos, os ratos receberam uma injeção de carragenina (500 µg/cavidade dissolvidos em 800 µl de solução salina 0,9%, ip). O grupo controle recebeu apenas 800 µl de solução salina. Cinco horas após a injeção de carragenina, os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina (10/100 mg/kg mc ip, respectivamente) e eutanasiados por guilhotina. Imediatamente após a eutanásia, foram injetados 10 ml de tampão PBS/EDTA 2 mM na cavidade peritoneal para a lavagem local e posteriormente realizada a coleta deste fluido para contagem de células. O aspirado foi centrifugado (1000×g, 5 min, a 21°C) e o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 ml de solução salina (Figura 4). A contagem celular em câmara de Neubauer foi realizada após diluição do fluido em solução de Turk (1:20) e os resultados foram expressos como média de leucócitos totais/ml (GRISWOLD et al., 1987).



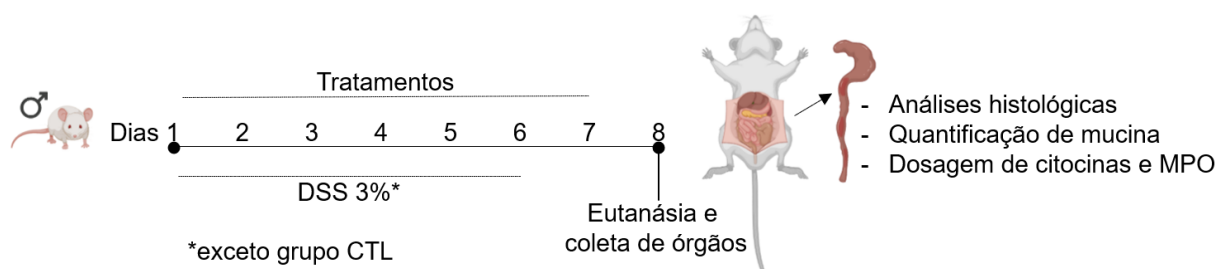
**Figura 4. Desenho experimental do modelo de peritonite induzida por carragenina**

Cg: carragenina; Imagem produzida a partir de Biorender.com

#### 4.2.1.2 Colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS) em camundongos – modelo subcrônico

O modelo de colite induzida por DSS em camundongos foi utilizada com o objetivo de se consolidar o efeito anti-inflamatório do FM quando administrado por via oral, por um período subcrônico. Os tratamentos foram realizados diariamente, entre as 8:00 e 9:00 h, por 7 dias consecutivos. Para tal, os camundongos foram divididos randomicamente em 4 grupos e receberam os seguintes tratamentos (n=8 animais/grupo): os grupos naive e controle DSS (CTL) receberam óleo de milho 1 ml/kg mc og enquanto os grupos DEX e FM receberam os fármacos na dose 1,0 mg/kg og.

Simultaneamente aos tratamentos, os animais receberam DSS 3% (Alfa Aesar, Heysham, Lancashire, UK. MW: 40,000) dissolvido em água, *ad libitum*, durante 6 dias para indução da colite. O grupo naive recebeu água sem DSS. No 7º e 8º dias de experimento todos os grupos receberam apenas água (Figura 5).



**Figura 5. Desenho experimental do modelo de colite induzida por DSS em camundongos**

DSS: dextran sulfato de sódio; CTL: grupo controle; MPO: mieloperoxidase  
Imagem produzida a partir de Biorender.com

A avaliação dos danos no modelo experimental, bem como dos efeitos anti-inflamatórios foi realizada por critérios estabelecidos em pontuação (Tabela 4), denominados índice de atividade da doença (IAD), pelas alterações do comprimento (cm) do cólon, alterações histológicas e pela determinação de parâmetros inflamatórios descritos a seguir (CHASSAING, AITKEN, MALLESHAPPA, 2013). O critério de ponto final estabelecido para este protocolo foi a perda de peso maior que 20% do peso inicial.

**Tabela 3. Pontuação para cálculo do IAD**

Pontuação	Consistência das fezes	Sangramento retal
0	Normal	Ausente
2	Fezes amolecidas	Ausente
3	Fezes amolecidas	Presença de sangue visível
4	Diarreia	Muito sangramento

Os animais foram eutanasiados com isoflurano no 8º dia de experimento, e o fígado, baço e as adrenais foram coletados para verificação das respectivas massas. O cólon dos animais foi coletado para verificação da massa e comprimento, e amostras representativas (0,5 cm de comprimento) foram processadas para posterior análises bioquímicas (determinação de citocinas, quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase) e histológicas (morfologia).

#### 4.2.1.3 Determinação de citocinas por citometria de fluxo

As amostras de cólon (100–150 mg) foram homogeneizadas em solução de lise celular a 4°C (Cell Signaling) em ultraturrax (IKA®) por 3 séries de 15 segundos cada. Posteriormente foram centrifugados a 14.000xg por 30 min a 4°C (Eppendorf 5804R). A quantificação proteica total do lisado foi realizada pelo método de Bradford, de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad).

Os níveis de citocinas (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IFN- $\gamma$  e IL12-p70) foram detectados a partir do homogenato de cólon através da técnica de detecção de *beads* por citometria de fluxo (BD Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit – CBA, BD Biosciences). Brevemente, 25  $\mu$ l dos mix de *beads* de captura foram incubados com 50  $\mu$ l das amostras (contendo 12  $\mu$ g/ $\mu$ l de proteína) e 25  $\mu$ l do reagente de detecção PE. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 2 h no escuro, e centrifugadas em 200xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet de beads ressuspendido em tampão de lavagem. A fluorescência foi detectada no citômetro BD

FACSCanto II (BD Biosciences). Os dados foram calculados utilizando o software FCAP Array v3.0 (BD Biosciences), utilizando como referência a curva padrão fornecida no kit. A concentração das citocinas no homogenato de cólon foi expressa como pg/mg de tecido.

#### *4.2.1.4 Quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em cólon*

Fragmentos de cólon (100–150 mg) foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4). Após centrifugação (13000 x g, 10 min, 4°C), o sobrenadante foi removido e o pellet suspenso em 1 ml de tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (0,5% em tampão fosfato 50 mM, pH 6) para liberar a enzima dos grânulos. Em seguida, o sobrenadante foi obtido novamente por centrifugação (13000 x g, 10 min, 4°C). A reação foi realizada em uma placa contendo 96 poços pela adição de 30 µl de sobrenadante, 180 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (concentração final na placa 0,3 mM) diluído em tampão fosfato 80 mM (pH 5,4) e 20 µl de 3, 3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (concentração final na placa 1,6 mM) dissolvida em DMSO. A atividade da enzima MPO foi medida por oxidação dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e TMB por 10 min a 37°C com auxílio de leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO, Mannedorf, Suíça) e a densidade óptica (650 nm) foi medida a cada 1 min. A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) e a atividade da MPO foi expressa em unidades de densidade óptica (OD)/mg de proteína.

#### *4.2.1.5 Preparo do material e análise histológica do cólon*

Um fragmento de cólon foi removido, lavado com solução salina e fixado em formalina tamponada 10% por 48 horas. Após, o material foi lavado com água corrente e lavado em etanol 70% e submetido a sucessivas lavagens de 30-60 minutos em etanol em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) e xilol, para posterior inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em seções de 5 µm (Microtomo Leica RM2255) e as seções foram depositadas em lâminas e submetidas a desparafinização e posterior coloração de hematoxilina e eosina (HE). As imagens representativas foram obtidas em microscópio Opticam 0400S (OP TICAN INC.; São Paulo, SP, Brasil), com ampliação de 10x e 400x.

#### 4.2.2 Pergunta experimental 2: O tratamento sistêmico com FM influencia a homeostase glicêmica e lipídica de ratos?

Para execução deste protocolo experimental foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas. Os animais foram aclimatados por 60 dias no biotério setorial do LIDoC até completarem 90 dias de vida e serem divididos randomicamente em grupos experimentais (n = 8-10 animais/grupo).

##### Grupos experimentais de machos:

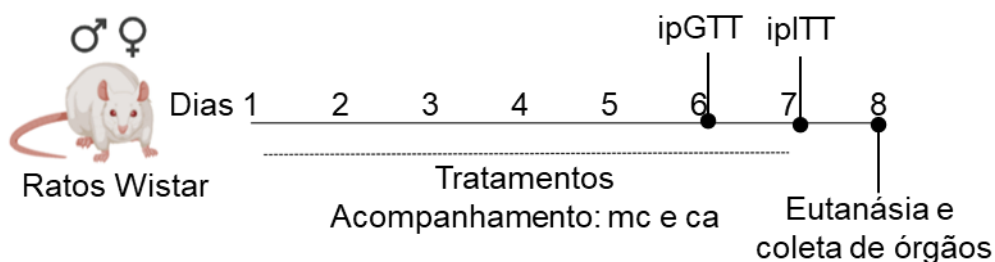
- 1) CTL salina: tratados com solução salina 0,9% (1 ml/kg mc ip, veículo utilizado para dissolver a dexametasona);
- 2) DEX ip: tratados com dexametasona (1 mg/kg mc, ip);
- 3) DEX og: tratados com dexametasona (1 mg/kg mc, og);
- 4) CTL óleo: tratados com óleo de milho (1 ml/kg mc og, veículo utilizado para dissolver o FM);
- 5) FM 0.1 ip: tratados com FM (0,1 mg/kg mc ip);
- 6) FM 1.0 ip: tratados com FM (1,0 mg/kg mc ip);
- 7) FM 0.1 og: tratados com FM (0,1 mg/kg mc og);
- 8) FM 1.0 og: tratados com FM (1,0 mg/kg mc og);

##### Grupos experimentais de fêmeas:

- 1) CTL óleo: tratados com óleo de milho (1 ml/kg mc og, veículo utilizado para dissolver o FM);
- 2) FM 1.0 ip: tratados com FM (1,0 mg/kg mc ip);
- 3) FM 1.0 og: tratados com FM (1,0 mg/kg mc og);

Os tratamentos foram realizados durante 7 dias consecutivos entre 08:00 e 09:00 da manhã em animais alimentados, com exceção dos dias 6 e 7, nos quais os animais foram tratados após o teste de tolerância a glicose (ipGTT) e teste de tolerância a insulina (ipITT), respectivamente (Figura 7).

A dexametasona foi utilizada como controle positivo e a dose utilizada foi baseada em trabalhos anteriores (RAFACHO et al., 2008, 2009, 2010, 2011; RAFACHO, A; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, 2012), os quais comprovaram que após cinco dias, os roedores tornam-se resistentes à insulina, intolerantes à glicose e apresentam quadro de hiperinsulinemia, dislipidemia, hiperglucagonemia, bem como aumento da massa de células  $\beta$ .



**Figura 6. Desenho experimental: impacto do tratamento com FM no metabolismo glicêmico e lipídico de ratos machos e fêmeas**

ipGTT: teste de tolerância a glicose; ipITT: teste de tolerância a insulina; mc: massa corpórea; ca: consumo alimentar.

#### 4.2.2.1 Análise da massa corpórea e ingesta alimentar

A massa corpórea dos animais foi analisada a partir de dois dias antecedentes ao início do tratamento e diariamente durante todo o protocolo experimental, com auxílio de balança eletrônica digital (TECNAL). Os resultados foram expressos em % de massa corpórea, normalizados a partir da massa do dia 0. A ingestão alimentar foi verificada a partir de dois dias antes do início do tratamento e nos dias consecutivos de tratamento até o dia da eutanásia. A ingestão foi determinada pela pesagem da ração remanescente (não ingerida) descontada do total daquela depositada no dia anterior. A fórmula utilizada para esse cálculo foi  $[(\text{total de ração ingerida na caixa (g)}/\text{número de animais por caixa}/\text{peso de cada animal (g)}) \times 100]$  e o resultado foi expresso % de ração ingerida normalizada a partir do dia 0.

#### 4.2.2.2 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT)

O ipGTT foi realizado no sexto dia de tratamento após um jejum de 8 h (das 06:00 às 15:00) em animais acordados não anestesiados. Os animais tiveram sua glicemia aferida (tempo 0) com auxílio de glicofitas (AccuChek®) a partir de sangue coletado pela ponta da cauda e em seguida receberam a administração intraperitoneal de solução de D-glicose 50% (m/v) em solução salina 0,9% a 37°C (2 g/kg mc, ip). A glicemia novamente foi aferida nos tempos 30, 60 e 120 minutos após a administração da sobrecarga de glicose (MOTTA et al., 2018; RAFACHO et al., 2014a; RAFACHO, A; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, 2012; RAFACHO; C.; ORTSATER, 2012). A área-sob-a-curva de glicose sanguínea (AUC) foi realizada a partir de valores basais (min 0) normalizados (descontados), o que equivale a área incremental. Os tratamentos farmacológicos do sexto dia foram realizados após o término do ipGTT para evitar efeito agudo do GC sobre o resultado do teste.

#### 4.2.2.3 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT)

O ipITT foi realizado no sétimo dia do protocolo experimental (15:00 horas) em animais acordados, alimentados e não anestesiados. Os animais tiveram sua glicemia aferida (tempo 0) como descrito para o ipGTT e em seguida receberam a administração intraperitoneal de solução de insulina 2 UI/kg de mc (Insulina Humalog Regular - Lilly® 100 UI/ml), diluída em solução salina 0,9% a 37°C. Amostras de sangue subsequentes foram coletadas para mensuração da glicemia nos tempos 10, 20, 40 e 90. A constante de decaimento de glicose (kITT) foi calculada a partir dos valores de glicose log-transformados entre 0 e 40 min (DOS SANTOS et al., 2014; GOMES et al., 2019; PROTZEK et al., 2016; RAFACHO et al., 2010, 2011; RAFACHO, A.; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, 2012; SANTOS et al., 2021). Os tratamentos farmacológicos do sétimo dia foram realizados após o término do ipITT evitar efeito agudo do GC sobre o resultado do teste.

#### 4.2.2.4 Eutanásia e coleta de tecidos

Os animais foram eutanasiados no oitavo dia de protocolo experimental após 8 horas de jejum. A eutanásia foi realizada de acordo com a da Resolução Normativa CONCEA no 37, de janeiro de 2018, onde os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina, (10/100 mg/kg ip, respetivamente) e eutanasiados por decapitação em guilhotina para roedores, para coleta de sangue troncular. O sangue troncular foi coletado em tubos de ensaio de vidro contendo anticoagulante EDTA (Hemstab, Labtest®). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 800 x g por 10 min a 4 °C (Centrífuga Eppendorf 5810R) e o plasma foi armazenado em ultrafreezer -80 °C para posterior análises.

Os órgãos de interesse (pâncreas, fígado, tecido adiposo omental, gonadal e retroperitoneal, baço e adrenais) foram excisados e pesados em balança eletrônica analítica digital. Os pesos relativos dos tecidos foram calculados da seguinte maneira:  $(\text{peso do tecido}/\text{peso final do animal}) \times 100$ . Uma amostra de pâncreas e fígado foram processadas para posterior análise histológica e fragmentos de fígado foram armazenados em ultrafreezer -80 °C para análises descritas a seguir.



#### *4.2.2.5 Insulina plasmática*

A insulina plasmática foi determinada através do kit AlphaLisa® (AL204C, Perkin Elmer) de acordo com instruções dos fabricantes, a partir do plasma obtido da coleta de sangue troncular.

#### *4.2.2.6 Perfil lipídico*

O perfil lipídico foi analisado a partir do plasma obtido por centrifugação de sangue troncular coletado após decaptação dos ratos. As concentrações plasmáticas de colesterol total, lipoproteínas de alta de densidade (HDL) e triglicerídeos foram determinados de acordo com instruções do fabricante (LabTest®, Lagoa Santa, MG, Brasil) a 492 nm com auxílio de leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO, Mannedorf, Suíça).

#### *4.2.2.7 Função Hepática*

A função hepática foi determinada a partir da atividade enzimática da aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransferase (ALT) por meio do kit bioquímico (LabTest®, Lagoa Santa, MG, Brasil). A absorbância foi mensurada a 340 nm com auxílio de leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO, Mannedorf, Suíça).

#### *4.2.2.8 Gordura e glicogênio hepático*

Para quantificação da gordura hepática aproximadamente 100 mg de fígado foi homogeneizado (UltraTurrax, IKA®) em 700 µl de NaCl 1M seguido pela adição de 7,5 ml de solução metanol/clorofórmio (1:2, v/v). Após centrifugação, a fase metanólica foi coletada e o conteúdo de triglicerídeos foi dosado por espectrofotometria como descrito para o plasma (GOMES et al., 2019; RAFACHO et al., 2011).

Para a quantificação de glicogênio hepático, amostras do mesmo lóbulo hepático (300 a 500 mg) foram transferidas para tubos contendo KOH 30% e fervidas por 1 hora para completa digestão. Em seguida, foi adicionado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> às amostras. Em seguida, foi acrescentado Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e etanol e o material foi homogeneizado. Após centrifugação (800xg, 10 min), o sobrenadante (contendo lipídeos saponificados, aminoácidos) foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em água destilada quente. O conteúdo de glicogênio foi quantificado por espectrofotometria (absorbância 490 nm) em reação com reagente fenol e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (LO; RUSSELL; TAYLOR, 1970).

#### 4.2.2.9 Extração proteica e western blot

Após a eutanásia, fragmentos de tecido hepático foram removidos e homogeneizados em solução de lise celular a 4°C (Cell Signaling) em ultraturrax (IKA®) por 3 séries de 15 segundos cada. Posteriormente foram centrifugados a 14.000 x g por 30 min a 4°C (Eppendorf 5804R). A concentração proteica total do lisado foi realizada pelo método de Bradford, de acordo com as instruções do fabricante (Bio-Rad). Alíquotas de proteína total (100 µg) foram acrescidas em tampão Laemmli (Bio-Rad) contendo 10% β-mercaptoetanol na proporção 1:3, e posteriormente aquecidas a 70 °C por 8 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese (Mini Protean II, Bio-Rad) em gel de poliacrilamida 10%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Santa Cruz Biotechnology) na presença de 20% metanol e 1% SDS em voltagem constante de 120 V por 2 horas. O fragmento lisado por cada animal foi considerado como n=1. Depois de 1 hora de bloqueio com albumina 5%, membranas contendo lisado dos tecidos foram lavadas em TBST (solução basal) e incubadas por 14 horas a 4°C com anticorpos primários de interesse. Os anticorpos utilizados foram: anti-AKT total (1:1000), anti-AKT Ser473 (1:500) (1:500), anti-GR (1:500) (Santa Cruz Biotechnology), anti-β-actina (1:1000) (Cell Signaling), anti-PEPCK (1:1000), anti-CREB (1:1000) anti-GAPDH (1:1000). Depois de lavadas em TBST as membranas foram incubadas com anticorpo secundário apropriado em temperatura ambiente. O anticorpo ligado foi detectado por quimioluminescência pelo sistema de fotodocumentação Chemidoc MP (BioRad). A densitometria foi realizada pelo software ImageJ.

#### 4.2.2.10 Morfologia hepática

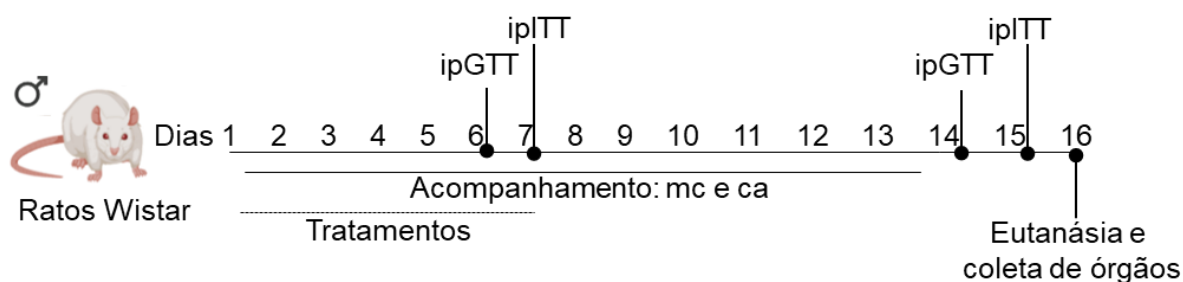
Para o estudo de aspectos morfológicos, foram coletados fragmentos de fígado e pâncreas (porção esplênica) e processados conforme descrito no item 4.2.1.5. As secções de fígado foram coradas com HE para verificação da presença de vacúolos de gordura e glicogênio. As imagens representativas foram obtidas em microscópio Opticom 0400S (OP TICAN INC.; São Paulo, SP, Brasil), com ampliação de 100x e 400x.

### 4.2.3 Pergunta experimental 3: Os desfechos metabólicos desenvolvidos a partir da administração intraperitoneal de FM são reversíveis após a interrupção do tratamento?

Com o objetivo de avaliar a reversibilidade dos efeitos metabólicos desenvolvidos após a administração sistêmica de FM, foram utilizados ratos Wistar machos randomicamente divididos em 3 grupos experimentais (n= 10 animais/grupo):

- 1) CTL óleo: tratados com óleo de milho (1 ml/kg mc, ip);
- 2) DEX ip: tratados com dexametasona (1 mg/kg mc, ip);
- 3) FM ip: tratados com FM (1,0 mg/kg mc, ip);

Os tratamentos e experimentos *in vivo* foram realizados nas mesmas condições descritas na Pergunta experimental 3. A fim de se analisar se os desfechos metabólicos desenvolvidos pela administração intraperitoneal de FM são revertidos após a interrupção do tratamento, estes animais foram mantidos por mais 10 dias sem receberem tratamentos, apenas a massa corporal e consumo alimentar foram acompanhados. O ipGTT foi realizado novamente no 14º dia após a interrupção do tratamento e o ipITT foi realizado no 15º dia (Figura 8). Os animais foram eutanasiados no 16º dia de protocolo experimental e os experimentos *ex vivo* (análises bioquímicas plasmáticas e hepáticas) foram executados conforme descrito anteriormente.



**Figura 7. Desenho experimental: manutenção dos desfechos metabólicos desenvolvidos em ratos após a interrupção do tratamento com FM**

ipGTT: teste de tolerância a glicose; ipITT: teste de tolerância a insulina; mc: massa corpórea; ca: consumo alimentar.

### 4.2.4 Pergunta experimental 4: O efeito anti-inflamatório e desfechos metabólicos desenvolvidos a partir da administração sistêmica de FM são dependentes da ativação de GR?

A pergunta experimental 5 foi proposta com o objetivo de avaliar o envolvimento de GR nos efeitos farmacológicos de FM. Para avaliar o envolvimento de GR na ação anti-inflamatória, a mifepristona (20 mg/kg mc, ip), um antagonista de

GR, foi utilizada como ferramenta farmacológica. Para tanto, ratos Wistar foram divididos randomicamente em 10 grupos e receberam os seguintes tratamentos (n=8 animais/grupo):

- 1) Grupo controle (CTL): óleo de milho, 1 ml/kg mc, ip;
- 2) Controle carragenina (CG): receberam óleo de milho, 1 ml/kg mc, ip
- 3) DEX ip: dexametasona 1,0 mg/kg mc ip;
- 4) MIFE / DEX ip: mifepristona 20 mg/kg mc ip e dexametasona 1,0 mg/kg mc ip;
- 5) DEX og: dexametasona 1,0 mg/kg mc og;
- 6) MIFE / DEX og: mifepristona 20 mg/kg mc ip e dexametasona 1,0 mg/kg mc og;
- 7) FM ip: furoato de mometasona 1,0 mg/kg mc ip;
- 8) MIFE / FM ip: mifepristona 20 mg/kg mc ip e furoato de mometasona 1,0 mg/kg mc ip;
- 9) FM og: furoato de mometasona 1,0 mg/kg mc og;
- 10) MIFE / FM og: mifepristona 20 mg/kg mc ip e furoato de mometasona 1,0 mg/kg mc og;

A mifepristona foi administrada 30 minutos antes dos tratamentos com DEX ou FM. Posteriormente os animais foram submetidos ao protocolo de peritonite induzida por carragenina, conforme descrito no item 4.3.1.1.

