

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Flávia Natividade da Silva

IMPACTO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA ANTES DA PREENHEZ
NA HOMEOSTASE GLICÊMICA DA PROLE EXPOSTA AO
GLICOCORTICÓIDE NA VIDA ADULTA

Florianópolis
2019

Flávia Natividade da Silva

Impacto do tratamento com dexametasona antes da prenhez na homeostase glicêmica da prole exposta ao glicocorticóide na vida adulta

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Ciências Biológicas, modalidade de licenciatura, do centro de Ciências Biológicas da Universidade federal do estado de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr Alex Rafacho.

**Florianópolis
2019**

AGRADECIMENTOS

A meus pais e meu irmão, que sempre me apoiaram, e me estimularam a seguir meus sonhos, não importando quais fossem estes.

A meu orientador, que acompanhou e me ensinou muito durante todo o meu período de crescimento na graduação.

A equipe de servidores técnicos do Laboratório Multiusuário de estudos em Biologia, por todo o suporte.

A equipe LIDoC por todos os ensinamentos e o suporte.

Ao CNPQ pelo fomento.

**“se o cérebro humano fosse tão simples que pudéssemos entendê-lo,
seríamos tão simples que não poderíamos” (autor desconhecido)**

RESUMO

O ambiente intrauterino é determinante no desenvolvimento dos sistemas fisiológicos e alguns insultos neste período crítico do desenvolvimento podem alterar vias que determinam o desenvolvimento normal do feto, tornando-os mais suscetíveis à alterações cardiometabólicas na vida adulta. Os glicocorticoides sintéticos (GCs) são conhecidos por seus efeitos diabetogênicos e a exposição aos GCs, durante a gestação, é um dos fatores que influenciam essas alterações na vida adulta. Atualmente tem sido proposto que estilos de vida e/ou desafios metabólicos em períodos que antecedem a gestação também podem influenciar o metabolismo da prole na vida adulta. Assim, nos propusemos a verificar se a prole adulta, oriunda de ratas tratadas com dexametasona (DEX) no período pré-coito é mais suscetível aos efeitos diabetogênicos do tratamento com GC na vida adulta. Para tal, utilizamos ratos e ratas Wistar com 3 meses de idade (Protocolo CEUA/UFSC - n.º. PP00782), onde a F0 foi tratada com salina (SA) - CTL (1 ml/Kg p.c., i.p.) ou DEX (1 mg/Kg, p.c. i.p.) por 7 dias consecutivos. Ao término das injeções (7º dia), as fêmeas foram então submetidas ao coito. Aos seis meses de idade, metade da prole (oriunda de mães tratadas com SA ou DEX) receberam solução SA ou DEX, como descrito anteriormente, por 5 dias consecutivos. Ao final do tratamento foi aplicado o teste de tolerância à glicose e então os animais foram eutanasiados. A prole (machos e fêmeas) nascida de ratas tratadas com GC antes da prenhez, não teve nenhum dos resultados murinométricos e metabólicos (ex., massa corporal, glicemia e tolerância à glicose) alterados até 6 meses de idade. Nenhum dos efeitos diabetogênicos causados pelo tratamento com DEX aos 6 meses de idade (elevação da glicemia de jejum, intolerância à glicose, insensibilidade à insulina, aumento do conteúdo de glicogênio hepático e aumento da massa de ilhotas pancreáticas) foi observado em filhotes nascidos de ratas tratadas com DEX no período pré-gestacional. Concluímos que a exposição pré-coito ao GC não exacerba as alterações metabólicas causadas pela dexametasona na prole adulta. Esses dados mostram que a exposição pré-coito aos GCs não surte efeitos deletérios em relação as variáveis ligadas ao metabolismo glicêmico.

Palavras-chaves: pré-gestação, glicocorticoide, prole.

ABSTRACT

The intrauterine environment is crucial for the development of physiological systems in adulthood, some factors may alter the pathways that determine the normal development of the body, making them more susceptible to cardiometabolic disturbances as adults. Synthetic glucocorticoids (GCs) are known for their diabetic effects, the exposure to GCs during pregnancy are one of the factors that may influence these alterations in adulthood. Currently, it has been proposed that lifestyles and/or metabolic challenges in pre-pregnancy period may also influence the offspring metabolism . Thus, we propose to verify whether an adult offspring, from pre-coital dexamethasone (DEX) treated rats, becomes more susceptible to the diabetogenic effects of GC treatment in adulthood. We used 3-month-old Wistar rats and rats (CEUA / UFSC Protocol - No. PP00782), where F0 was divided by half that received saline (SA) - used as control (CTL) (1 ml/kg bw, ip), and the other half received DEX (1 mg/kg bw) for 7 consecutive days. At the end of the injections (7th day), the progenitress were exposed to male rats for intercourse. At six months of age, half of the offspring (from mothers treated with SA or DEX) received SA - CTL solution and the other half with DEX, as described above, for 5 consecutive days. At the end of treatment, we performed a glucose tolerance test and then the animals were euthanized. Offspring (males and females) born from progenitress treated with GC before gestation had no altered clinical and metabolic outcome (such as body mass, glucose and glucose tolerance) until 6 months of age. None of the expected diabetogenic effects caused by dexamethasone treatment (such as increased fasting blood glucose, glucose intolerance, insulin insensitivity, increased hepatic glycogen content and increased islet mass) was observed in pups born to dexamethasone-treated rats in the pre-gestational period. We conclude that pre-coital exposure to GC is not exacerbated by the metabolic changes caused by DEX in offspring. These data shows that predefined exposure to GCs on offspring metabolism do not cause major damage.

Key-words: pre-gestation, glucocorticoid, offspring.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Desenho experimental.....	14
Quadro 2 - grupos experimentais.....	15
Figura 1 - Peso corpóreo e desafio glicêmico.....	18
Figura 2 - Teste de Tolerância à Glicose e desafio insulínico.....	19
Figura 3 - Soma das gorduras, Fígado e Adrenais.....	21
Figura 4 - Transaminases de função hepática.....	22
Figura 5 - Imagens representativas de histologia de fígado em H&E.....	23
Figura 6 - Massa endócrina absoluta e % endócrina do pâncreas.....	24
Figura 7 - Imagens representativas de histologia de pâncreas em H&E.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

DEX - dexametasona

MC - progenitora controle (F0)

MD - progenitora tratada com dexametasona (F0)

MCM - macho oriundo de progenitora controle (F1)

MCF - fêmea oriundo de progenitora controle (F1)

MDM - macho oriundo de progenitora trata com DEX (F1)

MDF - fêmea oriunda de progenitora tratada com dexametasona (F1)

MCMC - macho controle oriundo de progenitora controle (F1)

MCFC - fêmea controle oriundo de progenitora controle (F1)

MCMD - macho controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona (F1)

MCFD - fêmea controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona (F1)

MDMC - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora controle (F1)

MDFC - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora controle (F1)

MDMD - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora tratada com dexametasona (F1).

MDFD - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora tratada com dexametasona (F1).

AST - Transaminase glutâmico-oxalacética ou aspartato aminotransferase

ALT - Transaminase glutâmico-pirúvica ou alanina aminotransferase

SUMÁRIO

Introdução.....	9
Objetivos.....	12
Metodologia.....	13
Resultados	18
Discussão	26
Conclusão.....	29
Referências.....	30

1. INTRODUÇÃO

Existem fatores que podem influenciar a saúde da prole na vida adulta, dentre estes temos os fatores genéticos clássicos, que envolvem a placenta e fatores do metabolismo materno, fatores da regulação de crescimento e nutrientes. Temos o compartimento fetal em si que envolve questões como crescimento e desenvolvimento, também possuímos adaptações expressão gênica, estrutura dos órgãos, metabolismo, níveis hormonais. Além disso, temos as doenças que surgem na vida adulta, hipertensão, diabetes tipo 2, problemas psiquiátricos. Existem também fatores ambientais que podem modular a saúde da prole, através do ambiente materno durante a prenhez como a dieta, estresse, infecções e inflamações que podem surgir, hábitos como tabagismo ou abuso drogas. Além do período gestacional temos também o ambiente pós natal, que estará relacionado aos hábitos do indivíduo, como o consumo excessivo de sal, o sedentarismo, entre outros (1). Um exemplo de fator ambiental bem conhecido em modelos animais é a utilização de dieta hipoprotéica durante a prenhez, que gera uma prole com baixo peso ao nascer, menor quantidade de músculo esquelético e níveis mais elevados do fator de crescimento semelhante à insulina (2). Outro exemplo seria a exposição a pesticidas durante a prenhez, também em modelos animais, que leva à uma prole com estresse oxidativo e uma maior peroxidação lipídica (3).

Além de fatores que podem interferir o ambiente intra-uterino e suas possíveis adversidades, o período que antecede a gestação também tem sido levado em consideração quando pensamos na saúde da próxima geração. Um fator é obesidade materna antes da fecundação, em modelos animais, que é um fator de risco determinante para o câncer endometrial na prole, quando há a presença de um desafio secundário na vida adulta, como o Dietilestilbestrol (4). Somada a influência materna, características paternas podem também desencadear programação cardiometabólica na prole. Como a obesidade paterna em modelos animais, quando antecede a fecundação, leva ao aumento do conteúdo de triglicérides nos rins da prole com sinais de danos tubulares (5). Até mesmo quando a obesidade induzida por dieta hiperlipídica paterna é associada à um hábito transitório, como exercício espontâneo em camundongos, há uma proteção do metabolismo da prole de machos na vida adulta, mesmo que esses animais (F1) tenham hábitos sedentários durante a sua vida, o desempenho da prole no teste de tolerância à glicose de animais oriundos de progenitores que consumiam essa dieta e faziam exercício é semelhante aos animais oriundos de progenitores controle (6). Estas evidências

ênfatizam como a epigenética pode contribuir para a saúde da prole na vida adulta, protegendo ou predispondo-a de acordo com os hábitos dos pais.