Para avaliar o envolvimento de GR nos efeitos metabólicos desenvolvidos após o tratamento com FM pela via ip, foram utilizados ratos Wistar divididos randomicamente em 6 grupos experimentais (n= 8 animais/grupo) e submetidos aos seguintes tratamentos:

- 1) CTL salina: solução salina 0,9% 1,0 ml/kg mc ip;
- 2) DEX ip: dexametasona 1,0 mg/kg mc, ip;
- 3) MIFE / DEX ip: mifepristona 20 mg/kg mc ip e dexametasona 1,0 mg/kg mc ip;
- 4) CTL óleo: óleo de milho 1 ml/kg mc ip;
- 5) FM ip: furoato de mometasona 1,0 mg/kg mc ip;
- 6) MIFE / FM ip: mifepristona 20 mg/kg mc ip e furoato de mometasona 1,0 mg/kg mc ip;

A mifepristona foi administrada diariamente 30 minutos antes dos tratamentos com DEX ou FM. Os tratamentos foram realizados durante 7 dias consecutivos entre

08:00 e 09:00 da manhã em animais alimentados, com exceção dos dias 6 e 7, nos quais os animais foram tratados após o ipGTT e ipITT. Os experimentos *ex vivo* (análises bioquímicas plasmáticas e hepáticas) foram executados conforme descritos na Pergunta experimental 2.

#### **4.2.5 Pergunta experimental 5: O desenvolvimento de uma formulação contendo FM aumenta a biodisponibilidade do fármaco quando administrado por via oral?**

A pergunta experimental 5 foi desenvolvida durante o período de doutorado sanduíche em colaboração com o prof. Bruno Sarmiento (Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, i3S, Porto – Portugal). A formulação contendo FM foi desenvolvida com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade do fármaco.

##### *4.2.5.1 Produção da nanopartícula (NP) de zeína contendo FM*

A NP de zeína contendo o FM foi produzida por técnica de nanoprecipitação conforme descrito anteriormente (NUNES et al., 2020). Brevemente, o FM foi dissolvido em 2 ml de uma solução de etanol 70% (v/v) contendo zeína (10 mg/ml, Sigma Aldrich, Sto. Louis, MO, USA). Essa solução foi agitada em placa magnética (300 rpm) durante 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução contendo FM e zeína foi adicionada à 10 ml de água contendo 0,5% de poloxamer P407 (Kolliphor® P 407, BTCEurope, Barcelona, Spain), sob agitação magnética (200 rpm), utilizando micropipeta de 1 ml. As NPs foram coletadas após 3 h de agitação magnética e concentradas por centrifugação (2000xg, 15°C) em filtro com corte de peso molecular de 100 kDa (Amicon Ultra filter, Ultracel membrane with 100,000 MWCO, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) até atingirem o volume final de 1 ml. Foram produzidas NPs com concentração teórica de FM de 5% e 10%, e NPs vazias, sem a presença de FM.

##### *4.2.5.2 Tamanho de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial Zeta e morfologia*

Logo após o desenvolvimento das formulações, as NPs contendo o FM ou NPs vazias foram diluídas em NaCl 10 mM (0,2 mg/mL – com pH ajustado para 4 com HCl 0,5 M) e caracterizadas quanto ao tamanho e distribuição de tamanho por espalhamento dinâmico de luz e o potencial Zeta foi determinado por eletroforese de laser Doppler (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As

medidas foram realizadas em triplicata e com temperatura controlada de 25°C (NUNES et al., 2020). A morfologia da superfície das NPs de zeína contendo FM ou NP vazia foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM, Jeol JEM 1400 Flash Electro Microscope). Para isso, as NPs foram dispersas em água e, em seguida, colocadas sobre grades revestidas de cobre. As grades foram secas em temperatura ambiente posteriormente analisadas com o TEM.

#### 4.2.5.3 Eficiência de associação e concentração de FM

A eficiência de associação (AE) e concentração de fármaco (*drug loading*, DL) das NPs de zeína contendo FM foram determinados por método direto. As NPs foram congeladas (-80°C), posteriormente liofilizadas e destruídas com a adição de 500 µl de DMSO. Posteriormente o conteúdo de FM presente na solução de NPs em DMSO foi quantificado por espectrofotometria, conforme descrito a seguir. Após a quantificação, o AE e DL foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$AE (\%) = \frac{\text{Quantidade inicial de FM} - \text{Quantidade de FM no filtrado}}{\text{Quantidade total de FM}} \times 100$$

$$DF (\%) = \frac{\text{Quantidade inicial de FM} - \text{Quantidade de FM no filtrado}}{\text{Quantidade de total de zeína} + \text{FM}} \times 100$$

#### 4.2.5.4 Quantificação de FM por espectrofotometria

A quantificação de FM em amostras foi analisada utilizando espectrofotômetro UV-Vis Lambda 35 (Perkin Elmer) e células de quartzo combinadas de 10 mm. O FM foi detectado numa faixa de comprimento de onda de 200 a 300 nm. Foi utilizada uma curva de calibração com FM (2,5 a 50 µg/ml, em HBSS 0,2% Tween 80I) e o limite de detecção do teste foi de 2,5 µg/ml.

#### 4.2.5.5 Estabilidade de NPs de zeína contendo com FM

NPs de zeína contendo FM foram armazenados a 4°C por 30 dias após seu desenvolvimento. Após este período, as amostras foram submetidas novamente as análises de tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta (NUNES et al., 2020).

#### 4.2.5.6 Liberação *in vitro* de FM a partir das NPs

A liberação *in vitro* de FM nas NPs de zeína foi avaliada utilizando membranas de diálise (Snakeskin dialysis tubing, 100000 MWCO, 35 mm de diâmetro). Para simular a liberação de FM em fluido gástrico, 1 ml de NPs 5%, 10% (correspondendo

a 1-2 mg de FM) ou FM livre foram adicionados a membranas de diálise e estas, dispostas em frascos contendo 15 ml de tampão fosfato pH 1,2. Amostras de 200 µl foram coletadas em diferentes tempos (15, 30, 45, 60, 90 e 120 min). Posteriormente, as membranas foram dispostas em novos frascos, contendo tampão que simula fluido intestinal (pH 6,8) e amostras foram coletadas em diferentes tempos (30, 60 min, 2, 4 e 6 h). O ensaio foi realizado ao longo de 8 h a 37°C e 120 rpm utilizando agitador incubador (controle IKA KS 4000 ic, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemanha). As amostras coletadas durante o experimento foram quantificadas utilizando UV como descrito no item “4.3.2.3 Quantificação de FM por espectrofotometria” e a % de liberação de fármaco foi calculada.

#### 4.2.5.7 *Linhagens celulares*

Foram utilizadas células epiteliais do cólon humano Caco-2 nas passagens de 30-40 e células epiteliais do cólon humano HT29-MTX nas passagens 40-60. As linhagens celulares foram mantidas em meio DMEM com ultraglutamina (Lonza, Vervieres, Bélgica) suplementada com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Biocrom GmbH, Berlim, Alemanha), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (BioWest, Nuaille, França), e 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais (Gibco, Paisley, UK).

#### 4.2.5.8 *Citotoxicidade in vitro*

O efeito NPs contendo FM e FM livre na viabilidade das linhagens celulares colorretais Caco-2 e HT29-MTX foi avaliado utilizando o corante brometo azul de triazolil tetrazólio (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Resumidamente, células Caco-2 e HT-29 MTX foram semeadas individualmente em placas de 96 poços contendo 20.000 células/poço para Caco-2 e 10.000 células/poço para HT29-MTX e incubadas por 24 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No dia do tratamento, foram realizadas diluições de FM em DMEM (a partir de uma solução mãe de FM 5 mg/ml em DMSO) e NPs 5% e 10% para obter concentração final de FM (0,1, 1, 10, 30, 50 e 100 µM). As células receberam os tratamentos e foram incubadas por 4 ou 24 h a 37°C 5% de CO<sub>2</sub>. Apenas DMEM (e a concentração equivalente de DMSO presentes na solução de 100 µM de FM) e 1% (v/v) de Triton X-100 foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. As amostras foram testadas em triplicata e em três experimentos independentes. Após 4 ou 24 h de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS pH 7,4 e 200 µl de solução de MTT (0,5 mg/ml em meio DMEM)

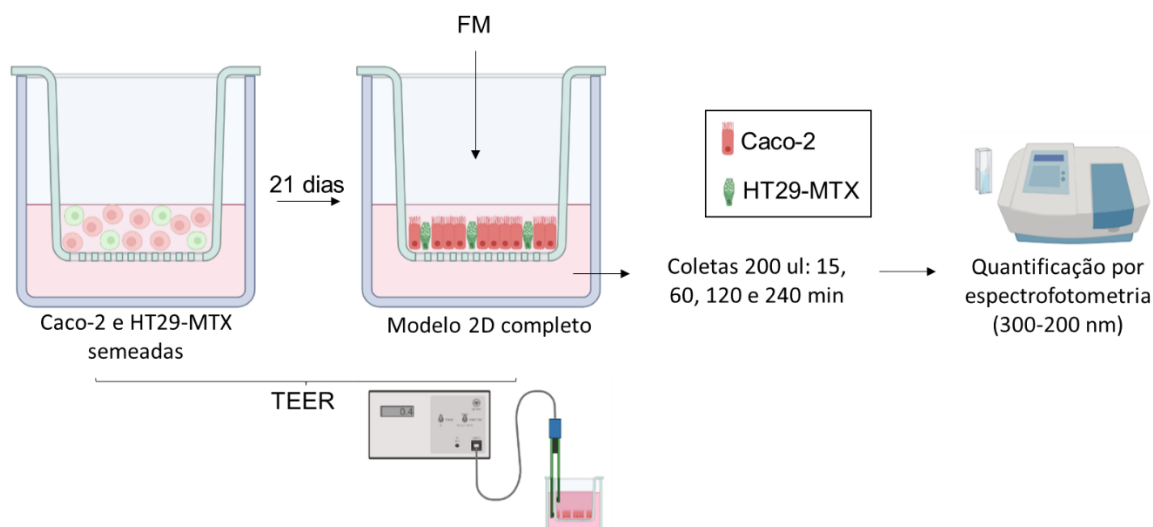
foram adicionados a cada poço e novamente incubados durante 4 h em abrigo de luz. A solução de MTT foi removida e 200 µl de DMSO foi adicionado para dissolver os cristais de MTT. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 570 e 630 nm. A viabilidade celular (%) foi calculada utilizando a equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Valor experimental} - \text{Controle negativo}}{\text{Controle positivo} - \text{Controle negativo}} \times 100$$

#### 4.2.5.9 Ensaio de permeabilidade *in vitro* de FM

A permeabilidade do FM em linhagens colorretais foi avaliada em células Caco-2 e HT29-MTX. Resumidamente, as células diluídas em uma proporção 90:10 (Caco-2:HT29-MTX) foram semeadas em *inserts* (Millicell, MCRP06H48) e cultivadas por 21 dias com meio DMEM. A medição da resistência elétrica transepitelial (TEER) foi avaliada a cada 2 dias para o controle da uniformidade da membrana e de junções intercelular, e após as medições o meio de cultura foi trocado. No dia do experimento, HBSS contendo 0,2% Tween 80 foi adicionado nos compartimentos apical (500 µl) e basolateral (1,5 ml) da placa utilizada. Após 30 minutos o HBSS do compartimento apical foi substituído por 0,5 ml de FM, ou NPs (5 e 10%) diluídos em HBSS 0,2% Tween 80 em uma concentração de 50 µM. Alíquotas de 200 µl foram coletados dos compartimentos basolaterais nos tempos 15, 30, 60, 120 e 240 min o volume inicial foi reestabelecido com adição de HBSS 0,2% Tween 80. Após o último momento, o meio foi removido de ambos os compartimentos do sistema e as células foram lavadas duas vezes com HBSS. Ao final do experimento, a membrana foi separada do *insert* e a monocamada celular foi destruída com DMSO e FM foi quantificado por espectrofotometria conforme descrito a seguir (Figura 8) (NUNES et al., 2020; PREZOTTI et al., 2020).





**Figura 8. Ensaio de permeabilidade intestinal**

TEER: resistência elétrica transepitelial; Imagem produzida a partir de Biorender.com

#### 4.2.5.10 Estudo da biodisponibilidade de NPs contendo FM em ratos

O estudo da biodisponibilidade de NPs contendo FM foi realizado conforme descrito no item “4.2.2.1 Estudo da biodisponibilidade de FM em ratos” administrado por via sistêmica, foram utilizados ratos Wistar, com 90 dias de idade (Figura 6). Foi realizada a cirurgia para a canulação e posterior coletas de amostra de sangue para a quantificação de FM plasmático. Vinte e quatro horas após a canulação os animais foram divididos em 2 grupos de tratamento: 1) FM 1 mg/kg dissolvido em óleo de milho e administrado pela via og ou 2) FM 1 mg/kg administrado por via ip.

### 4.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1.244 (Graphpad Inc.). Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Anderson-Darling, D’Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov e os dados foram considerados normais quando aprovados em ao menos um dos testes. Para avaliação de homogeneidade de variância foram utilizados os testes de Brown-Forsythe e Bartlett e os dados foram considerados homogêneos quando aprovados em ao menos um dos testes. O teste ANOVA de uma via e ANOVA para medidas repetidas, seguido de post test Tukey foram aplicados para dados aprovados pelo teste de normalidade e de homoscedasticidade. Em casos de heterocedasticidade, os dados foram

transformados para escala logarítmica (Log) e a normalidade e homogeneidade foram avaliadas novamente. Dados não paramétricos foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido de post test Dunn. As variáveis quantitativas de distribuição simétrica foram descritas e apresentadas como média e desvio padrão da média (DP); as variáveis assimétricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil (IIQ). Os testes utilizados para cada experimento estão descritos nas legendas das figuras na sessão de resultados. O nível de significância adotado foi de 95% ( $p < 0,05$ ) e, quando menor, foram também descritos.

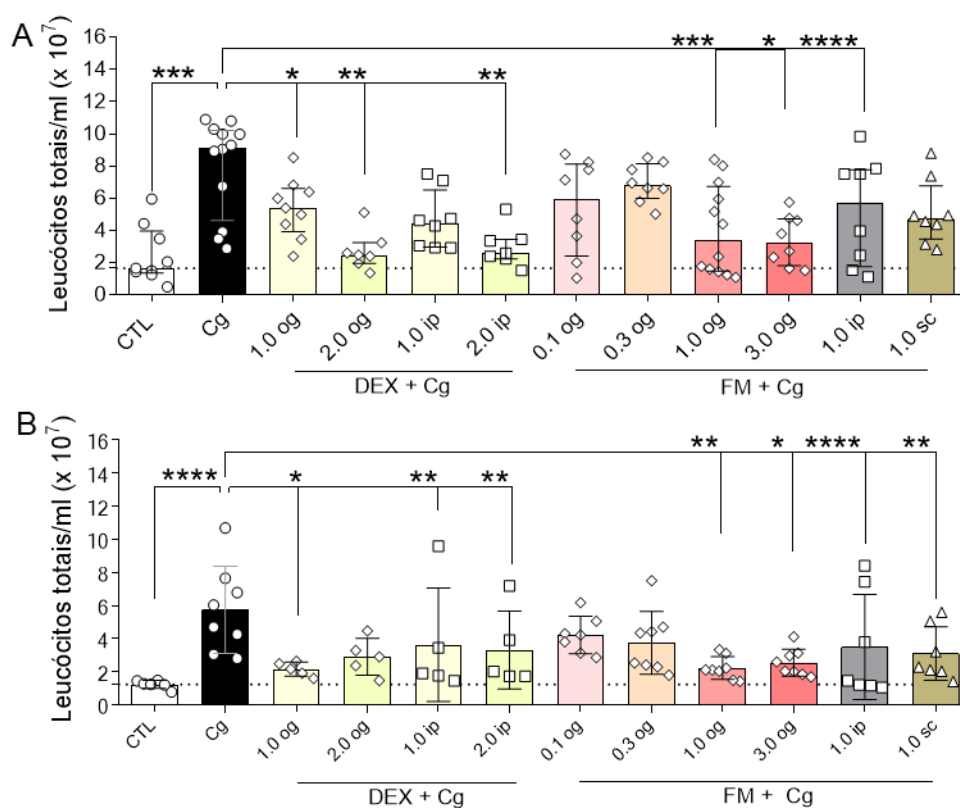
## 5 RESULTADOS

### 5.1 RESPOSTA À PERGUNTA EXPERIMENTAL 1: O TRATAMENTO SISTÊMICO COM FM PREVINE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM ROEDORES SUBMETIDOS AO MODELO DE PERITONITE E COLITE INDUZIDA POR DSS

Inicialmente, utilizamos um modelo de inflamação aguda em ratos para avaliar os efeitos sistêmicos da administração de FM (por via og, ip ou sc) e definir a dose a ser utilizada. A administração da carragenina (grupos Cg) causou a migração de leucócitos total na cavidade peritoneal de machos e fêmeas quando comparado ao CTL (apenas administração ip de salina), com um aumento de  $330 \pm 117\%$  em machos e  $461 \pm 197\%$  em fêmeas (Figura 9A e 9B).

Em machos, a migração leucocitária foi menor em  $55 \pm 31\%$  e  $42 \pm 21\%$  em animais tratados com DEX 1 mg/kg og e ip, respectivamente, e  $70 \pm 17\%$  e  $67 \pm 18\%$  em animais tratados com DEX 2 mg/kg og e ip, quando comparados ao grupo Cg. A dose de 1 mg/kg de FM foi efetiva para atenuar o processo inflamatório causado pela administração de Cg quando administrado pela via og e ip, com redução de  $64 \pm 28\%$  e  $80 \pm 13\%$  respectivamente, comparado ao grupo Cg (Figura 9A).

Já em fêmeas, a migração leucocitária foi menor em  $61 \pm 6\%$  e  $66 \pm 14\%$  em animais tratados com DEX 1 mg/kg og e ip, respectivamente, e  $49 \pm 14\%$  e  $54 \pm 26\%$  em animais tratados com DEX 2 mg/kg og e ip, quando comparados ao grupo Cg (Figura 9B). A dose de 1 mg/kg de FM foi efetiva para atenuar o processo inflamatório quando administrado pela via og, ip e sc com redução de 62%, 50% e 83% respectivamente, comparado ao grupo Cg (valores arredondados).



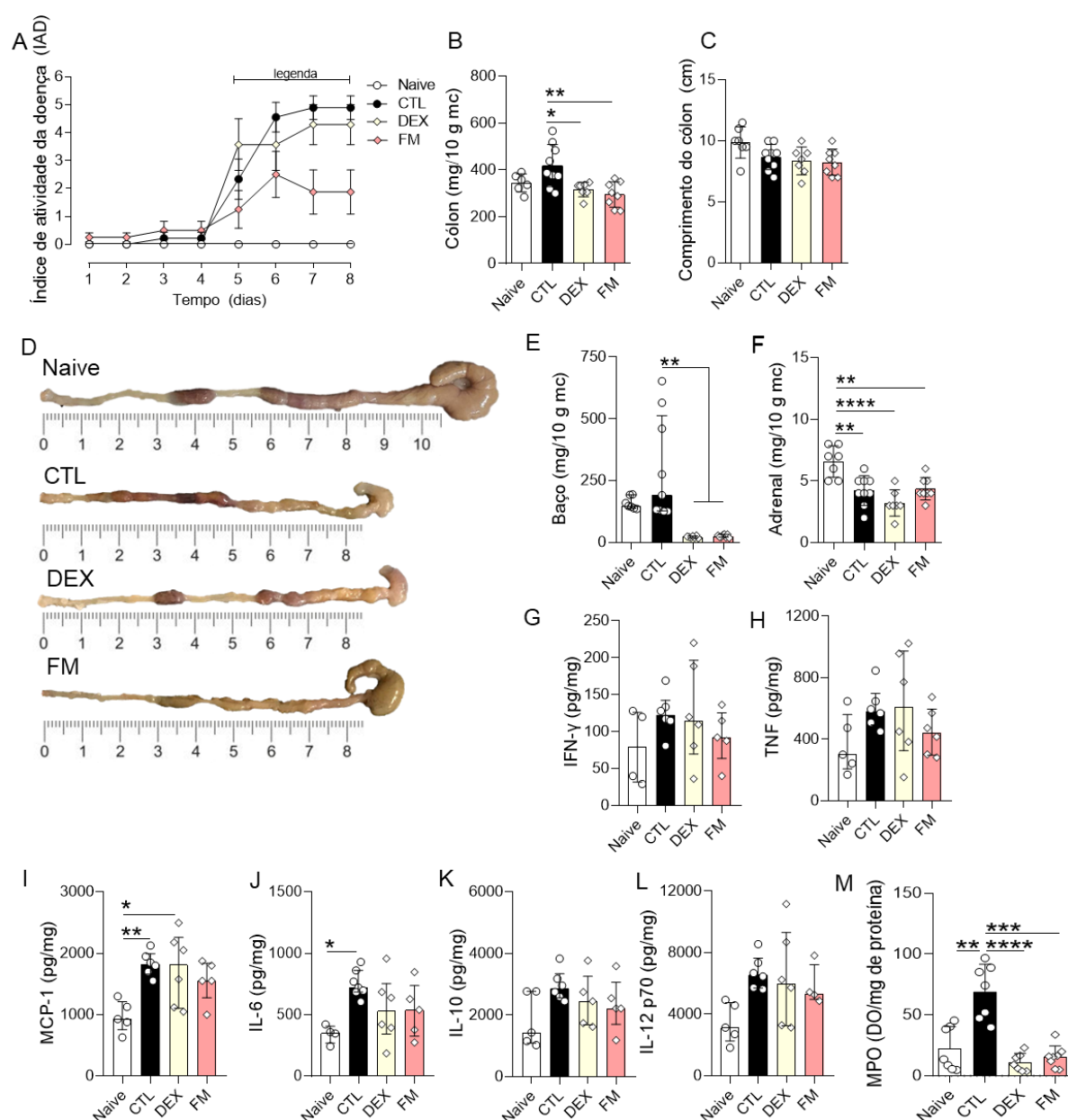
**Figura 9. Efeito anti-inflamatório da administração sistêmica de FM em machos (A) e fêmeas (B) submetidos ao modelo de peritonite induzida por carragenina.**

Avaliação da prevenção da migração leucocitária de DEX (1,0 e 2,0 mg/kg mc, ip ou og) ou FM (0,1, 0,3, 1,0, 3,0 mg/kg og ou 1,0 mg/kg ip ou sc) 60 min antes da administração ip de carragenina (Cg, 500  $\mu$ g/cavidade) e posterior contagem do número total de leucócitos (células/ml) obtidos a partir de lavado peritoneal 5 horas após a administração de Cg. Os valores foram expressos em mediana  $\pm$  IIQ e analisados com o teste de Kruskal-wallis seguido do post test de Dunn em A. E média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de post test de Tukey em B (n=5-12 animais por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001.

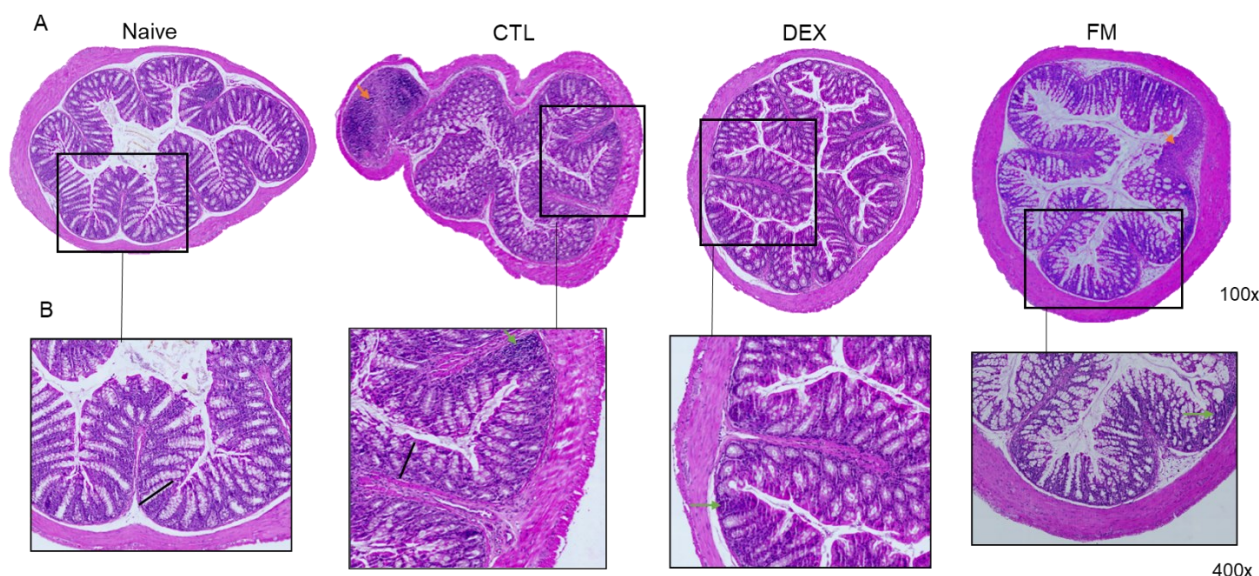
Ainda, a fim de se consolidar o efeito anti-inflamatório de FM quando administrado por via og num contexto subcrônico, foi utilizado o modelo experimental de colite induzida por DSS em camundongos. Um parâmetro utilizado para avaliação da colite induzida por DSS é o índice de atividade da doença (IDA). Como demonstrado na Figura 10A, os animais do grupo colítico CTL alcançaram uma pontuação de 2 no quinto dia experimental (correspondente a fezes amolecidas) e pontuação de 5 do sexto até o oitavo dia (correspondente a fezes amolecidas e presença de sangue visível). Já o grupo colítico tratado com FM apresentou menor pontuação quando comparado ao grupo CTL (p<0,05), correspondente apenas a fezes amolecidas no sexto, sétimo e oitavo dia de protocolo experimental. O grupo DEX não apresentou diferença estatística quando comparado ao CTL.

As Figuras 10B, C, e D demonstram a massa e comprimento dos cólons, as quais foram mensuradas com o objetivo de analisar o encurtamento do tecido e possível inflamação (indicativos de lesão tecidual). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos naive e colítico CTL, porém, foi possível notar que os cólons dos animais tratados com DEX e FM apresentaram menor massa do tecido quando comparado ao CTL ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). As massas dos baços foram mensuradas (Figura 10E) e foi observado menores massas nos grupos tratados com DEX e FM, quando comparados ao CTL ( $p < 0,01$ ). Com relação as adrenais (Figura 10F), os grupos colíticos CTL, DEX e FM apresentaram menores massas quando comparados aos animais naive ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente).

As Figuras 10G-L revelam a quantificação de citocinas envolvidas em processo inflamatório de amostras obtidas do cólon. Os animais do grupo colítico CTL apresentaram maior MCP-1 e IL-6 quando comparados aos animais naive ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente), enquanto os animais tratados com DEX apresentaram maior MCP-1 comparados aos naive ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nas quantificações de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e IL-12 p70. Verificou-se que o grupo CTL apresentou maior atividade de MPO quando comparado ao naive ( $p < 0,01$ ) e o tratamento com DEX ou FM apresentou menor atividade de MPO ( $p < 0,001$  e  $0,0001$ , respectivamente) quando comparado ao CTL (Figura 10M). Alterações histológicas como a desordem de arquitetura das criptas, alargamento das bases das criptas e extensa infiltração de leucócitos mononucleares foram observadas nas lâminas histológicas de cólon de animais tratados com veículo e expostos ao DSS (Figura 11). O tratamento com FM atenuou essas alterações estruturais e reduziu a migração celular.



**Figura 10. Efeito anti-inflamatório da administração oral de DEX ou FM (1 mg/kg) em camundongos submetidos ao modelo de colite induzida por DSS.** (A) O índice de atividade da doença (IAD) foi avaliado durante os oito dias de protocolo experimental, houve diferença significativa nos dias 5 ( $p < 0,05$ ), 6 ( $p < 0,001$ ), 7 e 8 ( $p < 0,0001$ ) entre os grupos naive e CTL e diferenças nos dias 7 e 8 entre os grupos CTL e FM ( $p < 0,05$ ). Massa e comprimento dos cólons (B e C) e imagens representativas dos grupos (D), massa dos baços (E) e adrenais (F). (G-M) Quantificação de parâmetros inflamatórios em fragmentos de cólon. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados com ANOVA de medidas repetidas seguido de *post test* de Tukey em A; média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey em B, C, F, G, H, I, J, K, L, M; e mediana  $\pm$  IIQ e analisados com o teste de Kruskal-wallis seguido do *post test* de Dunn em E ( $n = 4-8$  animais por grupo). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .



**Figura 11. Imagens representativas do efeito do tratamento subcrônico com FM em cortes histológicos de cólon corados com HE após 8 dias de exposição ao DSS.** A) aumento de 100 e B) aumento de 400x. Linha preta representa alterações na cripta (encurtamento e desordem da estrutura); seta verde representa infiltrado leucocitário; seta laranja representa linfonodo.

## 5.2 RESPOSTA À PERGUNTA EXPERIMENTAL 2: O TRATAMENTO ORAL COM FM APRESENTA POUCO IMPACTO NO METABOLISMO GLICÊMICO E LIPÍDICO DE MACHOS E FÊMEAS

Após a confirmação da atividade anti-inflamatória de FM administrado sistemicamente, a dose de 1 mg/kg foi selecionada para continuidade dos estudos, assim como as vias de administração ip e og. Ainda, machos foram tratados com FM na dose de 0,1 mg/kg ip ou og, para verificar se, caso haja alterações metabólicas, se essas permanecem em uma dose menor.

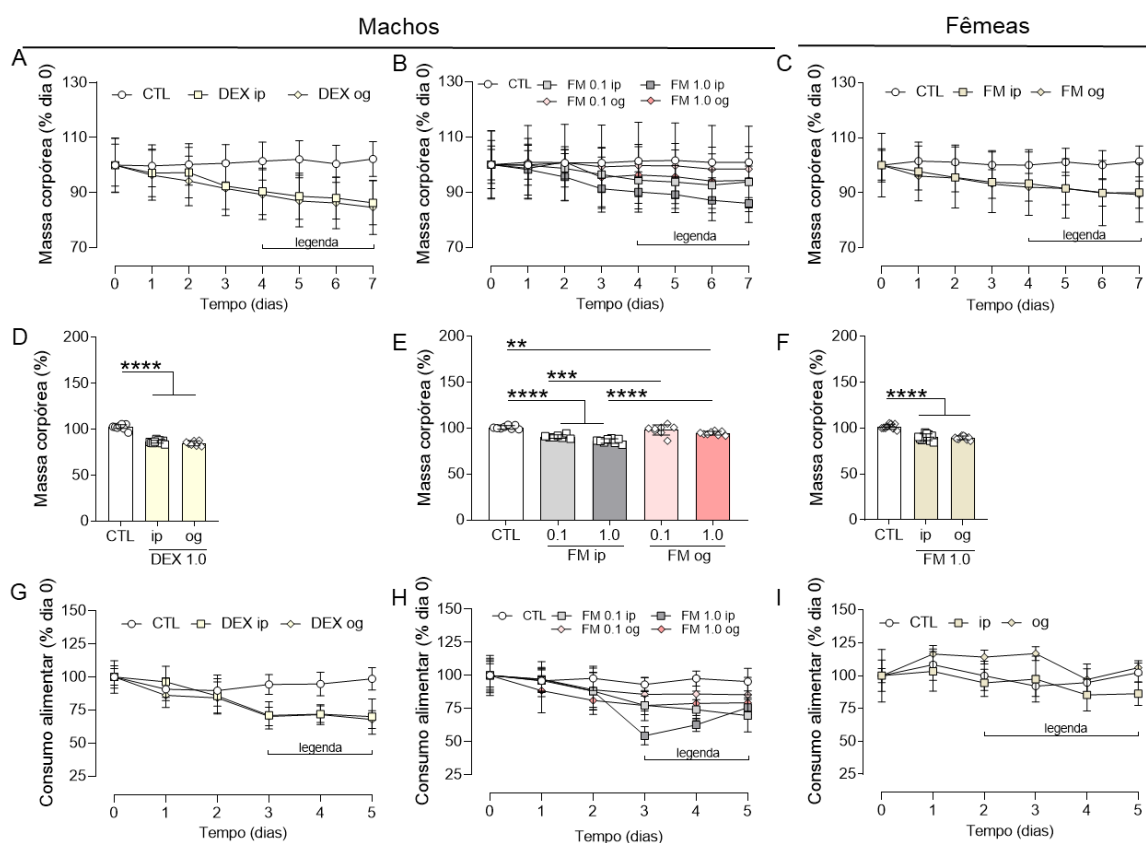
O tratamento prolongado com DEX ip e og diminuiu a massa corpórea de ratos a partir do quarto dia (Figura 12A,  $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTL e resultou em perda de 15% da massa dos animais ao fim do protocolo experimental (Figura 12D). Ainda, houve menor consumo alimentar a partir do terceiro dia (Figura 12G,  $p < 0,05$ ). O consumo alimentar não foi acompanhado durante o 6<sup>a</sup> e 7<sup>o</sup> dias devido ao protocolo de jejum realizado para o ipGTT e eutanásias. A massa corpórea dos ratos foi afetada a partir do quarto dia de tratamento com FM 1,0 mg/kg administrado pela via ip, quando comparado ao CTL (Figura 12B,  $p < 0,05$ ). Ao fim do protocolo experimental, foi observado menor massa corpórea de aproximadamente 10% para o tratamento com FM 0,1 mg/kg ip, 15% para FM 1,0 mg/kg ip e 5% para FM 1,0 mg/kg

og (Figura 12F). Assim, considerando a variação na massa corpórea, houve diferenças significativas entre as vias de administração na dose de 0,1 mg/kg ( $p < 0,001$ ) e 1,0 mg/kg ( $p < 0,0001$ ). A redução da massa corpórea foi acompanhada de menor consumo de ração a partir do 3º dia de protocolo experimental, nos 3 grupos tratados com o FM (Figura 12H,  $p < 0,05$ ). As fêmeas tratadas com FM 1,0 mg/kg ip e og apresentaram menor massa corpórea ao longo do protocolo experimental quando comparado ao grupo CTL (Figuras 12C,  $p < 0,05$ ), com redução de aproximadamente 10% da sua massa inicial (Figura 12F). Alterações no consumo alimentar ocorreram em ratas tratadas com FM og nos dias 3 e 4 ( $p < 0,05$  comparado ao CTL) que resultaram em diferenças significativas entre as vias de administração (Figura 12I,  $p < 0,05$ ).

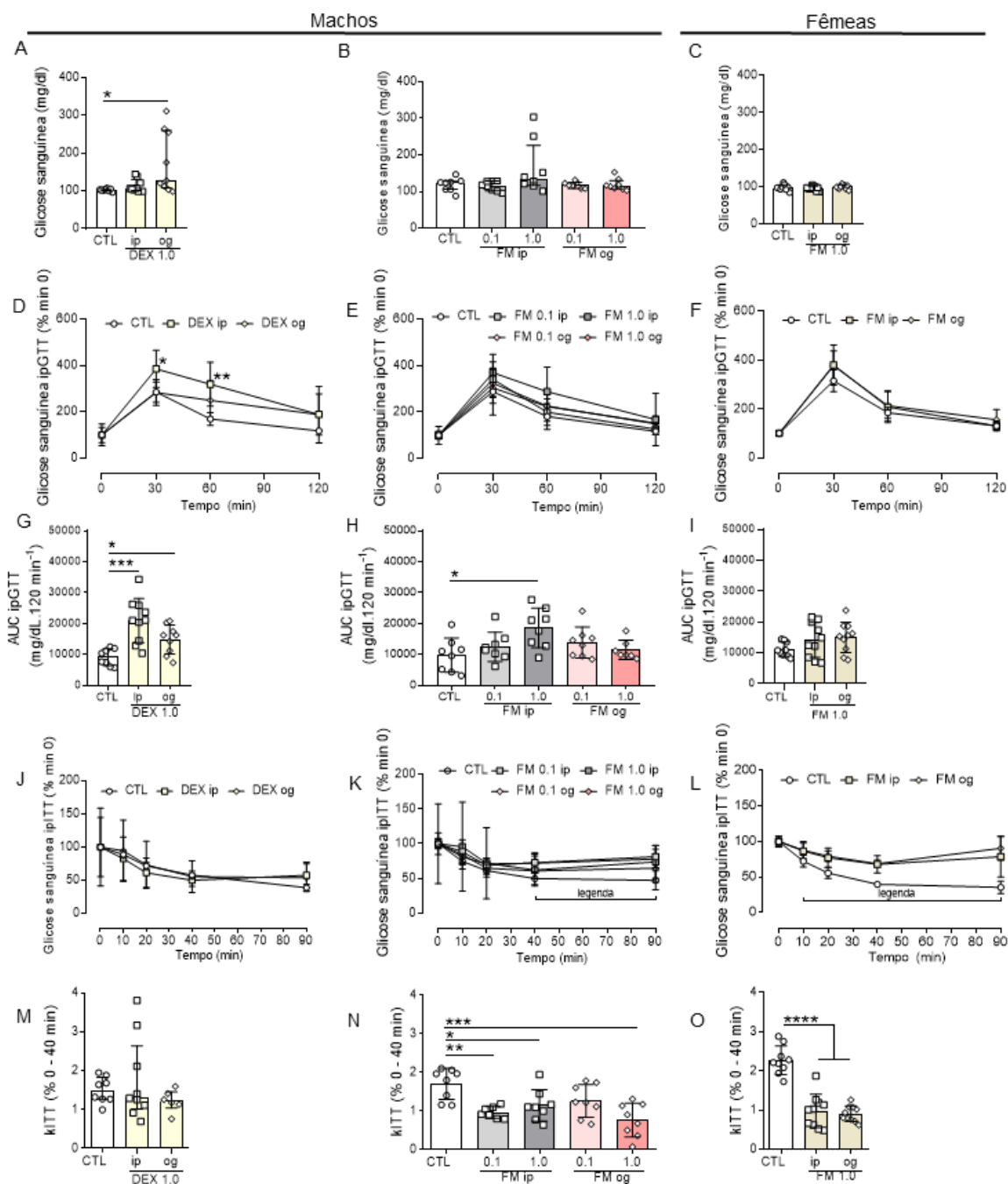
Após 5 dias de tratamento, foi observado que os animais tratados com DEX og apresentaram maiores valores de glicose sanguínea basal quando comparados ao grupo CTL (Figura 13A,  $p < 0,05$ ). Já os machos e fêmeas tratados com FM não apresentaram alterações na glicemia basal (Figuras 13B e C). Posteriormente os animais foram submetidos ao ipGTT, um teste de resposta a sobrecarga de glicose e foi observado menor tolerância à glicose em ratos tratados com DEX ip ou og e FM 1,0 mg/kg ip, que pode ser observado com os maiores valores de glicose sanguínea e AUC durante o teste (Figuras 13D, E, G e H;  $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). Tanto os machos tratados com FM 0,1 ip ou 0,1 e 1,0 mg/kg og como as fêmeas não apresentaram alterações na tolerância a glicose, baseados nos valores de glicose sanguínea e AUC (figura 13E, F, H e I).

Após 6 dias de tratamento a sensibilidade a insulina foi avaliada pelo ipITT (2 UI/kg mc) e posteriormente realizado o cálculo de KIITT. Machos tratados com FM 0,1 e 1,0 mg/kg ip ou 1,0 mg/kg og apresentaram menor sensibilidade à insulina ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  respectivamente) quando comparados ao grupo CTL (Figuras 13K e N) e fêmeas (Figuras 13L e O,  $p < 0,0001$ ). Já o tratamento com DEX não afetou a sensibilidade à insulina dos animais (Figuras 13J e M).





**Figura 12. Impacto do tratamento sistêmico com FM na massa corpórea e consumo alimentar de machos e fêmeas.** Acompanhamento da massa corpórea (resultados normalizados a partir do dia 0) de machos (A e B) e fêmeas (C) durante oito dias de protocolo experimental. O tratamento com DEX ip ou og (A) e FM 1,0 mg/kg ip (B) reduziu a massa corpórea dos animais quando comparado ao grupo CTL a partir do 4º dia de tratamento ( $p < 0,05$ ). Em C, o tratamento com FM 1,0 mg/kg ip reduziu a massa corpórea das fêmeas quando comparado ao grupo CTL apenas no 7º dia de tratamento ( $p < 0,05$ ), enquanto o tratamento com FM 1,0 mg/kg ip reduziu a massa corpórea das fêmeas a partir do 3º dia de experimento ( $p < 0,05$ ). D, E e F representam a variação da massa corpórea final, comparada a massa inicial de cada animal, em porcentagem. Acompanhamento do consumo alimentar (resultados normalizados a partir do dia 0) de ratos (G e H) e ratas (I) durante cinco dias de protocolo experimental. O tratamento com DEX ip ou og (G), FM 0,1 mg/kg ip, FM 1,0 mg/kg ip ou og (H) reduziu o consumo alimentar dos animais quando comparado ao grupo controle a partir do 3º dia de tratamento ( $p < 0,05$ ). O tratamento com FM 1,0 mg/kg og reduziu o consumo alimentar de fêmeas quando comparado ao CTL nos dias 3 e 4 ( $p < 0,05$ ). Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados com ANOVA de medidas repetidas seguido de *post test* de Tukey em A, B, C, G, H e I; média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey em D, E e F ( $n=8-10$  animais por grupo). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

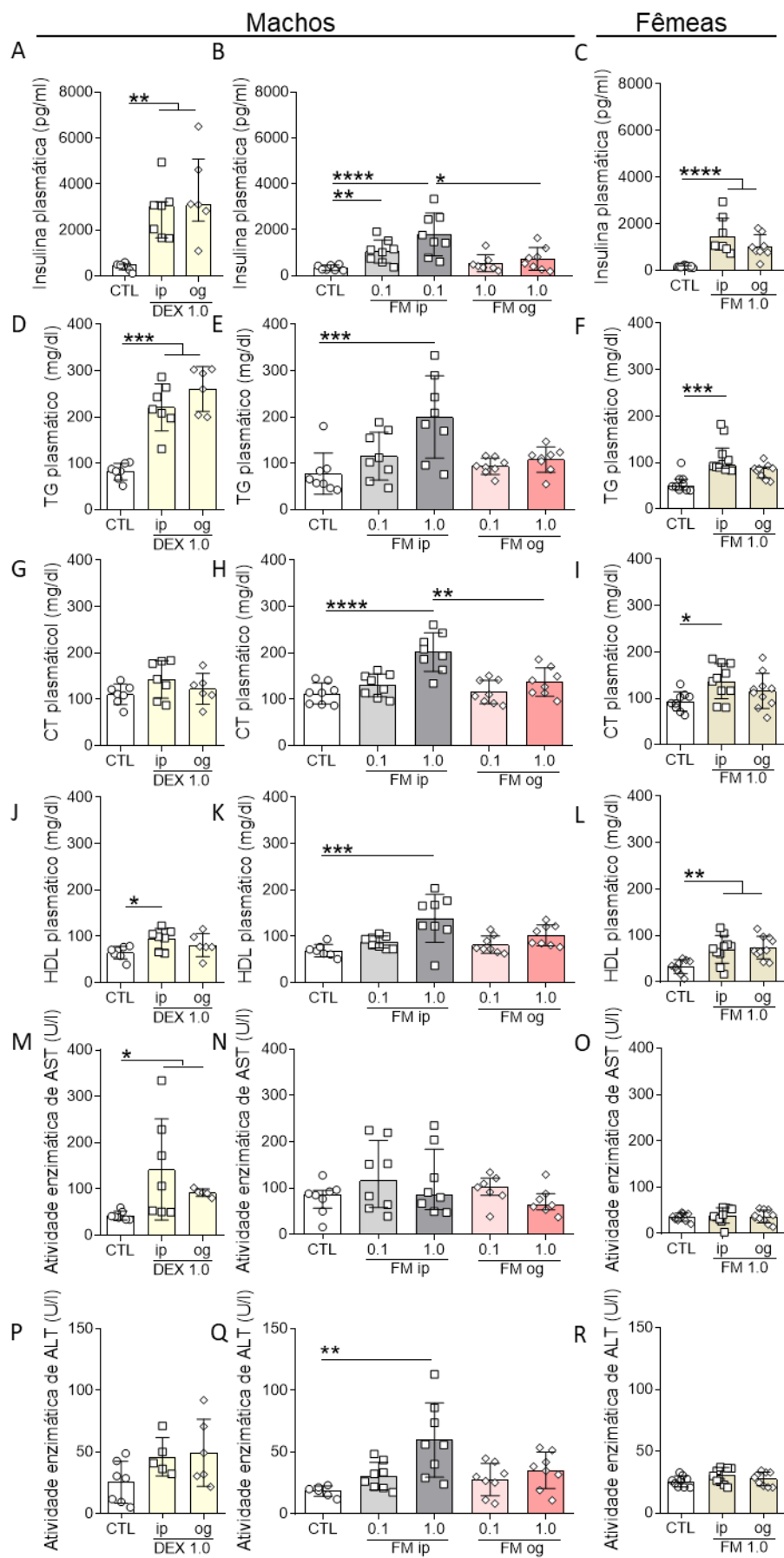


**Figura 13. Impacto do tratamento sistêmico com FM na homeostase glicêmica de machos e fêmeas.**

Glicose sanguínea em jejum (8 horas) de ratos tratados com DEX (A), FM (B) ou ratas tratadas com FM (C), após 5 dias de tratamento. Teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT) em ratos tratados com DEX (D), FM (E) e ratas tratadas sistemicamente com FM (F) após 5 dias de protocolo experimental; os dados estão normalizados a partir da glicose sanguínea do tempo 0 min. G, H e I) Área sob a curva (AUC) calculada a partir dos valores do ipGTT. Teste intraperitoneal de tolerância a insulina (ipITT) em ratos tratados com DEX (J), FM (K) e ratas tratadas sistemicamente com FM (L) após 6 dias de protocolo experimental; os dados estão normalizados a partir da glicose sanguínea do tempo 0 min. M, N e O) Constante de decaimento de glicose (kITT) calculada a partir dos valores do ipITT, entre os tempos de 0 a 40 minutos. Os valores foram expressos em mediana  $\pm$  IIQ e analisados com o teste de Kruskal-wallis seguido do *post test* de Dunn em A, B e M; média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey em C, G, H, I, N e O; média  $\pm$  EPM e analisados com ANOVA de medidas repetidas seguido de *post test* de Tukey em D, E, F, J, K e L; (n=8-10 animais por grupo). \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\*  $p$ <0,001 e \*\*\*\* $p$ <0,0001.