Os glicocorticoides (GC) são indicados na maioria das doenças inflamatórias e imunológicas, como doença de Addison, em casos de pós-trauma, insuficiência adrenocortical secundária à insuficiência hipofisária, asma, lúpus, artrite reumatóide, gota, entre outras (7). A dexametasona (DEX) é um GC sintético, pertencente a classe dos corticosteróides, que é amplamente utilizada na clínica, para o tratamento de algumas doenças e alergias crônicas. Entretanto, existem alguns efeitos colaterais indesejáveis deste medicamento, dependentes de dose e do período de tratamento, dentre os diversos sintomas, destacam-se os denominados diabetogênicos. Sabe-se que a DEX causa intolerância à glicose, resistência à insulina, crescimento da massa endócrina no pâncreas justificada por uma proliferação das células β , levando até mesmo a um quadro de dislipidemia quando temos doses mais altas, as quais foram descritas em roedores (8;9). Os danos colaterais observados em roedores também foram demonstrados em humanos (10).

Durante a gravidez, os GC podem entrar em dois cenários, quando há alguma doença relacionada à saúde materna, no caso pessoas que sofrem de doenças crônicas, como asma e artrite reumatóide, que nem sempre pode ser interrompido (11). Esta classe também pode ser prescrita quando há algum problema relacionado à saúde do feto, durante os estágios iniciais da gravidez, se o feto apresentar hiperplasia adrenal congênita (12) ou nos meses finais da gestação, quando houver chance de parto prematuro (13; 14). No entanto, estudos em ratos prenhes, primatas não humanos mostraram que a administração materna de GC sintético durante o final da prenhez pode induzir restrição de crescimento intra-uterino (RCIU) e anormalidades cardiometabólicas pós-natal, como hipertensão e sintomas semelhantes ao diabetes mellitus tipo 2 (15; 16; 17).

Não se sabe o impacto do GC dado antes do período gestacional e as possíveis conseqüências disso na prole. Como mencionado anteriormente, há um grupo de pacientes em terapia com GC que deve interrompê-la quando a gravidez é confirmada, quando essa interrupção é possível (9). Assim, objetivamos explorar o impacto da administração de GC pré-coito no metabolismo da glicose da prole adulta (masculina e feminina). Nos propusemos a investigar os resultados metabólicos desses ratos quando submetidos ao tratamento com GC na vida adulta, para avaliar qualquer possível predisposição adquirida através do ambiente periconcepcional. Nossa hipótese foi de que os filhotes

nascidos de ratos expostos ao GC pré-coito podem apresentar comprometimentos da homeostase da glicose ao atingirem a idade adulta e que esses comprometimentos metabólicos poderiam ser agravados se fossem expostos ao GC. Nossos principais resultados revelaram que a administração de dexametasona pouco antes do período da concepção não causou grande impacto no metabolismo da prole de adultos nem piorou os efeitos colaterais clássicos esperados quando esses animais adultos foram tratados com dexametasona.

2. OBJETIVOS

Geral

Verificar se a prole adulta (machos e fêmeas) oriunda de ratas tratadas com DEX, no período pré-coito, se tornam mais susceptíveis aos efeitos diabetogênicos do tratamento com DEX na vida adulta.

Específicos

Parâmetros funcionais e metabólicos (prole F1 apenas):

- Avaliação do peso corpóreo, para determinar se a administração de DEX pré-coito leva à um quadro de baixo peso ao nascer e se esse peso caso alterado se normaliza durante o desenvolvimento;
- Avaliação da glicemia em diferentes períodos do crescimento, para avaliar se os animais possuem algum desbalanço na homeostase glicêmica ao longo do período avaliado;
- Avaliação da tolerância à glicose antes e após o tratamento com DEX, para observar como estes animais respondem à uma sobrecarga de glicose;
- Avaliação do peso das gorduras omental, retroperitoneal e perigonadal, visto que a DEX pode ser lipolítica ou lipogênica em contextos diferentes;
- Avaliação do peso dos órgãos metabólicos (fígado, pâncreas, adrenais), para checar se há algum efeito clássico do tratamento com a DEX
- Determinação da morfologia hepática e pancreática, para avaliar se há além de uma mudança de massa, alguma mudança estrutural nos tecidos..