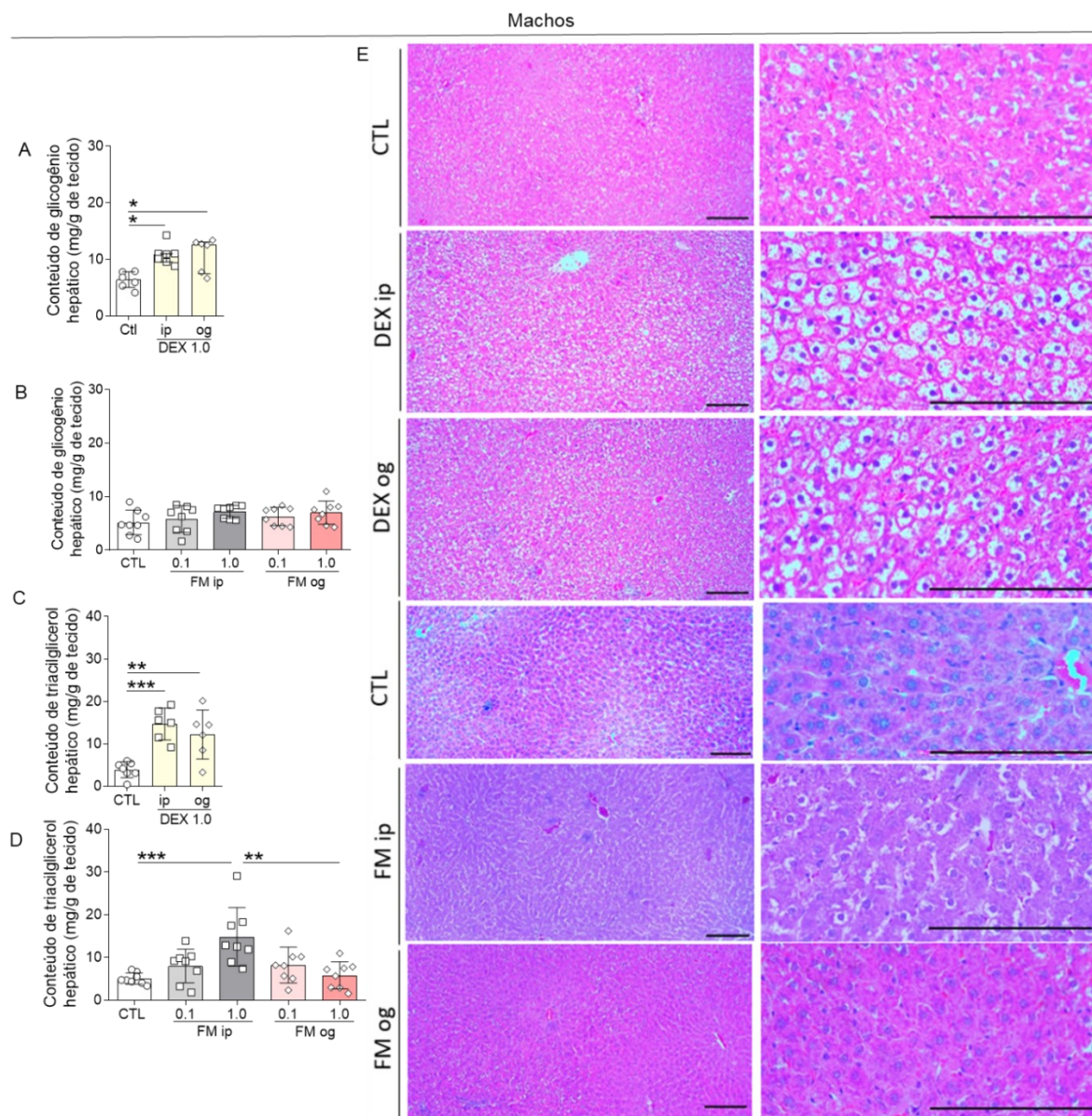
Os animais tratados com DEX (ip ou og) apresentaram maiores valores de insulina plasmática em jejum quando comparados ao grupo CTL (Figura 14A,  $p < 0,01$ ). Esse perfil também foi observado após o tratamento com FM 0,1 e 1,0 mg/kg ip em machos (Figura 14B;  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ ) e com 1,0 mg/kg ip ou og em fêmeas (Figura 14C,  $p < 0,0001$ ). O tratamento com FM 1,0 mg/kg administrado por via ip impactou o metabolismo lipídico de machos e fêmeas, observado devido a maior concentração de triacilglicerol plasmático em machos ( $p < 0,001$ ) e fêmeas ( $p < 0,001$ ) e colesterol total e colesterol HDL em machos ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) e fêmeas ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  respectivamente), quando comparados aos respectivos grupos CTL (Figuras 14E, F, H, I, K e L). Já o tratamento com DEX ip ou og resultou em maior triacilglicerol e colesterol HDL plasmáticos ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo CTL (Figuras 14D, G e J).

A função hepática foi determinada pela quantificação da atividade enzimática das transaminases AST e ALT. O tratamento com DEX ip e og resultou em maior atividade da enzima AST ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTL (Figura 14M), enquanto o tratamento com FM 1,0 mg/kg ip resultou em maior atividade da enzima ALT em machos ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao grupo CTL (Figura 14Q). Fêmeas tratadas com FM não apresentaram alterações nas atividades enzimáticas (Figuras 14O e R).

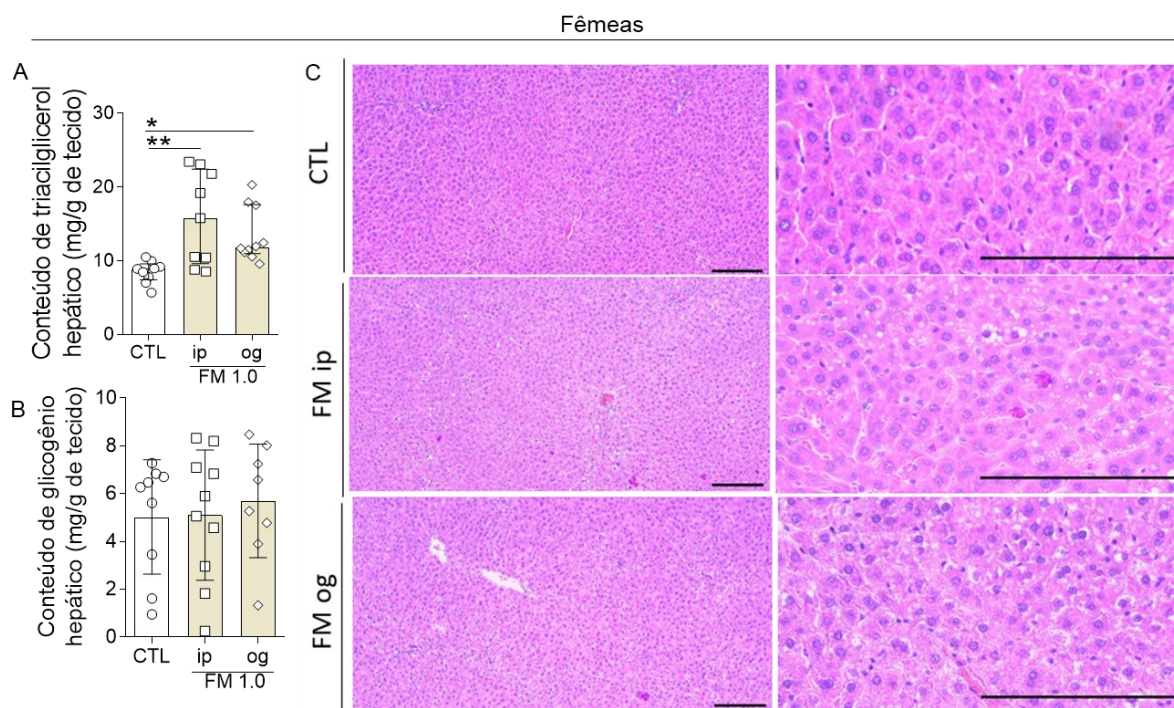


**Figura 14. Perfil metabólico plasmático de machos e fêmeas em jejum após 7 dias de tratamento.** Insulina (A, B e C), triacilglicerol (D, E e F), colesterol total (G, H e I), colesterol HDL (J, H e L), atividade enzimática de ALT (M, N e O) e atividade enzimática de AST (P, Q e R) plasmáticos de machos e fêmeas em jejum após 7 dias de tratamento. Os valores foram expressos em média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey em A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, R; e em mediana  $\pm$  IIQ e analisados com o teste de Kruskal-wallis seguido do *post test* de Dunn em P e Q (n=8-10 animais por grupo). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

As análises histológicas de fígado coradas com HE indicam o acúmulo de glicogênio em machos tratados com DEX (Figura 15E), corroborando a quantificação bioquímica (Figura 15A). Ainda, foi observado maior conteúdo de triacilglicerol hepático quando comparado ao grupo CTL nos grupos tratados com DEX (Figura 15C,  $p < 0,001$ ). Ratos tratados com FM não apresentaram alterações morfológicas significantes e apenas o tratamento com FM 1,0 ip resultou em maior conteúdo de triacilglicerol hepático (Figura 15B). As imagens de fígado de fêmeas tratadas com FM apresentaram gotículas de gordura características de esteatose hepática (Figura 16C), resultado que corrobora o maior conteúdo de triacilglicerol hepático (Figura 16A,  $p < 0,05$ ).



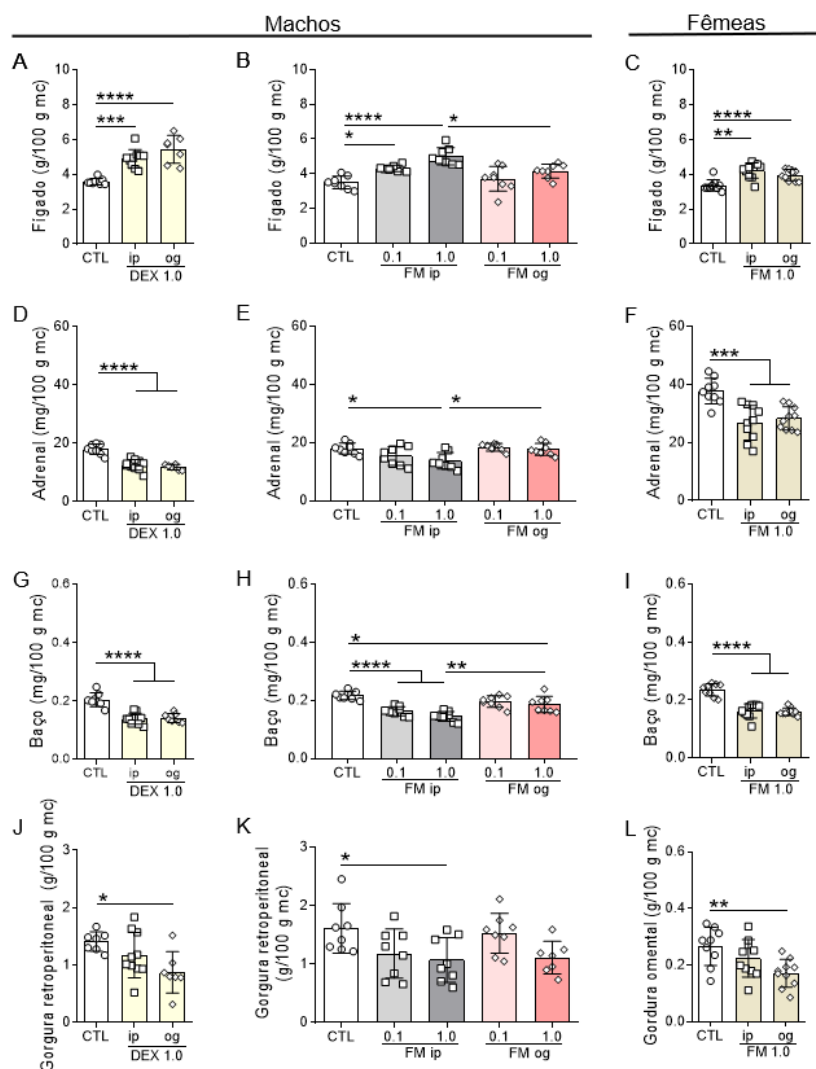
**Figura 15. Análise histológica hepática e conteúdo de glicogênio e triacilglicerol de machos após 7 dias de tratamento.** Conteúdo de triacilglicerol (A e B) e glicogênio (C e D) hepático de machos tratados com DEX ou FM. E) Imagens representativas da secção do fígado com final magnitudes de 10× e 400×, coradas com hematoxilina e eosina. Barra de escala: 25 μm. Os valores foram expressos em média ± DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de post test de Tukey (n=8-10 animais por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,001.



**Figura 16. Análise histológica hepática e conteúdo de glicogênio e triacilglicerol de fêmeas após 7 dias de tratamento.** Conteúdo de triacilglicerol (A) e glicogênio (B) hepático de fêmeas tratadas com FM. C) Imagens representativas da secção do fígado com final magnitudes de 10× e 400×, coradas com hematoxilina e eosina. Barra de escala: 25 µm. Os valores foram expressos em média ± DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de post test de Tukey (n=8-10 animais por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\* p<0,001.

A massa relativa do fígado foi maior em machos tratados com DEX ip (p<0,001) ou og (p<0,0001) (Figura 17A) e FM 0,1 e 1 mg/kg ip (Figura 17B; p<0,05 e p<0,0001, respectivamente) e fêmeas tratadas com FM ip ou og (Figura 17C; p<0,01 e p<0,0001, respectivamente), quando comparados aos respectivos grupos CTL. Já a massa relativa das glândulas adrenais dos grupos DEX ip e og (Figura 17D, p<0,0001) e FM 1,0 mg/kg ip foi menor quando comparado aos grupos CTL em machos (Figura 17E; p<0,0001, p<0,0001 e p<0,05, respectivamente) e fêmeas tratadas com FM ip ou og (Figura 17F, p<0,001). A massa esplênica foi menor em machos tratados com DEX ip ou og (Figura 17G, p<0,0001) e FM 0,1 e 1,0 ip ou 1,0 og (Figura 17H; p<0,0001, p<0,0001 e p<0,05, respectivamente) e fêmeas tratadas com FM ip ou og (Figura 17I, p<0,0001). Ainda, a massa relativa da gordura retroperitoneal de machos tratados com DEX og e FM 1,0 mg/kg ip foi menor quando comparado ao grupo CTL (Figuras 17J e K, p<0,05). Já em fêmeas, o grupo tratado com FM og apresentou menor gordura omental (Figura 17L, p<0,01). Não houve

diferença na massa relativa de gorduras gonadais de machos e fêmeas (dados não apresentados).



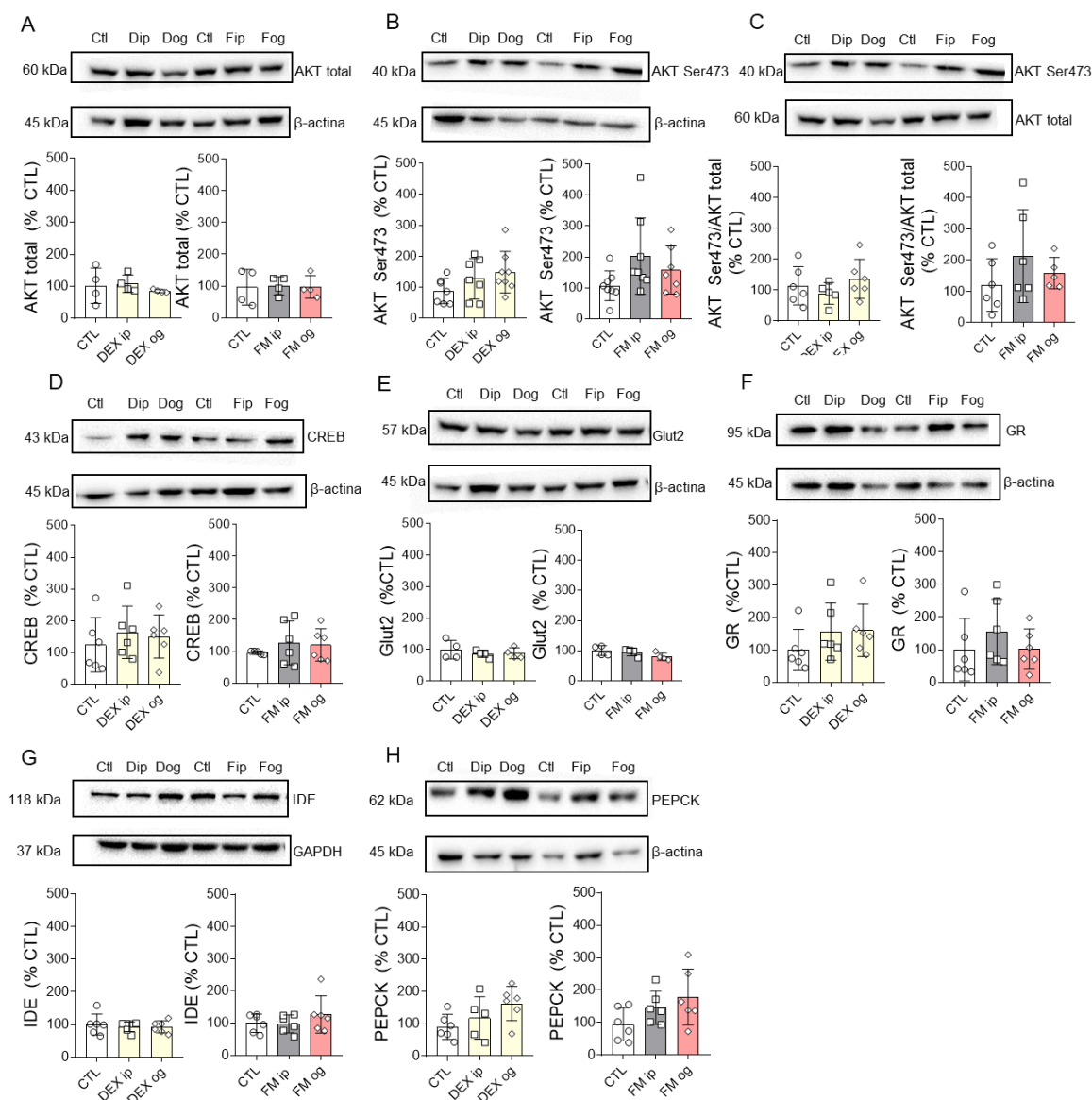
**Figura 17. Massa de órgãos de machos e fêmeas após 7 dias de tratamento.**

Fígado (A, B e C), adrenais (D, E e F), baço (G, H e I) e gordura retroperitoneal (J e H) e omental (L) de machos e fêmeas após 7 dias de tratamento. Os valores foram expressos em média ± DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey (n=8-10 animais por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001.

A fim de se investigar vias de sinalização envolvidas nas alterações metabólicas decorrentes do tratamento com DEX e FM (ip ou og), investigamos o conteúdo proteico da proteína cinase B (AKT total - proteína *downstream* do receptor de insulina), proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP (CREB) e transportador de glicose 2 (Glut2) em tecido hepático de ratos machos após 8 horas de jejum. Não houve diferenças significativas no conteúdo de AKT total (Figura 18A),



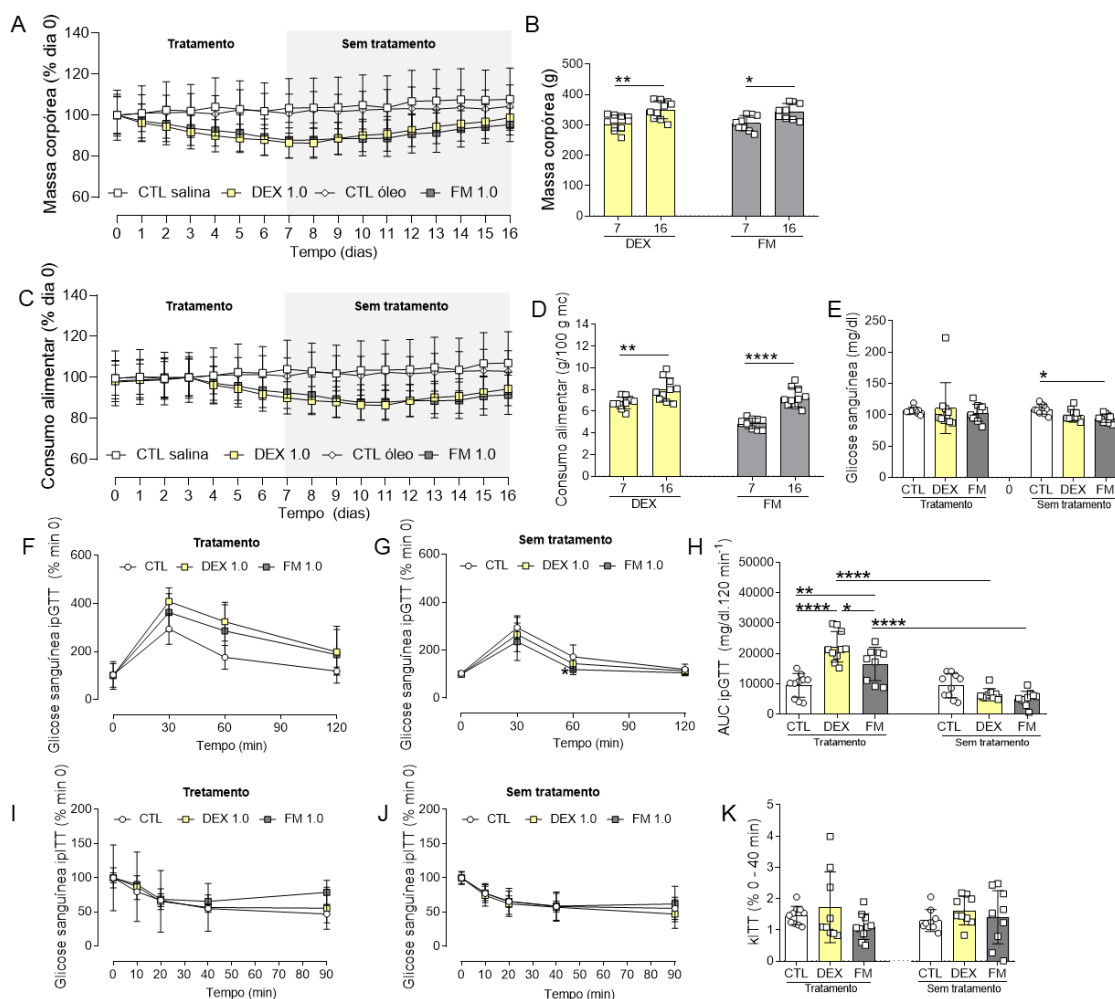
AKT Ser473 (Figura 18B), na relação AKT Ser473/AKT total (Figura 18C), CREB (Figura 18D), Glut2 (Figura 18E), GR (Figura 18F), IDE (enzima degradadora de insulina, Figura 18G) e PEPCK (Figura 18H) após 7 dias de tratamento com DEX ou FM (1 mg/kg ip ou og).



**Figura 18. Envolvimento de vias de sinalização em fígado de machos após 7 dias de tratamento.** Conteúdo de AKT total de ratos tratados com DEX (1 mg/kg ip e og) ou FM (1 mg/kg ip e og) (A), conteúdo de AKT fosforilada em serina 473 (AKT Ser473) (B), razão entre o conteúdo de AKT Ser473 para o seu conteúdo total (C), conteúdo de CREB (D), de Glut2 (E), GR total (F), IDE (G) e PEPCK (H) de fígado extraído de ratos tratados com DEX ou FM. , eígado (A, B e C), adrenais (D, E e F), baço (G, H e I) e gordura retroperitoneal (J e H) e omental (L) de machos e fêmeas após 7 dias de tratamento. Os valores foram expressos em média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey (n=6-8). AKT: proteína cinase B; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta cAMP; Glut2: transportador de glicose 2; GR: receptor de glicocorticoide; IDE: enzima degradadora de insulina; PEPCK: fosfoenol piruvato carboxicinas.

### 5.3 RESPOSTA À PERGUNTA EXPERIMENTAL 3: OS DESFECHOS METABÓLICOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DA ADMINISTRAÇÃO IP DE FM SÃO REVERSÍVEIS APÓS A INTERRUPTÃO DO TRATAMENTO

Após observar que o tratamento com FM 1,0 mg/kg ip afeta negativamente a homeostase glicêmica e lipídica de machos, verificamos esses desfechos são reversíveis após a interrupção do tratamento. Foi observado que 10 dias após a interrupção do tratamento com DEX ou FM há recuperação parcial da massa corpórea e consumo alimentar dos animais (Figuras 19A, B, C e D). Os valores de glicose sanguínea se mantêm equiparados aos controles (Figura 19E) e a interrupção do tratamento normaliza a intolerância a glicose (Figuras 19F, G e H) desenvolvidas ao término do período de tratamento com DEX ou FM.

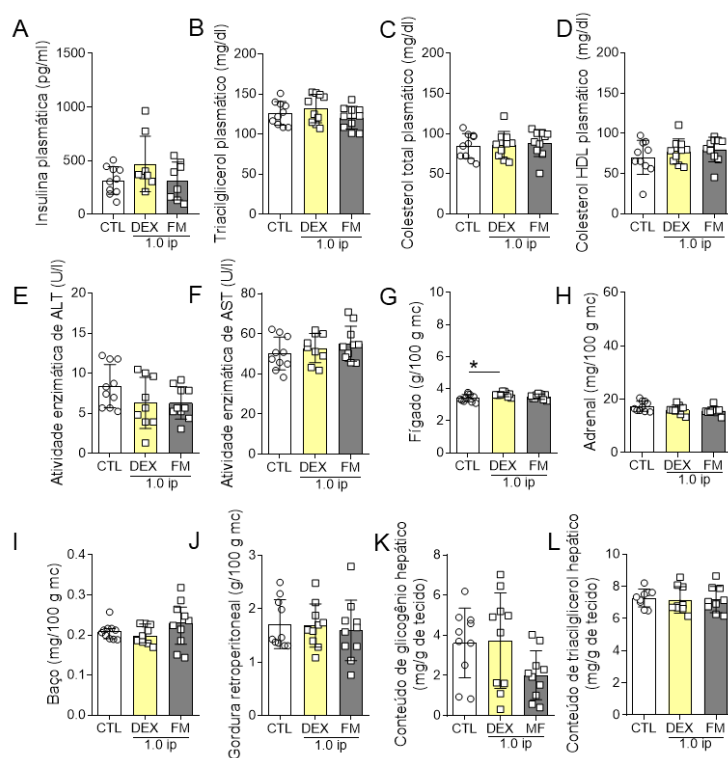


**Figura 19. Análises in vivo após a interrupção do tratamento com FM ou DEX.**

A) Acompanhamento da massa corpórea de machos (resultados normalizados a partir do dia 0) durante os 16 dias de protocolo experimental, sendo que nos 7 primeiros dias os animais foram tratados com DEX ou FM 1 mg/kg ip, seguidos de 10 dias sem tratamento. B) Massa corpórea após 7 e 16 dias de

protocolo experimental. C) Acompanhamento do consumo alimentar (resultados normalizados a partir do dia 0) durante os 16 dias de protocolo. E) Glicose sanguínea em jejum (8 horas) após 5 dias de tratamento e após 14 dias de protocolo experimental (7 dias após interrupção do tratamento). ipGTT após 5 dias de tratamento (F) e 7 dias após a interrupção do tratamento (G). H) AUC calculada a partir dos valores do ipGTT. ipITT após 6 dias de tratamento (I) e 8 dias após interrupção do tratamento (J). K) KITT calculada a partir dos valores do ipITT, entre os tempos de 0 a 40 minutos, após 6 dias de tratamento e 8 dias após a interrupção. Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados com ANOVA de medidas repetidas seguido de *post test* de Tukey em A, B, E, F H e I; média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey em B, D, G e J (n=8-10 animais por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001.

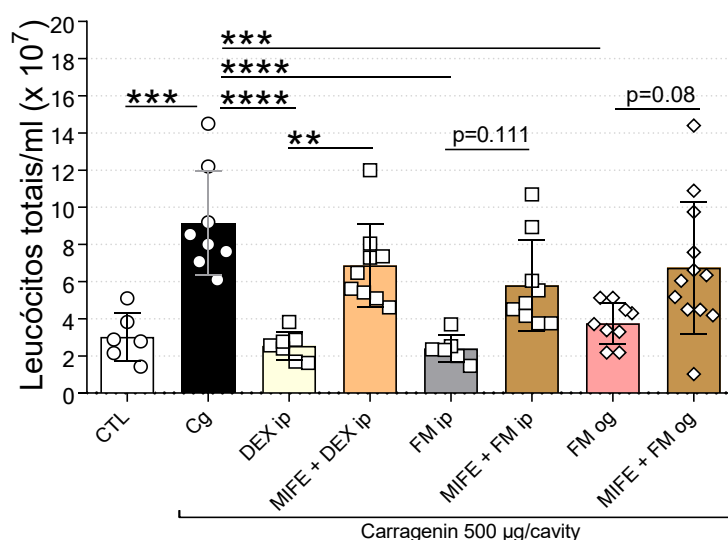
Os valores de insulina, triacilglicerol, colesterol total e colesterol HDL plasmáticos após 8 horas de jejum também retornam aos valores equivalentes aos do grupo CTL após 10 dias de interrupção do tratamento (Figuras 20A, B, C e D). O mesmo se observa com a atividade das transaminases ALT e AST (Figuras 20E e F). As alterações nas massas de fígado, adrenais, baço e gordura retroperitoneal observadas após o tratamento com FM foram todas normalizadas 10 dias após a interrupção do tratamento (Figuras 20G, H, I, J, K e L).



**Figura 20. Impacto da interrupção do tratamento intraperitoneal com FM em parâmetros ex vivo.** Insulina (A), triacilglicerol (B), colesterol total (C), colesterol HDL (D), atividade enzimática de ALT (E) e atividade enzimática de AST (F) plasmáticos de machos em jejum após 10 dias de interrupção do tratamento; massas de fígado (G), adrenais (H), baço (I) e gordura retroperitoneal (J); Quantificação de glicogênio (K) e triacilglicerol (L) hepáticos de animais em jejum. Os valores foram expressos em média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey em A, B, C, D, E, F, G, H, J, K e L; e em mediana  $\pm$  IIQ e analisados com o teste de Kruskal-wallis seguido do *post test* de Dunn em I (n=10 animais por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001.

#### 5.4 RESPOSTA À PERGUNTA EXPERIMENTAL 4: OS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E METABÓLICOS DE FM DEPENDEM EM PARTE DA ATIVAÇÃO DE GR

O envolvimento de GR na ação anti-inflamatória de FM foi avaliado a partir do pré-tratamento de ratos com MIFE (20 mg/kg ip), um antagonista de GR, e posteriormente os ratos foram submetidos ao modelo de peritonite induzida por carragenina (Figura 21). Assim como observado anteriormente (pergunta experimental 1), a administração de carragenina causou a migração de leucócitos na cavidade peritoneal quando comparado ao CTL e tratamento com DEX (1,0 mg/kg ip) ou FM (1,0 mg/kg ip e og) atenuaram o processo inflamatório. O pré-tratamento com MIFE inibiu a ação anti-inflamatória de DEX ( $p < 0,01$ ), e, em parte, de FM ip e FM og ( $p = 0,111$  e  $p = 0,08$ , respectivamente).



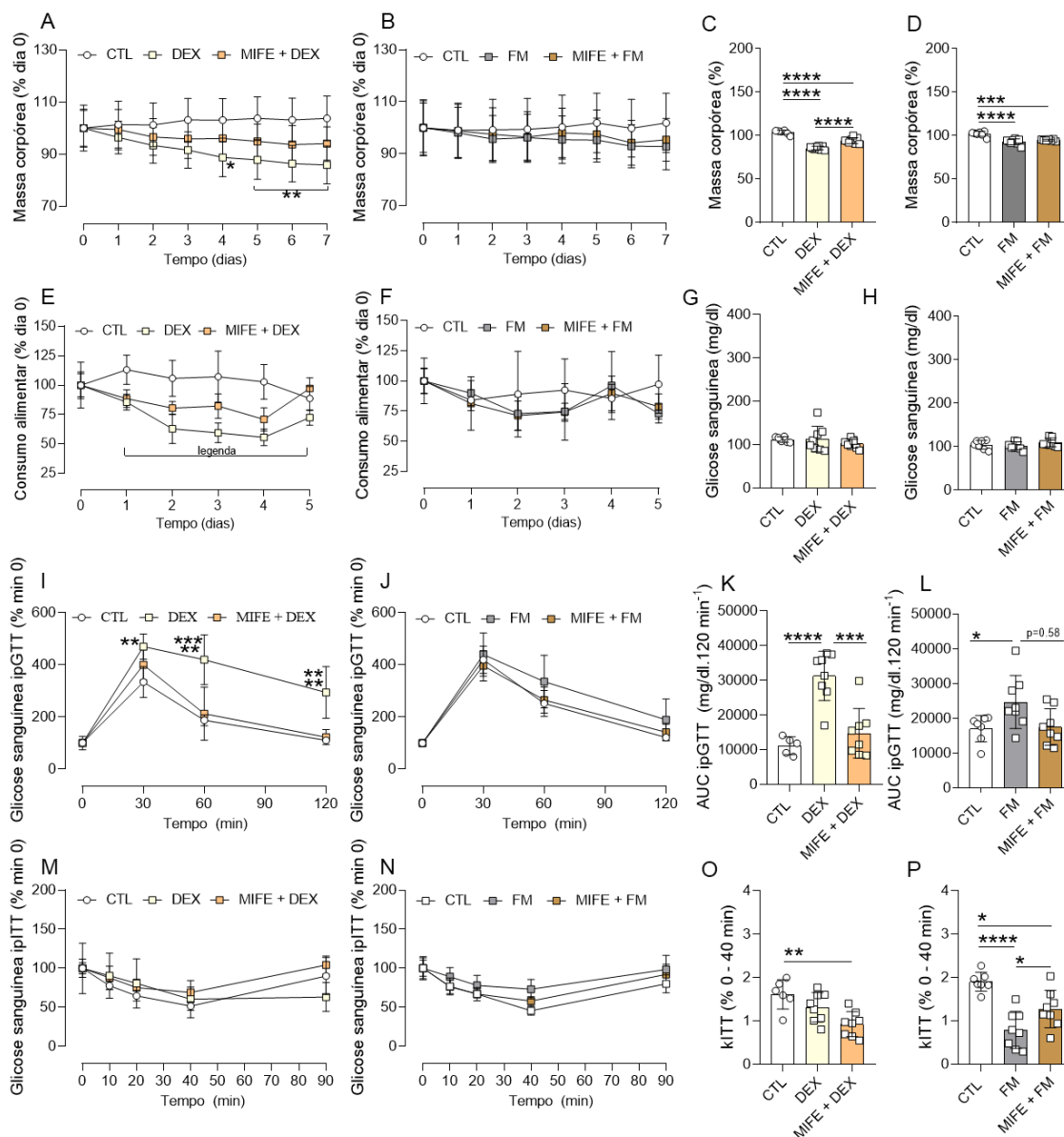
**Figura 21. Envolvimento de GR no efeito anti-inflamatório de FM em ratos submetidos ao modelo de peritonite induzida por carragenina.** Contagem do número total de leucócitos (células/ml) obtidos a partir de lavado peritoneal 5 horas após a administração de carragenina (500 µg) em ratos pré-tratados com mifepristona (MIFE, 20 mg/kg ip) e tratados com DEX (1 mg/kg) ip ou FM (1 mg/kg) ip ou og. Os valores foram expressos em média  $\pm$  SD e analisados com o teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey em B ( $n = 6-10$  animais por grupo). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

O envolvimento de GR nas alterações metabólicas causadas pela administração ip de FM também foi avaliado a partir do pré-tratamento com MIFE por 7 dias. Os desfechos metabólicos observados anteriormente foram reproduzidos após o tratamento com DEX e FM (1,0 mg/kg ip).

O pré-tratamento com MIFE impediu a perda da massa corpórea de ratos tratados com DEX (Figuras 22A, e C,  $p < 0,0001$ ), assim como influenciou a redução do consumo alimentar a partir do 2º dia de protocolo experimental (Figura 22E,  $p < 0,05$ ). Já para os animais tratados com FM, o pré-tratamento com MIFE não interferiu nas alterações da massa corpórea e do consumo alimentar (Figura 22B, D e F).

Após 5 dias de tratamento, foi observado que os animais tratados com DEX, FM ou pré-tratados com MIFE não apresentaram alterações nos valores de glicose sanguínea basal quando comparados aos grupos CTL (Figuras 22G e H). Como esperado, foi observado menor tolerância à glicose em ratos tratados com DEX (Figuras 22I e K;  $p < 0,0001$ ) e o pré-tratamento com MIFE impediu este desfecho ( $p < 0,0001$ ). Já para FM, também foi observado menor tolerância à glicose ( $p < 0,05$ ) e este desfecho foi apenas parcialmente impedido com o pré-tratamento com MIFE (Figuras 22J e L;  $p < 0,058$ ).

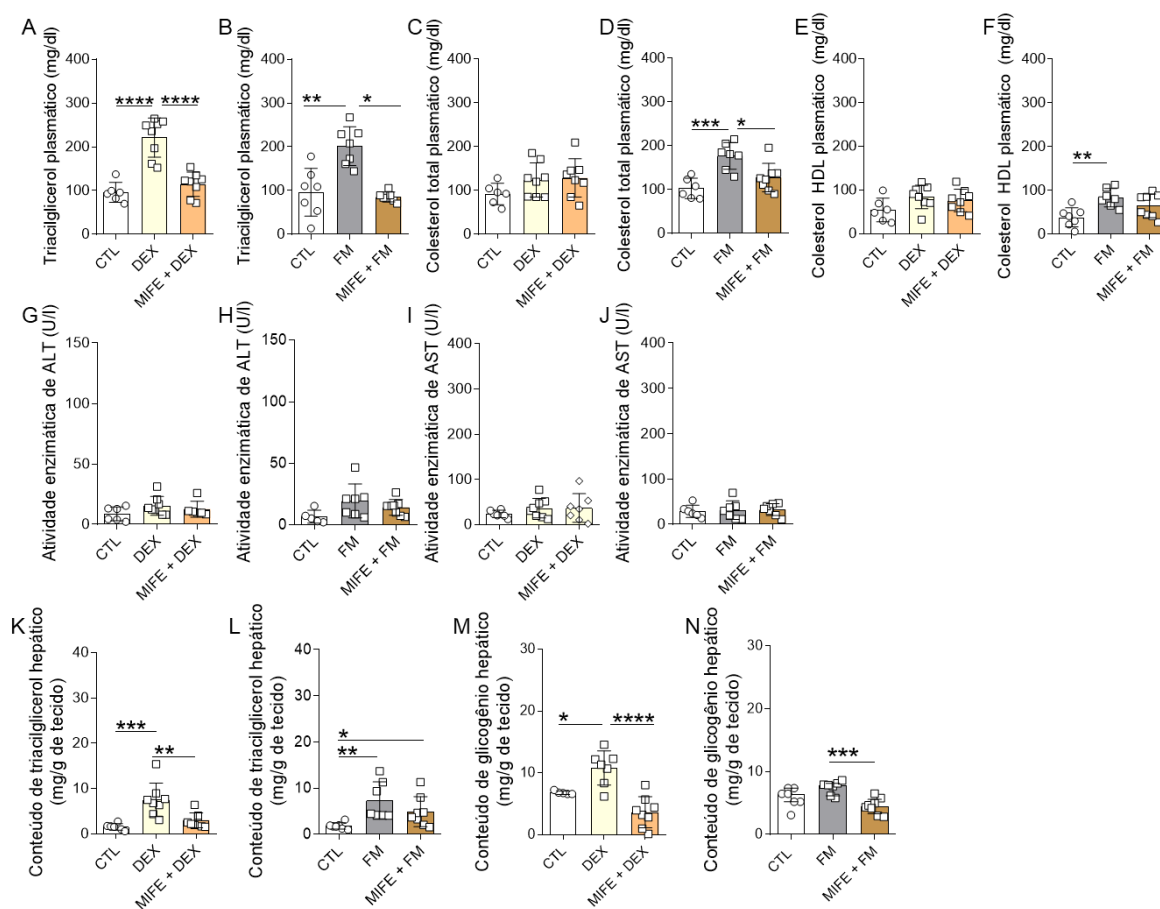
Reproduzindo o que já foi demonstrado, os animais tratados com FM 1,0 mg/kg ip apresentaram menor sensibilidade à insulina ( $p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo CTL (Figuras 22K e N) e o pré-tratamento com MIFE impediu a redução da sensibilidade à insulina ( $p < 0,05$ ). Já o tratamento com DEX não afetou a sensibilidade à insulina dos animais, mas o pré-tratamento com MIFE resultou até em melhora da sensibilidade à insulina em relação ao grupo CTL (Figuras 22M e O).



**Figura 22. Envolvimento de GR na massa corpórea, consumo alimentar e homeostase glicêmica de machos tratados após 7 dias de tratamento.**

Acompanhamento da massa corpórea (resultados normalizados a partir do dia 0) de machos pré-tratados com mifepristona (20 mg/kg ip) e tratados com DEX (1,0 mg/kg ip) ou FM (1 mg/kg ip) por 7 dias (A e B); Representação da variação da massa corpórea final, comparada a massa inicial de cada animal, em porcentagem (C e D); Acompanhamento do consumo alimentar (resultados normalizados a partir do dia 0) durante cinco dias de protocolo experimental (E e F); o tratamento com DEX ip ou MIFE+DEX reduziu o consumo alimentar dos animais quando comparado ao grupo CLT a partir do 1º dia de tratamento ( $p < 0,05$ ) e houve diferença significativa entre MIFE+DEX e DEX a partir do 2º dia ( $p < 0,05$ ). Glicose sanguínea em jejum (8 horas) após 5 dias de tratamento (G e H); Teste intraperitoneal de tolerância a glicose (ipGTT) após 5 dias de protocolo experimental, com dados normalizados a partir da glicose sanguínea do tempo 0 min (I e J); Área sob a curva (AUC) calculada a partir dos valores do ipGTT (K e L); Teste intraperitoneal de tolerância a insulina (ipITT) após 6 dias de protocolo experimental, com dados normalizados a partir da glicose sanguínea do tempo 0 min (M e N); Constante de decaimento de glicose (kITT) calculada a partir dos valores do ipITT, entre os tempos de 0 a 40 minutos (O e P); Os valores foram expressos em média  $\pm$  EPM e analisados com ANOVA de medidas repetidas seguido de *post test* de Tukey em A, B, E, F, I, J, M e N; média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey em C, D, G, H, K, L, O e P ( $n = 8$  animais por grupo). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

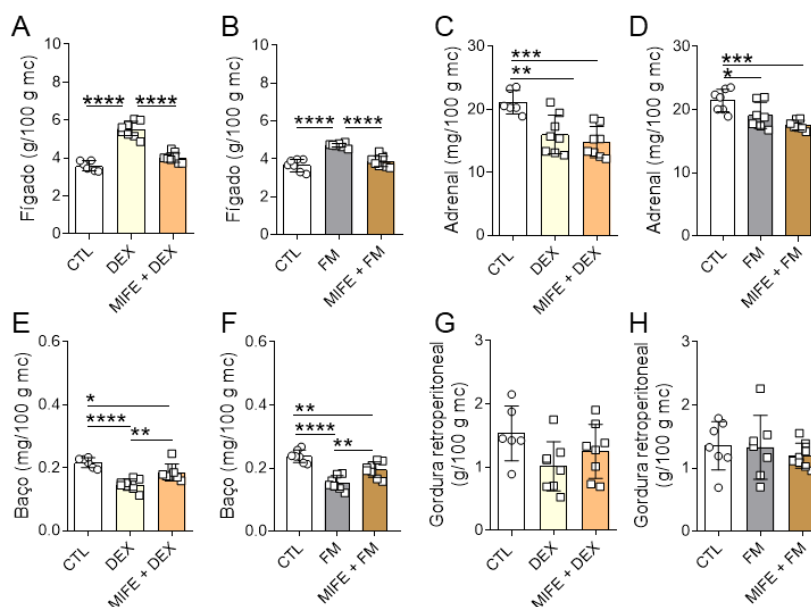
O tratamento com FM 1,0 mg/kg ip impactou sobre o metabolismo lipídico dos animais. Através do pré-tratamento com MIFE observamos que o aumento de triacilglicerol e colesterol plasmáticos é dependente de GR (Figuras 23A, B, C, D, E e F;  $p < 0,05$ ). Igualmente, o aumento do conteúdo de triacilglicerol e glicogênio hepáticos em decorrência do tratamento com DEX ou FM também são dependentes de GR (Figuras 23K, L, M e N;  $p < 0,05$ ). A função hepática, determinada pela quantificação da atividade enzimática das transaminases AST e ALT, não foi alterada (Figuras 23G, H, I e J).



**Figura 23. Envolvimento de GR em parâmetros bioquímicos de machos após 7 dias de tratamento.** Triacilglicerol (A e B), colesterol total (C e D), colesterol HDL (E e F), atividade enzimática de ALT (G e H) e atividade enzimática de AST (I e J) plasmáticos após 8 horas de jejum; Conteúdo de triacilglicerol (K e L) e glicogênio (M e N) de fígados coletados de machos pré-tratados com mifepristona (20 mg/kg ip) e após 30 minutos tratados com DEX (1 mg/kg ip) ou FM (1 mg/kg ip) por 7 dias. Os valores foram expressos em média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey ( $n=8$  animais por grupo). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$

O aumento da massa relativa do fígado em decorrência do tratamento com DEX ou FM foi inibida com o pré-tratamento com MIFE (Figuras 24A e B). Igualmente, houve inibição da redução da massa esplênica (Figuras 24E e F;  $p < 0,01$ ). O pré-

tratamento com MIFE não interferiu sobre a alteração da massa das glândulas adrenais (Figura 24C e D). Não houve diferença na massa relativa de gorduras retroperitoneais.



**Figura 24. Envolvimento de GR na massa de órgãos de machos após 7 dias de tratamento.** Fígado (A e B), adrenais (C e D), baço (E e F) e gordura retroperitoneal (G e H) de machos pré-tratados com mifepristona (20 mg/kg ip) e após 30 minutos tratados com DEX (1,0 mg/kg ip) ou FM (1 mg/kg ip) por 7 dias. Os valores foram expressos em média  $\pm$  DP e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey (n=8 animais por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 e \*\*\*\*p<0,0001.

## 5.5 RESPOSTA À PERGUNTA EXPERIMENTAL 5: O DESENVOLVIMENTO DE NP DE ZEÍNA CONTENDO FM PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL FOI BEM-SUCEDIDO

NPs de zeína foram obtidas por método de nanoprecipitação e o FM foi carregado em duas concentrações, 5 e 10%. O tamanho médio das NPs carregadas com FM foi maior à medida em que houve maior concentração do fármaco, atingindo 101 e 127 nm, respectivamente (Tabela 4). Valores baixos de Pdl foram obtidos para as formulações vazias e 5% FM, enquanto valores mais elevados foram observados quando utilizado 10% de FM. Os valores de ZP foram de + 12 mV e + 6 mV para as NPs contendo 5% e 10% de FM, respectivamente. Foram obtidos elevados valores de eficiência de associação (>70%) para as duas formulações, com ênfase para a NP 5%, com 96% de AE.

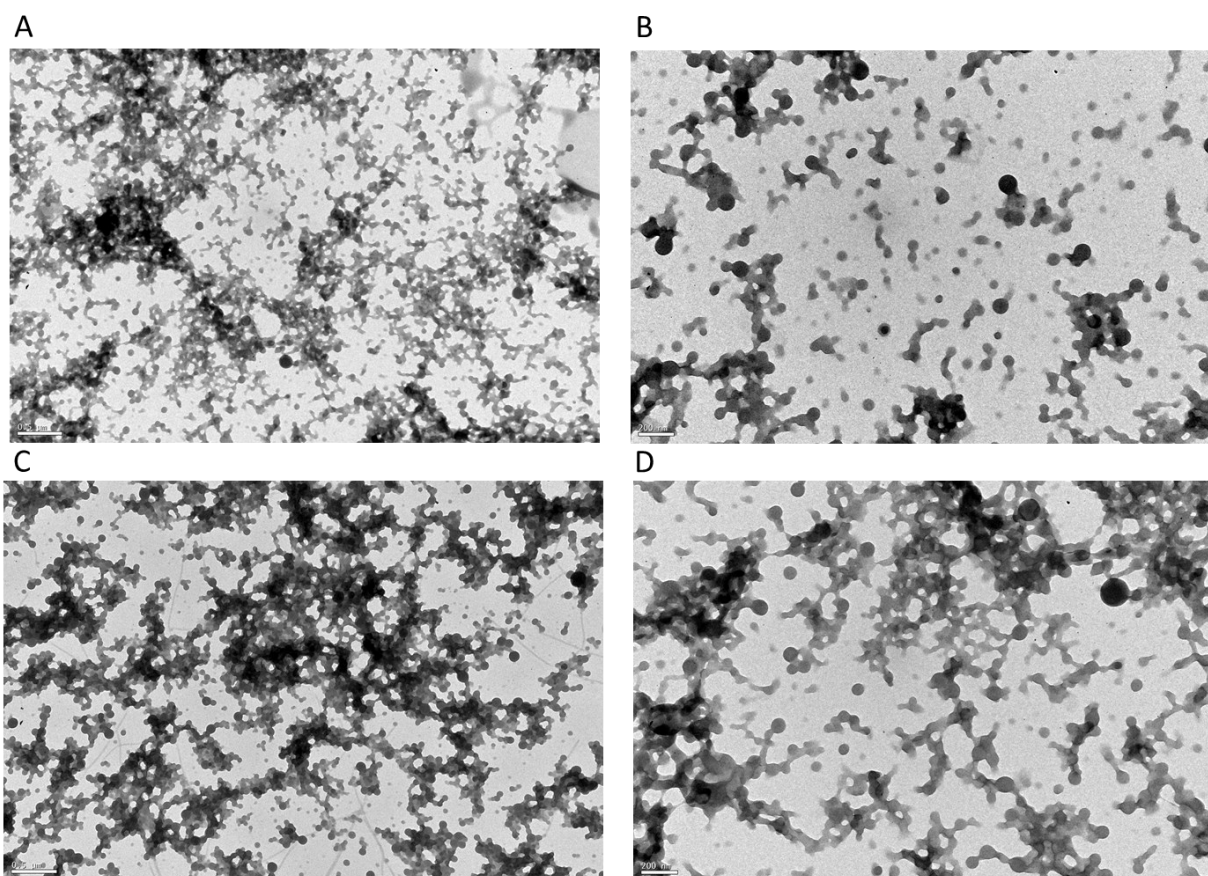


**Tabela 4. Tamanho, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta (ZP), eficiência de associação (AE) e concentração de fármaco (DL) de NPs de zeína contendo FM**

DL teórico (%)	Tamanho (nm)	Pdl	ZP (mV)	DL (%)	AE (%)
0%	102 ± 11	0,137 ± 0,02	14 ± 1,3	-	-
5%	101 ± 2	0,194 ± 0,02	12 ± 2,4	4,6 ± 0,1	96,6 ± 2,2
10%	127,3 ± 3* #	0,352 ± 0,03*** ##	6 ± 0,6 ** #	6,5 ± 1,4	71,2 ± 11,8

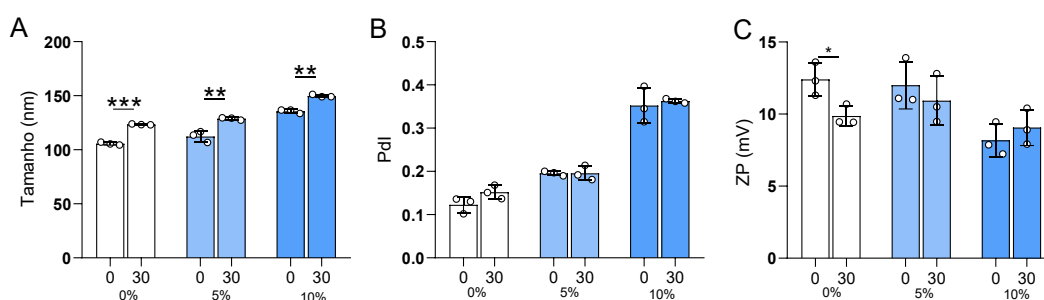
Resultados apresentados como média ± SD (n=3) e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey. \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 quando comparado a NP 0%; #p<0,05 e ##p<0,01 quando comparado a NP 5%.

As imagens obtidas por TEM confirmaram os resultados de tamanho e distribuição de tamanho de NPs de zeína (Figura 25), evidenciado pela forma esférica. A adição de FM não apresentou impacto aparente sobre a morfologia das NPs (Figuras 25C e D).



**Figura 25. Imagens representativas de NPs de zeína vazias (A e B) e 5% FM (C e D). A e C) 0,5 μm; B e D) 200 nm.**

Com relação aos dados de tamanho, Pdl e ZP após 30 dias de armazenamento a 4°C pudemos observar que as NPs vazias ou carregadas com FM (5 e 10%) apresentaram aumento do tamanho (Figura 26A;  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Nenhuma mudança significativa foi observada relacionada a distribuição de tamanho ou do ZP das NPs (Figuras 26B e C).

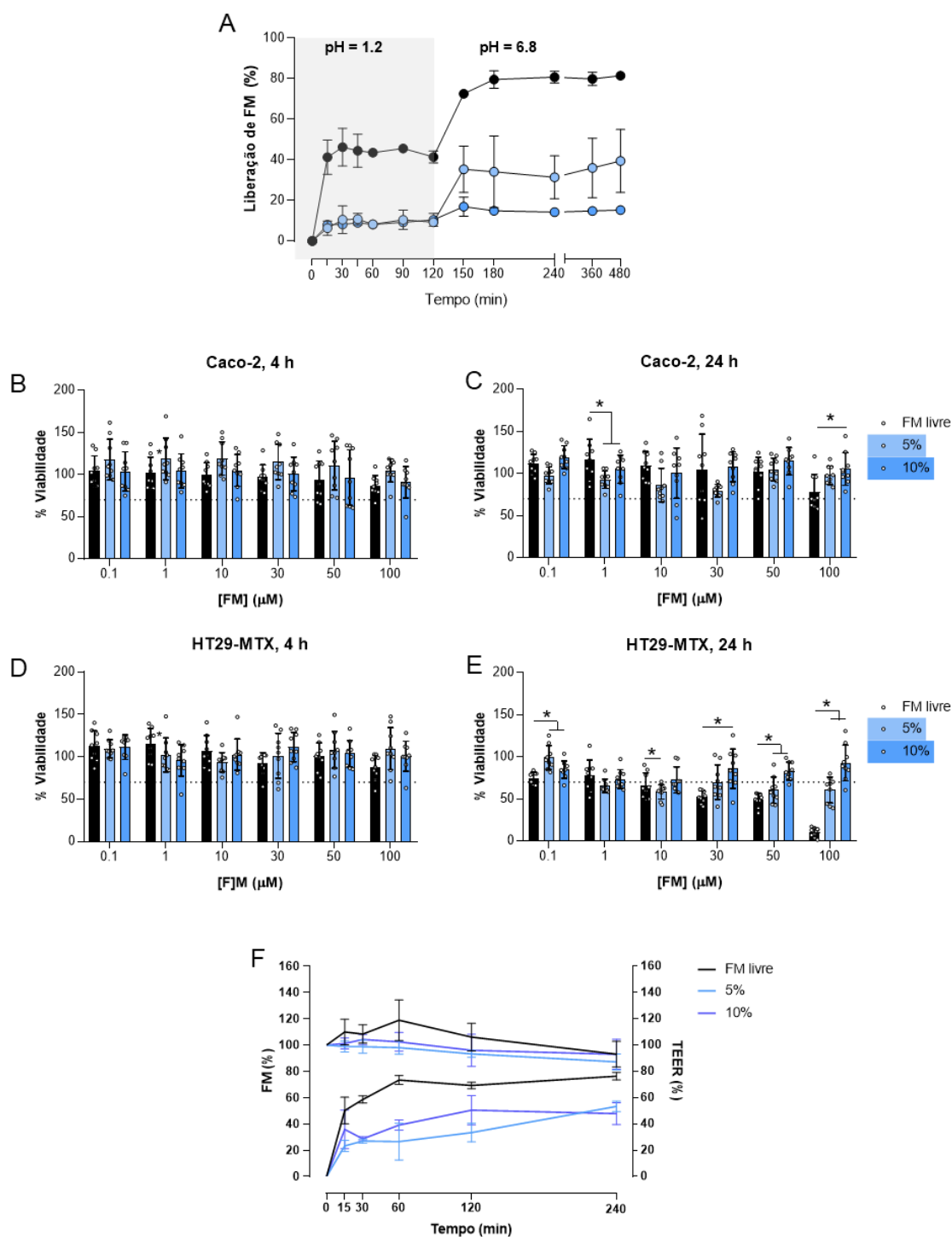


**Figura 26. Características de NPs de zeína contendo FM após a produção e 30 dias armazenadas a 4°C.** Tamanho (A), Pdl (B) e ZP (mV) de NPs de zeína vazias e contendo 5 ou 10% de FM. Resultados apresentados como média  $\pm$  SD (n=3) e analisados com ANOVA de medidas repetidas seguido de *post test* de Tukey. \* $p < 0,05$  comparado a NP 0%.

O comportamento de liberação de FM livre e FM das NPs de zeína em tampão gástrico e intestinal foi analisado (Figura 27A). O padrão de liberação de FM na forma livre foi de aproximadamente 40% em fluido gástrico, mostrando uma rápida liberação nos primeiros 30 min. Já em fluido intestinal, foi atingido o máximo de liberação (80%) após 1 h, se mantendo até o fim das 8 h de experimento. A liberação de FM das NPs de zeína em fluido gástrico foi similar para as NPs 5 e 10%, com aproximadamente 10% de liberação. Em fluido intestinal a NP 5% atingiu a liberação de aproximadamente 40% e esse padrão foi mantido até o término do procedimento (8 h). Já a NP 10% atingiu a liberação de 20% e o padrão foi mantido até o término da análise.

A capacidade de FM livre e NPs de zeína contendo FM afetarem a viabilidade celular também foi avaliada nas linhas celulares de Caco-2 e HT29-MTX, em um período de tratamento de 4 e 24 h. O FM livre e as NPs não afetaram a viabilidade (atividade metabólica acima de 70%) de células Caco-2 após 4 e 24 h de incubação (Figuras 27C e D), igualmente para HT29-MTX após 4 h de incubação (Figura 27E). Contudo, enquanto o FM livre afetou a viabilidade celular de HT29-MTX após 24 h de incubação (Figura 27F), foi observado que as NPs de zeína resultaram em menor toxicidade do que o FM nas concentrações de 30, 50 e 100  $\mu$ M ( $p < 0,05$ ).

A permeação de NPs de zeína contendo FM (50  $\mu$ M) foi analisada a partir de um modelo de monocamadas com células Caco-2/HT29-MTX onde pudemos observar uma rápida difusão através da monocamada de células intestinais atingindo pico de absorção (80%) após 60 min de exposição (Figura 27B). Já as NPs de zeína carregadas com 5 e 10% de FM apresentaram permeabilidade mais lenta e crescente, com aproximadamente 60% ao fim dos 240 min.



**Figura 27. Análises *in vitro* de FM livre e NPs de zeína contendo FM: perfil de liberação de FM em pH gástrico e intestinal, permeabilidade em células intestinais e atividade metabólica de células tratadas com FM ou NPs contendo 5 e 10% de FM.** A) Perfil de liberação *in vitro* de FM de NPs de zeína após produção (n=3); B e C) Atividade metabólica de células Caco-2 após 4 (B) 24 h (C) de incubação com FM livre e NPs contendo 5 e 10% de FM; E e E) Atividade metabólica de células HT29-MTX após 4 (D) 24 h (E) de incubação com FM livre e NPs contendo 5 e 10% de FM (n=3 experimentos independentes). F) Perfil de permeabilidade cumulativa *in vitro* de NPs contendo FM em modelo 2D de células intestinais (Caco-2/HT29-MTX) e respectivo TEER (%), eixo y direito) (n=4). Resultados apresentados como média  $\pm$  SD e analisados com teste ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey. \* $p < 0,05$  quando comparado ao FM livre.

## 6. SUMÁRIO DE RESULTADOS

Parâmetros avaliados	Machos (1 mg/kg)										Fêmeas (1 mg/kg)	
	DEX ip			DEX og		FM ip			FM og		FM ip	FM og
	DEX ip	Revers*	GR			FM ip	Revers*	GR				
Inflamação	↓	/	GR	↓	GR	↓	/	GR	↓	GR	↓	↓
Massa corpórea	↓	√	GR	↓		↓	√	-	↓		↓	↓
Consumo alimentar	↓	√	-	↓		↓	√	-	↓		-	-
Tolerância a glicose	↓	√	GR	↓		↓	√	-	-		-	-
Sensibilidade à insulina	-	-	-	-		↓	√	GR	↓		↓	↓
Insulina plasmática	↑	√	/	↑		↑	√	/	-		↑	↑
Triacilglicerol plasmático	↑	√	GR	↑		↑	√	GR	-		↑	-
Colesterol total plasmático	-	-	-	-		↑	√	GR	-		↑	-
Triacilglicerol hepático	↑	√	GR	↑		↑	√	-	-		↑	↑
Glicogênio hepático	↑	√	GR	↑		-	-	GR	-		-	-

\*Revers: desfecho metabólico reversível 10 dias após a interrupção do tratamento

GR: dependente de receptor de glicocorticoide; - : não houve alteração; / : não analisado



## 7 DISCUSSÃO

Desde a sua descoberta, os GCs se tornaram uma classe medicamentosa amplamente utilizada e eficaz para o tratamento de processos inflamatórios e doenças autoimunes (BUNIM; PECHET; BOLLET, 1955). Dentre os fármacos disponíveis na clínica, o FM foi desenvolvido a partir de modificações estruturais na molécula do cortisol para exibir potente ação anti-inflamatória e possibilitar administração local em distúrbios respiratórios e dérmicos, reduzindo assim a distribuição sistêmica.

Neste trabalho demonstramos pela primeira vez que a administração oral ou intraperitoneal de FM apresenta efeito anti-inflamatório em dois modelos murinos de inflamação, peritonite induzida por carragenina (demonstrado em machos e fêmeas) e colite induzida por DSS (estudado somente em machos). A peritonite neste modelo ocorre por meio de uma resposta inflamatória induzida pela administração intraperitoneal de Cg e que envolve a participação de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2, citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL- $\alpha$  e IL- $\beta$ , IL-6), e moléculas de adesão, como P-selectina e ICAM-1 (FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2001; SUZUKI et al., 2010; UTSUNOMIYA; NAGAI; OH-ISHI, 1991). Esses mediadores são modulados pela administração de GCs, resultando na redução do processo inflamatório (CAIN; CIDLOWSKI, 2017). Neste modelo é possível mensurar o processo inflamatório por meio da quantificação de leucócitos que migram para o peritônio dos animais e o tratamento prévio com o FM foi efetivo em reduzir esse processo tanto em machos quanto em fêmeas, independentemente se administrado pela via ip ou og na dose de 1,0 mg/kg. Os machos desenvolveram uma resposta inflamatória mais exacerbada do que as fêmeas e isso pode ser explicado por níveis elevados de prostaglandinas e COX-2, como observado anteriormente em modelo de pleurisia induzida por Cg (PACE et al., 2017). Em nosso estudo demonstramos que o pré-tratamento com MIFE reverte completamente o efeito anti-inflamatório de DEX e parcialmente o efeito do FM (tanto pela via og ou ip), o que nos permite inferir que o GR está envolvido no processo de mecanismo de redução de migração leucocitária pelo FM. Temos que considerar que o pré-tratamento com MIFE foi realizado na dose de 20 mg/kg para avaliar a participação de GR no efeito de DEX e FM. Porém, FM apresenta uma afinidade por GR cerca de 20 vezes maior comparado a DEX o que provavelmente explique essa resposta parcial da MIFE. Idealmente a dose de MIFE deveria ter sido maior para deslocar o FM do GR devido à elevada competição de FM

pelo receptor. Ainda relacionado a ação anti-inflamatória de FM, um estudo anterior demonstrou que a regulação de genes inflamatórios mediada por FM também está relacionada a sua ação como ligante de FXR, inibindo a subunidade p65 de NF- $\kappa$ B e reduzindo o recrutamento de genes pró-inflamatórios (BIJSMAN *et al.* 2015). Contudo, ao não termos utilizado ferramentas para provar essa a participação de FXR sobre os efeitos anti-inflamatórios de FM *in vivo* em nosso estudo, não podemos afirmar que tal mecanismo é o que justifica exclusivamente a ausência de efeito da MIFE.

Visando consolidar o efeito anti-inflamatório de FM administrado pela via og, partimos para o modelo de colite induzida por DSS, que se caracteriza pela instalação de um processo inflamatório intestinal limitado a mucosa colônica devido a ativação de células da imunidade inata (WIRTZ *et al.*, 2007). Considerando que o FM foi projetado com o objetivo de uma administração tópica/intranasal (local) e para ter menor biodisponibilidade, selecionamos um modelo de inflamação restrita. Como esperado, a administração de DSS em camundongos induziu sinais típicos da colite ulcerativa em humanos, tais como fezes sanguinolentas, diarreia, perda de peso e encurtamento do cólon. Ambos os tratamentos com GCs atenuaram o quadro inflamatório. O tratamento orogástrico com FM promoveu uma atenuação do quadro inflamatório até melhor do que o observado no grupo DEX como pôde ser inferido pelos dados de IAD e migração leucocitária para o tecido inflamado, este último visto indiretamente pela quantificação da atividade da MPO. Estes resultados reforçam o efeito do FM na redução do processo inflamatório e no dano tecidual associados à migração de neutrófilos e nos remete a hipótese de que suas ações anti-inflamatórias parecem ser mediadas por FXR, ainda que não possamos excluir que o FM também exerça seus efeitos via GR. Em apoio à nossa hipótese, há evidências de que o FXR é um receptor expresso em fígado e intestino, estando presente também em enterócitos e células L e, com base nessa informação, alguns autores reforçam a utilização de agonistas de FXR para o tratamento de doenças inflamatórias intestinais (BIJSMANS *et al.*, 2015; GADALETA *et al.*, 2011a, 2011b; HIGASHIYAMA; KINOSHITA; ASANO, 2008; TURNER *et al.*, 2011). Corroboram nossa hipótese, estudos demonstrando que o tratamento com ácido obeticólico, um agonista pleno de FXR, atenua a progressão da colite e parâmetros histológicos de cólon de camundongos submetidos a colite induzida por DSS ou por ácido trinitrobenzano sulfônico (GADALETA *et al.*, 2011a, 2011b).



Após consolidar o efeito anti-inflamatório de FM quando administrado por vias sistêmicas em roedores, tratamos os animais durante 7 dias para verificar possível impacto no metabolismo de glicose e lipídeos. Os efeitos adversos da DEX sobre o metabolismo quando utilizada em doses elevadas ou por períodos prolongados estão bem consolidados (PASIEKA; RAFACHO, 2016; RAFACHO, A; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, 2012; SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002). Em nosso estudo priorizamos o uso da DEX como controle positivo em função de suas propriedades diabetogênicas bem descritas que incluem: 1) aumento da gliconeogênese hepática; 2) secreção de insulina insuficiente de células  $\beta$  frente ao quadro de resistência à insulina; 3) ação lipogênica em tecido adiposo visceral e lipolítica em tecido adiposo subcutâneo e 4) redução da captação de glicose estimulada por insulina no músculo esquelético (DOS SANTOS et al., 2014; MOTTA et al., 2015; PASIEKA; RAFACHO, 2016; RAFACHO et al., 2008, 2011). Neste trabalho, observamos que a administração do FM por via ip induz: menor tolerância à glicose (apenas machos) menor sensibilidade à insulina, aumento dos valores de insulina plasmática e dislipidemia. Já pela via og a administração de FM provocou menos efeitos adversos, limitado à redução da sensibilidade à insulina (machos e fêmeas) e ao aumento da insulina plasmática (apenas fêmeas). O uso da MIFE como ferramenta farmacológica nos permitiu identificar que os efeitos metabólicos de FM ip são dependentes de GR e ainda pudemos demonstrar que esses efeitos metabólicos são reversíveis após a interrupção do tratamento.

A redução do peso corpóreo, bem como a redução do consumo alimentar ao longo do tratamento com FM em machos e fêmeas corrobora achados anteriores que demonstram o efeito anorexígeno a doses elevadas (e.g., 1,0 mg/kg) de DEX (MOTTA et al., 2015; RAFACHO et al., 2008). Esse processo encontra respaldo com a ação anorexígena da insulina no hipotálamo (WOODS et al., 1979) que poderia ser explicado pelos valores elevados de insulina plasmática em nossos animais tratados com FM. Porém, esse desfecho não foi observado em machos tratados com FM pela via oral. A perda de massa corpórea desses animais pode envolver maior contribuição da ativação de FXR, pois estudos demonstraram o envolvimento desse receptor na manutenção e perda de massa corpórea de animais obesos devido a melhora do metabolismo glicêmico e lipídico (FANG et al., 2015; ZHANG et al., 2006). Nesse sentido, já é possível encontrar moléculas consideradas agonistas de FXR sendo estudadas para o tratamento da obesidade e síndrome metabólica (FANG et al., 2015;

LIU et al., 2018; MAGALHAES; MICHAEL; RONALD, 2017; PRAWITT et al., 2011; THRASHER, 2017).

O tratamento subcrônico com FM não resultou em maiores níveis de glicose sanguínea, porém os animais apresentaram maiores níveis de insulina plasmática (com exceção dos machos tratados pela via og) e maior massa de células  $\beta$  pancreáticas (dados não foram apresentados nesta tese) quando comparado aos grupos controles. O aumento da insulina plasmática causada pela administração de GCs é resultado de uma resposta compensatória à menor sensibilidade periférica a insulina onde ocorre aumento da função das células  $\beta$ , seja por aumento da capacidade secretória (maior acoplamento entre o estímulo e a secreção) ou pelo aumento da massa de células  $\beta$  via hiperplasia e/ou hipertrofia celular (RAFACHO et al., 2014; RAFACHO, A; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, 2012; RAFACHO; C.; ORTSATER, 2012). Portanto a resposta compensatória apresentada pelos animais tratados com FM foram suficientes para manter os valores de glicose sanguínea similares ao do grupo controle, o que não se observa após o tratamento com DEX og. Embora normoglicêmicos, observamos que os animais tratados com FM apresentaram menor sensibilidade à insulina quando submetidos ao ITT. No entanto, a determinação da abundância de proteínas relacionadas a ativação da via de sinalização da insulina no fígado (AKT, CREB, Glut2) não foi alterada. Esses dados indicam que vias *downstream* no fígado podem estar afetadas num momento mais tardio e a disfunção inicial seja no tecido adiposo ou músculo (MOTTA et al., 2015). É importante salientar que a determinação do conteúdo proteico foi realizada em amostras obtidas de animais em jejum e numa condição não estimulada, o que pode mascarar o impacto sobre a via de sinalização da insulina. Além disso, os maiores níveis de insulina plasmática podem ser devido ao impacto negativo dos GCs sobre a atividade da enzima IDE, como demonstrado em estudo anterior em ratos tratados por 5 dias com DEX na mesma dose escolhida em nosso estudo (PROTZEK et al., 2016). Neste último estudo foi possível observar que a IDE hepática está menos ativada em ratos tratados com DEX o que resulta em menor depuração hepática da insulina, evento que pode ser parte da resposta compensatória à menor sensibilidade pela insulina na periferia.

Nossos experimentos com GTT revelaram menor tolerância à glicose nos machos tratados com FM pela via ip. Já está bem demonstrado que a hipersecreção de insulina em resposta à glicose nos ratos tratados com DEX é incapaz de evitar a

intolerância à glicose (RAFACHO et al., 2010). Contudo, não avaliamos a resposta secretória *in vivo* nos animais tratados com FM para concluirmos se esta intolerância tem relação com menor função secretória. A ausência de efeito do FM sobre a tolerância à glicose nas fêmeas coincide com estudo desenvolvido em nosso laboratório em que se avaliou o impacto do sexo e da idade sobre os desfechos promovidos pelo tratamento com a DEX na homeostase glicêmica (DOS SANTOS et al., 2014). Neste estudo foi observado que as fêmeas adultas (3 meses de idade) tratadas com DEX (1,0 mg/kg, ip) seguem normotolerantes por meio de maior resposta secretória de insulina à glicose; resposta que diminui em ratas ao atingirem os 12 meses de idade. Ainda, estudos com roedores e humanos indicam que o 17 $\beta$ -estradiol tem efeito protetor para a resistência à insulina induzida por ácidos graxos e, a ativação de receptor de estradiol melhora a síntese de insulina estimulada por glicose (GSIS). Portanto, as fêmeas podem ter uma ação protetora aos efeitos dos GCs sobre a homeostase glicêmica num contexto em que se exige uma resposta secretória de insulina, como no caso prandial (DOS SANTOS et al., 2014; FRIAS et al., 2001; HEVENER et al., 2002; SORIANO et al., 2009). Já o perfil farmacocinético dos GCs parece não ser o fator decisivo para a presença da intolerância à glicose nos machos. Um estudo conduzido em ratos comparou o perfil farmacocinético de metilprednisolona (50 mg/kg, im) entre machos e fêmeas e demonstrou que a depuração do GC foi cerca de 3 vezes mais rápida nos machos, independentemente da fase de ciclo estral em que as fêmeas se encontravam. Apesar dessa diferença, os efeitos da metilprednisolona sobre supressão adrenal foram observados em ambos os sexos (AYYAR et al., 2019). Esses achados são corroborados por outro estudo onde fêmeas e machos foram tratados com DEX (2.25 mg/kg, sc) e foi observado que os machos apresentaram uma depuração ligeiramente mais rápida do que nas fêmeas (SONG et al., 2020). Ainda, outro ponto que pode afetar a tolerância à glicose nos machos é a disfunção das células  $\alpha$  pancreáticas, como já demonstrado por nosso grupo por meio do modelo de tratamento com a DEX (1,0 mg/kg, ip). Após 5 dias de tratamento os ratos apresentaram maiores valores de glucagon plasmático em jejum ou alimentados, prejuízo da supressão da secreção de glucagon estimulada por glicose e maior massa de células  $\alpha$  pancreáticas (RAFACHO et al., 2014b). Neste trabalho não quantificamos o glucagon plasmático, mas após o término da quantificação da massa de células  $\alpha$  a partir de imunofluorescência poderemos ter uma indicação do impacto do FM nessas células (dados não apresentados).

Os efeitos dos GCs sobre o metabolismo de glicose de ratos incluem o aumento da gliconeogênese hepática e estudos anteriores demonstraram que o tratamento com DEX aumenta a produção de glicose hepática a partir de substratos provenientes de vias de lipólise e proteólise e aumento da atividade de enzimas gliconeogênicas, como a PEPCK e G6Pase (NUNES et al., 2013; RIZZA; MANDARINO; GERICH, 1982). Os dados que revelaram acúmulo de glicogênio hepático por efeito da DEX (ip e og) (revertido pelo pré-tratamento com MIFE), mas não pelo tratamento com FM parece concordar com nossa hipótese de que algumas ações do FM são mediadas por FXR. Alguns estudos já demonstraram que ativação de FXR pode até mesmo reduzir o armazenamento de glicogênio hepático devido a repressão de PEPCK e a G6Pase (DURAN-SANDOVAL et al., 2005; ZHOU; ANAKK, 2022). Vale ressaltar que não detectamos diferenças no conteúdo hepático de PEPCK de animais tratados com DEX ou FM, mas não podemos descartar que a atividade da enzima não esteja modificada.

O tratamento com GCs, a depender da dose e do tempo de administração, promove dislipidemia e desenvolvimento de esteatose hepática (PECKETT; WRIGHT; RIDDELL, 2011; PASIEKA; RAFACHO, 2016). O desenvolvimento da esteatose hepática pode ser consequência de diversas disfunções, incluindo redução da capacidade de  $\beta$ -oxidação e maior atividade das vias de sinalização envolvidas na síntese de ácidos graxos (NGUYEN et al., 2008; WU et al., 2017). O acúmulo de triacilglicerol hepático em animais tratados com DEX e FM (ip para machos e og e ip em fêmeas) pode estar associado à maior taxa de lipólise de tecido adiposo, que forneceria substrato para o metabolismo lipídico no fígado (PASIEKA; RAFACHO, 2016).

Um indício de que o processo de lipólise está ocorrendo após 7 dias de tratamento com FM é observado pela redução da massa de tecido adiposo retroperitoneal em machos e gonadal em fêmeas. As concentrações de colesterol total e colesterol HDL plasmáticas foram maiores em machos e fêmeas tratados com FM pela via ip, o que sugere que a administração por essa via resulta em dislipidemia, enquanto pela via og os animais mantêm a homeostase lipídica. Considerando que a MIFE preveniu a dislipidemia nos animais tratados com FM pela via ip (não temos essa informação para o grupo og) podemos inferir que ou temos menor biodisponibilidade do fármaco quando administrado pela via oral, ou há alguma resposta que depende da farmacocinética em cada caso. Estudos anteriores

demonstraram que animais *knockout* para FXR tem maiores valores de triacilglicerol e colesterol plasmático e hepático, e elevados valores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e o tratamento de roedores com agonistas de FXR previne a dislipidemia causada por dieta hiperlipídica (MA et al., 2013; ZHOU; ANAKK, 2022).

Um dado que nos chamou a atenção foi a redução da massa das adrenais de animais tratados com FM pela via ip assim como ocorre por efeito do tratamento com a DEX. Essa diminuição pode ser decorrente da atenuação da síntese endógena de GCs indicando maior contribuição dos GRs (RAFACHO et al., 2008; SCHÄCKE; DÖCKE; ASADULLAH, 2002a). Esse desfecho não foi observado em ratos tratados com FM pela via og, o que reforça a hipótese que o FM não age exclusivamente via GR.

Quando administrado por via og, os efeitos de FM são limitados a redução da sensibilidade a insulina em machos e fêmeas, e maiores valores de insulina e triacilglicerol plasmáticos somente em fêmeas. A via de administração é um fator importante para o perfil farmacocinético e farmacodinâmico de um fármaco (AL SHOYAIB; ARCHIE; KARAMYAN, 2020a; TURNER et al., 2011). Ao comparar um fármaco administrado na mesma dose por via ip e og, em diferentes espécies, se observa menor biodisponibilidade quando administrado por via oral devido a absorção mais lenta do trato gastrointestinal e possível degradação gástrica (GERASIMOV et al., 2000). Após administração ip ocorre rápida absorção da cavidade peritoneal e o fármaco pode seguir duas vias para atingir a circulação sistêmica: ser absorvido através do peritônio visceral e drenado para a circulação portal (compostos de baixo peso molecular), ou o fármaco entra na circulação sistêmica contornando diretamente o fígado, sendo absorvido através do peritônio parietal e circulação linfática (macromoléculas) (AL SHOYAIB et al., 2020; GERASIMOV et al., 2000; MARCO & LEVINE, 1969). Dada a rápida absorção de grande parte dos fármacos da cavidade peritoneal, trabalhos consideram que a exposição sistêmica de uma substância administrada por via ip é próxima da iv (LUKAS et al., 1971). Estudos de biodisponibilidade em roedores de fármacos com peso molecular semelhantes ao FM (521 g/mol) demonstraram que a biodisponibilidade do composto é aproximadamente 6 vezes maior quando administrado por via ip, comparado a via og (HU et al., 2012; NEMES et al., 2000). Affrime e colaboradores (2000) realizaram um estudo farmacocinético em humanos tratados com uma dose de FM (400 µg, iv) e

demonstraram que o a concentração plasmática máxima de fármaco foi de 6818 pg/ml, o pico de concentração foi após 25 min e o  $t_{1/2}$  foi aproximadamente 4,4 h (AFFRIME et al., 2000). Portanto, a menor quantidade de efeitos metabólicos causados pelo FM quando administrado por via oral pode se justificar por uma menor biodisponibilidade do fármaco. Porém, vale ressaltar que mesmo diante de uma eventual menor concentração plasmática de FM essa ainda é suficiente para apresentar efeito anti-inflamatório comparável à DEX e ao FM ip. Nosso trabalho será o primeiro a analisar o perfil de biodisponibilidade de FM pela via og e ip e, a partir desses resultados (serão complementados na defesa), poderemos concluir se há diferenças farmacocinéticas e se podem estar relacionadas a ausência de efeitos metabólicos após administração oral.

Considerando que ambas as vias de administração são absorvidas para o sistema porta-hepático, estudos anteriores demonstraram que o FM sofre metabolização hepática, resultando nos metabólitos 6 $\beta$ -OH FM e 9,11-epoxi FM (VALOTIS; HÖGGER, 2004). Esses metabólitos secundários têm uma afinidade por GR duas vezes maior que a DEX (afinidade por GR: 100), mas menor que o FM intacto (afinidade por GR: 2000) (VALOTIS; HÖGGER, 2004) e o 6 $\beta$ -OH FM tem atividade farmacológica comprovada (SAHASRANAMAN; ISSAR; HOCHHAUS, 2006; VALOTIS et al., 2004; VALOTIS; HÖGGER, 2004). As diferenças entre as respostas após a administração ip ou og podem ocorrer também por uma extensa metabolização de primeira passagem de FM após a administração og, mas em magnitude inferior quando da administração por via ip. Considerando que a afinidade relativa de FM por GR é de 2000 enquanto a do 6 $\beta$ -OH FM é de 200 (comparado à afinidade de DEX), o FM pode apresentar maior efeito metabólico por agir preferencialmente sobre GR (como demonstramos nos experimentos com o pré-tratamento com MIFE), enquanto o 6 $\beta$ -OH FM pode apresentar um perfil de resposta diferente. Porém, uma limitação deste trabalho é que não exploramos o envolvimento de FXR na resposta de FM e não analisamos o envolvimento de metabólitos secundários.

É importante ressaltar que, apesar do FM apresentar efeitos no metabolismo glicêmico e lipídico quando administrado por via ip, esses efeitos são menores quando comparados ao tratamento com DEX. Isso pode envolver possível ação do FM como um agonista tendencioso de GR que resultaria em maior interação GR-GR/proteína e preferencialmente transrepressão gênica em detrimento da via de transativação (SCHESCHOWITSCH; LEITE; ASSREUY, 2017). Heuvel e colaboradores (2016)

desenvolveram um estudo com camundongos expostos a dieta hipercalórica e tratados com um modulador seletivo de GR por 4 semanas. Os achados demonstraram que esse modulador melhora os efeitos metabólicos deletérios causados pela dieta (por ação antagonista de GR) e apresenta efeito anti-inflamatório em tecido adiposo (por ação agonista de GR) (VAN DEN HEUVEL et al., 2016).

Todos os parâmetros metabólicos alterados em machos após a administração de FM ip, como redução do peso corporal, hipotrofia das glândulas adrenais, aumento do conteúdo de glicogênio hepático, diminuição da sensibilidade a insulina e tolerância à glicose e dislipidemia foram restaurados aos valores encontrados em ratos CTL, após a descontinuação do tratamento. Isso está de acordo com estudos prévios em animais que demonstram a reversibilidade dos efeitos dos GCs sobre o metabolismo se forem utilizados com cautela (FRANSSON et al., 2013; RAFACHO et al., 2010). Contudo, em regimes mais prolongados ou doses mais elevadas ou até mesmo em situações em que já haja alguma predisposição como em pacientes com intolerância à glicose, obesos ou diabéticos é preciso que mais estudos explorem essas evidências.

Este trabalho é o primeiro que desenvolve e caracteriza uma NP contendo FM para administração oral e avalia a permeação em células intestinais. A zeína é uma proteína anfifílica com importante capacidade de interagir com fármacos e após a adição de um solvente insolúvel, facilmente precipita e forma NP. Além disso, a zeína apresenta propriedades mucoadesivas e resistência ao efeito de enzimas digestivas. NPs de zeína carregadas com FM foram desenvolvidas com sucesso usando uma técnica simples de nanoprecipitação, de baixo custo e fácil reprodutibilidade (NUNES et al., 2020). NPs apresentaram propriedades coloidais adequadas para liberação oral de drogas e alto AE. A agregação das NPs de zeína observadas por meio do TEM podem ser uma consequência do aumento interações hidrofóbicas ou emaranhamento físico da proteína (SANTOS et al., 2019).

A liberação prolongada de FM foi observada em experimento *in vivo* em pH gástrico e intestinal. Essa liberação lenta pode diminuir a metabolização hepática e as propriedades mucoadesivas de zeína podem aumentar a residência das NPs na mucosa intestinal. Quando administradas por via oral, NPs de zeína se movem mais lentamente no trato gastrointestinal, interagindo com o muco produzido pelo epitélio intestinal (NUNES et al., 2020; PALIWAL; PALAKURTHI, 2014), portanto, o FM estaria biodisponível por um período mais longo. É importante notar que, embora o pequeno

tamanho das NPs facilite a absorção aprimorada de fármacos, o encapsulamento de substâncias ativas em nanoformulações geralmente resulta em diminuição da depuração da circulação sistêmica e, finalmente, maior exposição ao fármaco (AL SHOYAIB; ARCHIE; KARAMYAN, 2020b). Porém, a liberação lenta de FM em pH intestinal poderá resultar em menor depuração e o FM se manteria biodisponível por mais tempo. Se isso for confirmado, poderia resultar em efeitos anti-inflamatórios mais duradouros e, ao se buscar as menores doses possíveis, evitaria a presença dos efeitos indesejados.

O perfil de baixa citotoxicidade da zeína são bem descritos e justificaria a sua utilização como uma matriz segura para entrega de fármacos (DONG; SUN; WANG, 2004). As NPs de zeína contendo FM estudadas neste trabalho foram capazes de diminuir a toxicidade aparente do FM em células HT29-MTX demonstrando ser tão seguras para esse modelo intestinal quanto o fármaco livre.

A permeabilidade intestinal *in vitro* foi investigada através do modelo de cocultura Caco-2/HT29-MTX e nesse modelo, além da presença dos enterócitos, temos a influência da camada de muco produzida pelas células HT29-MTX. Observamos que a permeação de FM ocorreu gradualmente e, ao fim do experimento, aproximadamente 80% do fármaco alcançou a estrutura basolateral. Esse resultado nos indica que o FM tem potencial de ser absorvido no intestino e possivelmente estará biodisponível por meio da administração oral. Durante o teste de permeabilidade foram realizadas medições de TEER para monitorar a integridade das monocamadas celulares. As células tratadas com FM apresentaram uma leve redução valores de TEER ao longo do tempo, o que pode resultar em junções entre células mais frouxas e conseqüentemente transporte transepitelial do fármaco (ARAÚJO; SARMENTO, 2013a; MACEDO et al., 2022). Ainda, observamos diferenças na permeabilidade do fármaco livre e incorporado na NP, e isso pode se dar devido a presença da camada de muco formada pelas células. Devido ao caráter hidrofóbico, o FM pode estabelecer interações com a mucina e essas interações podem dificultar o transporte da molécula pela membrana (ARAÚJO; SARMENTO, 2013b; LECHANTEUR; DAS NEVES; SARMENTO, 2018). A menor permeabilidade de FM a partir das NPs pode ocorrer porque no pH do ensaio (pH 7,4) as NPs de zeína se carregam negativamente e em contato com o muco (também carregado negativamente) pode resultar em menor gradiente elétrico para as partículas (GAGLIARDI et al., 2018). Considerando que a permeabilidade do FM livre através da



co-cultura Caco-2/HT29-MTX foi maior ao passo que a liberação e permeabilidade do FM a partir das NPs foi mais prolongada, as NPs contendo FM seriam uma potencial formulação para liberação lenta de FM para o tratamento de doenças inflamatórias, sem a presença de efeitos adversos metabólicos.

## 8 CONCLUSÃO

Em conclusão, o tratamento com FM pelas vias sistêmicas (intraperitoneal e oral) previne a peritonite aguda (pelas vias ip e og) e atenua a colite num contexto subcrônico em roedores (pela via og). Quando administrado de forma subcrônica, o tratamento com FM pela via ip resulta em efeitos adversos sobre o metabolismo glicêmico e lipídico de machos e fêmeas e a maior parte desses efeitos são dependentes de GR. Esses efeitos adversos causados pelo tratamento ip em machos são reversíveis após a interrupção do tratamento. Quando administrado por via og, o FM apenas atenua a sensibilidade à insulina sem qualquer impacto sobre o metabolismo lipídico indicando que o FM pode causar menos efeitos adversos a despeito de manter as propriedades anti-inflamatórias. Por fim, o FM pode ser um corticoide sintético candidato à entrega pelo sistema de encapsulamento em nanopartículas de zeína devido sua capacidade de atravessar a barreira intestinal *in vitro* e liberação lenta.

Ainda que não tenhamos chegado a uma conclusão robusta sobre a biodisponibilidade do FM pelas vias ip e og, bem com sobre seu mecanismo de ação envolvendo os FXR, tudo indica que parte de suas ações metabólicas e anti-inflamatórias são GR-dependentes. Assim, esperamos que estudos futuros possam avaliar a possibilidade de incluir o FM dentre os GCs potencialmente seguros para fins anti-inflamatórios sistêmicos. Nesse sentido, considerando que o FM foi desenhado para ter uma absorção pulmonar (e por extensão, intestinal) restrita e que após a administração oral apresenta menores efeitos metabólicos, podem ser desenvolvidos estudos para consolidar a utilização de FM no tratamento de doenças intestinais, como em doença de Crohn e colite ulcerativa, onde o principal efeito do fármaco seria no trato gastrointestinal.

## 9 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Uma limitação de nosso estudo reside em não sabermos como se dá a farmacocinética do FM entregue pela via ip ou og que justifique a presença ou ausência de efeitos indesejáveis, respectivamente. Portanto a ausência da avaliação do perfil farmacocinético de FM após a administração oral limita o alcance de nossas interpretações e exige estudos complementares para que se possa esclarecer se uma eventual menor biodisponibilidade pode justificar a menor quantidade de efeitos metabólicos indesejáveis.

Outra limitação é foi não ter explorado o impacto do bloqueio do FXR nas situações em que foram observadas ações terapêuticas desejáveis (ação anti-inflamatória) nem nas situações em que ocorreram as ações indesejáveis (desfechos metabólicos). Para isso são necessários estudos que comprovem a participação de FXR durante o tratamento com FM como o uso de um antagonista de FXR (e.g., gugolsterona), a fim de se avaliar o envolvimento desse receptor nos efeitos do FM.

Os resultados apresentados também abrem possibilidades para o desenvolvimento de novas formulações contendo FM e utilizando tecnologias de direcionamento de NPs, para que essas ajam em tecidos específicos e reduzam ainda mais efeitos indesejados. A liberação prolongada de FM da NP de zeína pode prolongar a biodisponibilidade do fármaco e aumentar os intervalos de tempo entre as administrações. Experimentos para verificar o efeito anti-inflamatório e metabólicos das NPs contendo FM podem ser realizados.

## 10 REFERÊNCIAS

- ADCOCK, I. M.; MUMBY, S. Glucocorticoids. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l.] Springer New York LLC, 2016. v. 237p. 171–196.
- AFFRIME, M. B. et al. Bioavailability and metabolism of mometasone furoate following administration by metered-dose and dry-powder inhalers in healthy human volunteers. **Journal of clinical pharmacology**, v. 40, n. 11, p. 1227–1236, 2000.
- AL SHOYAIB, A.; ARCHIE, S. R.; KARAMYAN, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 1, 1 jan. 2020a.
- AL SHOYAIB, A.; ARCHIE, S. R.; KARAMYAN, V. T. Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? **Pharmaceutical Research**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 1 jan. 2020b.
- ANDREWS, R. C. et al. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clinical Science**, v. 96, n. 5, p. 513–523, 1999.
- ANGELINI, N. 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, 4 fev. 2010.
- ARAÚJO, F.; SARMENTO, B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. **International journal of pharmaceuticals**, v. 458, n. 1, p. 128–134, 2013a.
- ARAÚJO, F.; SARMENTO, B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 458, n. 1, p. 128–134, 15 dez. 2013b.
- AUSTIN, R. J. H. et al. Mometasone furoate is a less specific glucocorticoid than fluticasone propionate. **European Respiratory Journal**, v. 20, n. 6, p. 1386–1392, 2002.
- AYYAR, V. S. et al. Modeling corticosteroid pharmacokinetics and pharmacodynamics, Part II: Sex differences in methylprednisolone pharmacokinetics and corticosterone suppressions. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 370, n. 2, p. 327–336, 1 ago. 2019.
- BAIULA, M.; SPAMPINATO, S. Mapracorat, a novel non-steroidal selective glucocorticoid receptor agonist for the treatment of allergic conjunctivitis. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 13, n. 5, p. 289–298, 1 jan. 2014.
- BEAUMONT, P. et al. Trans- $\epsilon$ -Viniferin Encapsulation in Multi-Lamellar Liposomes: Consequences on Pharmacokinetic Parameters, Biodistribution and Glucuronide Formation in Rats. **Nutrients**, v. 13, n. 12, 1 dez. 2021.
- BELVISI, M. G. et al. Therapeutic Benefit of a Dissociated Glucocorticoid and the Relevance of In Vitro Separation of Transrepression from Transactivation Activity. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 1975–1982, 1 fev. 2001.
- BIJSMANS, I. T. G. W. et al. The glucocorticoid mometasone furoate is a novel FXR ligand that decreases inflammatory but not metabolic gene expression. **Scientific Reports**, v. 5, n. September, p. 1–12, 2015.
- BODOR, N.; BUCHWALD, P. Corticosteroid design for the treatment of asthma: structural insights and the therapeutic potential of soft corticosteroids. **Current pharmaceutical design**, v. 12, n. 25, p. 3241–3260, 1 set. 2006.
- BONAVENTURA, A.; MONTECUCCO, F. Steroid-induced hyperglycemia: An underdiagnosed problem or clinical inertia? A narrative review. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 139, p. 203–220, 2018.

- BOURKE, J.; COULSON, I.; ENGLISH, J. Guidelines for the management of contact dermatitis: an update. **BJD British Journal of Dermatology**, v. 160, p. 946–954, 2009.
- BUNIM, J. J.; PECHET, M. M.; BOLLET, A. J. Studies on metacortandralone and metacortandracin in rheumatoid arthritis: Antirheumatic potency, metabolic effects, and hormonal properties. **Journal of the American Medical Association**, v. 157, n. 4, p. 311–318, 22 jan. 1955.
- BURÉN, J. 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, 1 jun. 2008.
- BUTTGEREIT, F. et al. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: An update on the mechanisms of action. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 11, p. 3408–3417, 1 nov. 2004.
- CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017.
- CAVET, M. E. et al. Anti-allergic effects of mapracorat, a novel selective glucocorticoid receptor agonist, in human conjunctival fibroblasts and epithelial cells. **Molecular Vision**, v. 19, p. 1515–1525, 2013.
- CHASSAING, AITKEN, MALLESHAPPA, V.-K. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. **NIH Public Access**, v. 18, p. 1199–1216, 2013.
- CONRADO, D. J. et al. Predicting the probability of successful efficacy of a dissociated agonist of the glucocorticoid receptor from dose–response analysis. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 43, n. 3, p. 325–341, 1 jun. 2016.
- DONG, J.; SUN, Q.; WANG, J. Y. Basic study of corn protein, zein, as a biomaterial in tissue engineering, surface morphology and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 25, n. 19, p. 4691–4697, 1 ago. 2004.
- DOS SANTOS, C. 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.
- DURAN-SANDOVAL, D. et al. THE FARNESOID X RECEPTOR MODULATES HEPATIC CARBOHYDRATE. p. 1–22, 2005.
- FANG, S. et al. Intestinal FXR agonism promotes adipose tissue browning and reduces obesity and insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 21, n. 2, p. 159–165, 2015.
- FISH, J. E. et al. Inhaled mometasone furoate reduces oral prednisone requirements while improving respiratory function and health-related quality of life in patients with severe persistent asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 5, p. 852–860, nov. 2000.
- FRANSSON, L. et al.  $\beta$ -Cell adaptation in a mouse model of glucocorticoid-induced metabolic syndrome. **The Journal of endocrinology**, v. 219, n. 3, p. 231–241, dez. 2013.
- FRIAS, J. P. et al. Decreased Susceptibility to Fatty Acid–Induced Peripheral Tissue Insulin Resistance in Women. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1344–1350, 1 jun. 2001.
- FRÖDE, T. S.; SOUZA, G. E. P.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$  in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162–168, 7 fev. 2001.
- GADALETA, R. M. et al. Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. **Gut**, v. 60, n. 4, p. 463–472, abr. 2011a.

- GADALETA, R. M. et al. Activation of bile salt nuclear receptor FXR is repressed by pro-inflammatory cytokines activating NF- $\kappa$ B signaling in the intestine. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1812, n. 8, p. 851–858, ago. 2011b.
- GAGLIARDI, A. et al. Sodium deoxycholate-decorated zein nanoparticles for a stable colloidal drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 601–614, 30 jan. 2018.
- GOMES, F. A. et al. Glucose homeostasis is not affected in a murine model of Parkinson's disease induced by 6-OHDA. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JAN, 2019.
- GRISWOLD, D. E. et al. SK&F 86002: a structurally novel anti-inflammatory agent that inhibits lipoxygenase- and cyclooxygenase-mediated metabolism of arachidonic acid. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 20, p. 3463–3470, 15 out. 1987.
- HARTMAN, F. A.; BROWNELL, K. A. **The hormone of the adrenal cortex** *Science*, 18 jul. 1930. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17819455>>. Acesso em: 14 abr. 2020
- HEVENER, A. et al. Female Rats Do Not Exhibit Free Fatty Acid–Induced Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 51, n. 6, p. 1907–1912, 1 jun. 2002.
- HIGASHIYAMA, H.; KINOSHITA, M.; ASANO, S. Immunolocalization of farnesoid X receptor (FXR) in mouse tissues using tissue microarray. **Acta histochemica**, v. 110, n. 1, p. 86–93, 14 jan. 2008.
- HOCHHAUS, G. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of mometasone furoate nasal spray: Potential effects on clinical safety and efficacy. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 1, p. 1–13, 2008.
- HOFKENS, W. et al. Liposomal targeting of glucocorticoids to the inflamed synovium inhibits cartilage matrix destruction during murine antigen-induced arthritis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 416, n. 2, p. 486–492, 20 set. 2011.
- HOGGATT, J. et al. Bleeding the laboratory mouse: Not all methods are equal. **Experimental hematology**, v. 44, n. 2, p. 132- 137.e1, 1 fev. 2016.
- HU, X. et al. The antagonists but not partial agonists of glucocorticoid receptor ligands show substantial side effect dissociation. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 3123–3134, ago. 2011.
- IKEDA, K. et al. Postoperative management of eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps: Impact of high-dose corticosteroid nasal spray. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 23, n. 1, p. 101–103, 1 jan. 2019.
- JITRAPAKDEE, S. Transcription factors and coactivators controlling nutrient and hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 1, p. 33–45, jan. 2012.
- JOHNSON, M. Development of fluticasone propionate and comparison with other inhaled corticosteroids. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 101, n. 4 Pt 2, p. S434-9, abr. 1998.
- KARBOWNIK, A. et al. Pharmacokinetic Drug Interaction Study of Sorafenib and Morphine in Rats. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, 1 dez. 2021.
- KOK, T. et al. Enterohepatic Circulation of Bile Salts in Farnesoid X Receptor-deficient Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41930–41937, 24 out. 2003.
- KORACH-ANDRÉ, M. et al. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 1, p. E106–E116, jan. 2005.

- KUMAR, R.; THOMPSON, E. B. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: function relationship. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 5, p. 383–394, 1 abr. 2005.
- KUO, T.; HARRIS, C. A.; WANG, J. C. Metabolic functions of glucocorticoid receptor in skeletal muscle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 380, n. 1–2, p. 79–88, 5 nov. 2013.
- KWON, S.; HERMAYER, K. L.; HERMAYER, K. Glucocorticoid-Induced Hyperglycemia. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 345, n. 4, p. 274–277, abr. 2013.
- LAMBERT, G. et al. The Farnesoid X-receptor Is an Essential Regulator of Cholesterol Homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2563–2570, 24 jan. 2003.
- LECHANTEUR, A.; DAS NEVES, J.; SARMENTO, B. The role of mucus in cell-based models used to screen mucosal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 124, p. 50–63, 15 jan. 2018.
- LEDFORD, H. Coronavirus breakthrough: dexamethasone is first drug shown to save lives. **Nature**, 16 jun. 2020.
- LEE, Y. Z. et al. Formulation and in vivo evaluation of a solid self-emulsifying drug delivery system using oily liquid tocotrienols as model active substance. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2021.
- LEFEBVRE, P. et al. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 1, p. 147–191, jan. 2009.
- LEW, K. H. et al. Gender-based effects on methylprednisolone pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 54, n. 4, p. 402, 1993.
- LIU, D. et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. **Allergy, Asthma and Clinical Immunology**, v. 9, n. 1, p. 1–25, 2013.
- LIU, Y. et al. Farnesoid X receptor agonist decreases lipid accumulation by promoting hepatic fatty acid oxidation in db / db mice. p. 1723–1731, 2018.
- LO, S.; RUSSELL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of applied physiology**, v. 28, n. 2, p. 234–236, 1970.
- LUIZI, B. F. et al. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. **Nature**, v. 352, n. 6335, p. 497–505, 1991.
- MA, Y. et al. Synthetic FXR agonist GW4064 prevents diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. **Pharmaceutical research**, v. 30, n. 5, p. 1447–1457, maio 2013.
- MACEDO, M. H. et al. All layers matter: Innovative three-dimensional epithelium-stroma-endothelium intestinal model for reliable permeability outcomes. **Journal of Controlled Release**, v. 341, p. 414–430, 1 jan. 2022.
- MADAUSS, K. P. et al. Progesterone Receptor Ligand Binding Pocket Flexibility: Crystal Structures of the Norethindrone and Mometasone Furoate Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 13, p. 3381–3387, 17 jun. 2004.
- MAGALHAES, C. D. DE; MICHAEL, F.; RONALD, D. Farnesoid X Receptor an Emerging Target to Combat Obesity. p. 185–190, 2017.
- MASSART, J.; ZIERATH, J. R.; CHIBALIN, A. V. A simple and rapid method to characterize lipid fate in skeletal muscle. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, 24 jun. 2014.

- METSELAAR, J. M. et al. Liposomal targeting of glucocorticoids to synovial lining cells strongly increases therapeutic benefit in collagen type II arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, n. 4, p. 348–353, abr. 2004.
- MOALLEM, E. et al. A liposomal steroid nano-drug for treating systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 25, n. 11, p. 1209–1216, 1 out. 2016.
- MOTTA, K. et al. JNK and IKK $\beta$  phosphorylation is reduced by glucocorticoids in adipose tissue from insulin-resistant rats. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 145, p. 1–12, 2015.
- MOTTA, K. et al. Dexamethasone administration during late gestation has no major impact on lipid metabolism, but reduces newborn survival rate in Wistar rats. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. JUL, 3 jul. 2018.
- NGUYEN, P. et al. Liver lipid metabolism. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 92, n. 3, p. 272–283, 2008.
- NUNES, E. A. et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate in rats. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 38, n. 11, p. 1137–1146, nov. 2013.
- NUNES, R. et al. Zein nanoparticles as low-cost, safe, and effective carriers to improve the oral bioavailability of resveratrol. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 3, p. 826–837, 2020.
- OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. **Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: New mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids** *Journal of Biological Chemistry* American Society for Biochemistry and Molecular Biology, , 4 fev. 2011. . Acesso em: 28 abr. 2020
- ONRUST, S. V.; LAMB, H. M. Mometasone Furoate. **Drugs**, v. 56, n. 4, p. 725–745, out. 1998.
- PACE, S. et al. Sex differences in prostaglandin biosynthesis in neutrophils during acute inflammation. **Scientific Reports 2017 7:1**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 19 jun. 2017.
- PALIWAL, R.; PALAKURTHI, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 189, p. 108–122, 10 set. 2014.
- PASIEKA, A. M.; RAFACHO, A. Impact of glucocorticoid excess on glucose tolerance: Clinical and preclinical evidence. **Metabolites**, v. 6, n. 3, 2016.
- POPPER, T. L. et al. Structure-activity relationships of a series of novel topical corticosteroids. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 27, n. 4–6, p. 837–843, 1 jan. 1987.
- PRAKASH, A.; BENFIELD, P. Topical Mometasone. **Drugs**, v. 55, n. 1, p. 145–163, jan. 1998.
- PRASAD, L. K.; O'MARY, H.; CUI, Z. **Nanomedicine delivers promising treatments for rheumatoid arthritis** *Nanomedicine* Future Medicine Ltd., , 1 jul. 2015. . Acesso em: 8 maio. 2020
- PRAWITT, J. et al. Farnesoid X Receptor De fi ciency Improves Glucose Homeostasis in Mouse Models of Obesity. v. 60, n. July, p. 1861–1871, 2011.
- PREZOTTI, F. G. et al. Oral nanoparticles based on gellan gum/pectin for colon-targeted delivery of resveratrol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 46, n. 2, p. 236–245, 2020.
- PROTZEK, A. O. et al. Augmented  $\beta$ -Cell Function and Mass in Glucocorticoid-Treated Rodents Are Associated With Increased Islet Ir- $\beta$  /AKT/mTOR and Decreased AMPK/ACC and AS160 Signaling. **International journal of endocrinology**, v. 2014, 2014.
- PROTZEK, A. O. P. et al. Hyperinsulinemia caused by dexamethasone treatment is associated with reduced insulin clearance and lower hepatic activity of insulin-



- degrading enzyme. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, p. 1–8, 2016.
- RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v. 36, n. 3, p. 284–293, 2008.
- RAFACHO, A. et al. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 296, n. 4, p. E681-9, 2009.
- RAFACHO, A. et al. The adaptive compensations in endocrine pancreas from glucocorticoid-treated rats are reversible after the interruption of treatment. p. 223–235, 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. 4, p. 275–281, 2011.
- RAFACHO, A. et al. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: Implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 3, p. R49–R62, 2014a.
- RAFACHO, A. 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, 2014b.
- RAFACHO, A.; BOSCHERO, A.C.; ORTSÄTER, H. Functional and Molecular Aspects of Glucocorticoids in the Endocrine Pancreas and Glucose Homeostasis. In: **State of the Art of Therapeutic Endocrinology of**. [s.l: s.n.]. p. 121–151.
- RAFACHO, A.; C., A.; ORTSATER, H. Functional and Molecular Aspects of Glucocorticoids in the Endocrine Pancreas and Glucose Homeostasis. In: **State of the Art of Therapeutic Endocrinology**. [s.l.] InTech, 2012.
- RATMAN, D. et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 380, n. 1–2, p. 41–54, 5 nov. 2013.
- RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 2005a.
- RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711–1723, 20 out. 2005b.
- RIZZA, R. A.; MANDARINO, L. J.; GERICH, J. E. Cortisol-Induced Insulin Resistance in Man: Impaired Suppression of Glucose Production and Stimulation of Glucose Utilization due to a Postreceptor Defect of Insulin Action. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 54, n. 1, p. 131–138, 1 jan. 1982.
- SAHASRANAMAN, S.; ISSAR, M.; HOCHHAUS, G. Metabolism of mometasone furoate and biological activity of the metabolites. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 34, n. 2, p. 225–233, 2006.
- SANTOS, A. C. et al. Nanotechnology-based formulations for resveratrol delivery: Effects on resveratrol in vivo bioavailability and bioactivity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 127–140, 1 ago. 2019.
- SANTOS, C. DOS 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. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 90, 1 abr. 2021.

- SCHÄCKE, H. et al. Characterization of ZK 245186, a novel, selective glucocorticoid receptor agonist for the topical treatment of inflammatory skin diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 4, p. 1088–1103, out. 2009.
- SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. **Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids** *Pharmacology and Therapeutics* Elsevier Inc., , 1 out. 2002a. . Acesso em: 8 jun. 2020
- SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, n. 1, p. 23–43, 1 out. 2002b.
- SCHESCHOWITSCH, K.; LEITE, J. A.; ASSREUY, J. New insights in glucocorticoid receptor signaling-more than just a ligand-binding receptor. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. FEB, p. 19–21, 2017.
- SCHULZ, M. et al. Identification of nucleolin as a glucocorticoid receptor interacting protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, n. 2, p. 476–480, 19 jan. 2001.
- SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 6, p. 960–977, 2017.
- SONG, D. et al. Physiologically Based Pharmacokinetics of Dexamethasone in Rats. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 48, n. 9, p. 811–818, 1 set. 2020.
- SORIANO, S. et al. Rapid regulation of K(ATP) channel activity by 17{beta}-estradiol in pancreatic {beta}-cells involves the estrogen receptor {beta} and the atrial natriuretic peptide receptor. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 23, n. 12, p. 1973–1982, dez. 2009.
- SPADA, F.; BARNES, T. M.; GREIVE, K. A. Comparative safety and efficacy of topical mometasone furoate with other topical corticosteroids. **Australasian Journal of Dermatology**, n. May 2017, 2018.
- SPINELLI, S. L. et al. Mapracorat, a selective glucocorticoid receptor agonist, upregulates RelB, an anti-inflammatory nuclear factor-kappaB protein, in human ocular cells. **Experimental Eye Research**, v. 127, p. 290–298, 1 out. 2014.
- STAHN, C. et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 275, n. 1–2, p. 71–78, 15 set. 2007.
- STOPA, L. R. S. et al. Sex differences in glucocorticoids-induced anabolic effects in rats. **Physiology & behavior**, v. 209, p. 112587, out. 2019.
- SUISSA, S.; KEZOUH, A.; ERNST, P. Inhaled corticosteroids and the risks of diabetes onset and progression. **American Journal of Medicine**, v. 123, n. 11, p. 1001–1006, nov. 2010.
- SURJIT, M. et al. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. **Cell**, v. 145, n. 2, p. 224–241, 15 abr. 2011.
- SUZUKI, S. et al. Involvement of nitric oxide in a rat model of carrageenin-induced pleurisy. **Mediators of inflammation**, v. 2010, 2010.
- TENG, X. W.; DAVIES, N. M.; CUTLER, D. J. Kinetics of metabolism and degradation of mometasone furoate in rat biological fluids and tissues. **Jpp**, v. 55, p. 617–630, 2003.
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1950**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1950/summary/>>. Acesso em: 14 abr. 2020.

- THRASHER, J. Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes Mellitus : Available Therapies. **The American Journal of Medicine**, v. 130, n. 6, p. S4–S17, 2017.
- TURNER, P. V. et al. Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 50, n. 5, p. 600, set. 2011.
- ULMANSKY, R. et al. Glucocorticoids in nano-liposomes administered intravenously and subcutaneously to adjuvant arthritis rats are superior to the free drugs in suppressing arthritis and inflammatory cytokines. **Journal of Controlled Release**, v. 160, n. 2, p. 299–305, 10 jun. 2012.
- URBANET, R. et al. Analysis of Insulin Sensitivity in Adipose Tissue of Patients with Primary Aldosteronism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 8, p. 4037–4042, ago. 2010.
- UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 6, p. 1803–1809, 1991.
- VALOTIS, A. et al. Human Receptor Kinetics, Tissue Binding Affinity, and Stability of Mometasone Furoate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, n. 5, p. 1337–1350, 2004.
- VALOTIS, A.; HÖGGER, P. Significant receptor affinities of metabolites and a degradation product of mometasone furoate. **Respiratory Research**, v. 5, p. 9–14, 2004.
- VAN DEN HEUVEL, J. K. et al. Identification of a selective glucocorticoid receptor modulator that prevents both diet-induced obesity and inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 11, p. 1793–1804, 24 abr. 2016.
- VAN DER GEEST, T. et al. [(18)F] FDG PET/CT imaging to monitor the therapeutic effect of liposome-encapsulated prednisolone in experimental rheumatoid arthritis. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 209, p. 20–26, 10 jul. 2015.
- VAN RAALTE, D. H.; OUWENS, D. M.; DIAMANT, M. Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? **European Journal of Clinical Investigation**, v. 39, n. 2, p. 81–93, fev. 2009.
- VANDEVYVER, S.; DEJAGER, L.; LIBERT, C. On the Trail of the Glucocorticoid Receptor: Into the Nucleus and Back. **Traffic**, v. 13, n. 3, p. 364–374, mar. 2012.
- VAYSSIÈRE, B. M. et al. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 9, p. 1245–1255, 1997.
- WANG, Y.-D. et al. Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor κB in hepatic inflammatory response. **Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 1632–1643, nov. 2008.
- WEI, J. et al. Baicalin Enhanced Oral Bioavailability of Sorafenib in Rats by Inducing Intestine Absorption. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, 8 nov. 2021.
- WIRTZ, S. et al. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. **Nature Protocols** 2007 2:3, v. 2, n. 3, p. 541–546, 15 mar. 2007.
- WOODS, S. C. et al. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. **Nature**, v. 282, n. 5738, p. 503–505, 1979.
- WU, T. et al. Timing of glucocorticoid administration determines severity of lipid metabolism and behavioral effects in rats. **Chronobiology International**, v. 34, n. 1, p. 78–92, 2017.
- XU, C. et al. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 23, n. 8, p. 1161–1170, ago. 2009.

- YANG, M. et al. **Nanotherapeutics relieve rheumatoid arthritis** *Journal of Controlled Release* Elsevier B.V., , 28 abr. 2017. . Acesso em: 8 maio. 2020
- ZHANG, Y. et al. Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. v. 103, n. 4, p. 1–6, 2006.
- ZHOU, W.; ANAKK, S. Enterohepatic and non-canonical roles of farnesoid X receptor in controlling lipid and glucose metabolism. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 549, 1 jun. 2022.