3. MATERIAIS E MÉTODOS

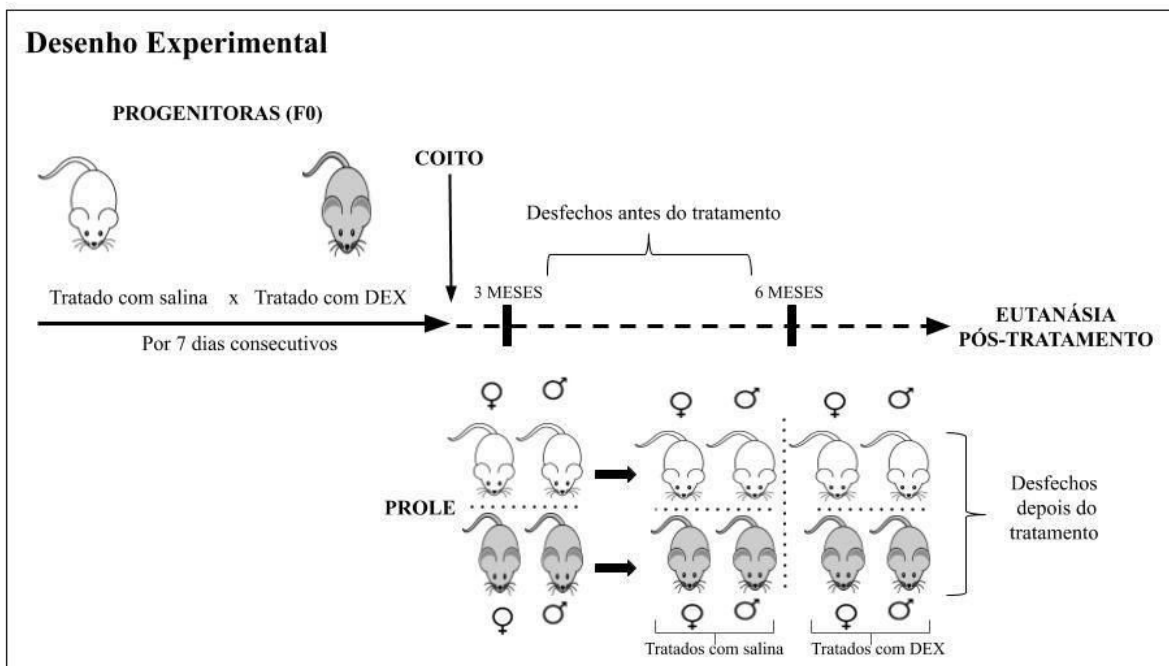
Estes dados já foram previamente publicados, e podem ser encontrados nesse link - <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116913>

Animais: Foram utilizados ratas e ratos Wistar com 3 meses de idade (progenitores) provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. A prole, composta por machos e fêmeas, foi obtida através do cruzamentos dos progenitores e mantidos no biotério setorial – LIDoC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas e em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso à comida e água. Todos os protocolos e procedimentos experimentais relativos ao projeto foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC – protocolo nº PP00782.

Tratamento com dexametasona: Para o coito, utilizamos 12 fêmeas e 4 machos para cada grupo experimental. Metade das fêmeas adultas receberam injeção diária ($\approx 08:00$ h) de solução salina (NaCl 0.9% 1 ml/kg, *p.c., i.p.*) – grupo controle – e outra metade recebeu injeção diária de DEX (Decadron, Aché) (1 mg/kg, *p.c., i.p. diluída em salina*) por 7 dias consecutivos. Ao término das injeções (7º dia), as fêmeas foram então submetidas ao coito na presença de um macho. Para o tratamento da prole (F1), que ocorreu quando esta completou 6 meses de idade, metade das fêmeas e machos adultos (provenientes de mães tratadas com salina ou DEX) receberam injeção diária ($\approx 08:00$ h) de solução salina (NaCl 0.9% 1 ml/kg, *p.c., i.p.*) – grupos controles – e outra metade recebeu injeção diária de DEX (Decadron, Aché) (1 mg/kg, *p.c., i.p. diluída em salina*) por 5 dias consecutivos. Ao final do tratamento, realizamos os procedimentos experimentais.

Acasalamento: Grupos de três fêmeas foram mantidas na presença de um macho (ambos com 3 meses de idade) até que se verifique a presença de plugue copulatório (normalmente ocorre entre a 1ª e 5ª noite) (Franko *et al.* 2010). O dia da confirmação do plugue copulatório foi considerado como dia 0 da prenhez (duração que varia entre 21 a 25 dias) e separamos a rata das demais ratas, esta foi mantida individualmente em outra gaiola. No dia do nascimento, realizamos a sexagem e pesagem dos neonatos que permaneceram alojados com a mãe ao número restrito de 8 por mãe (04 machos e

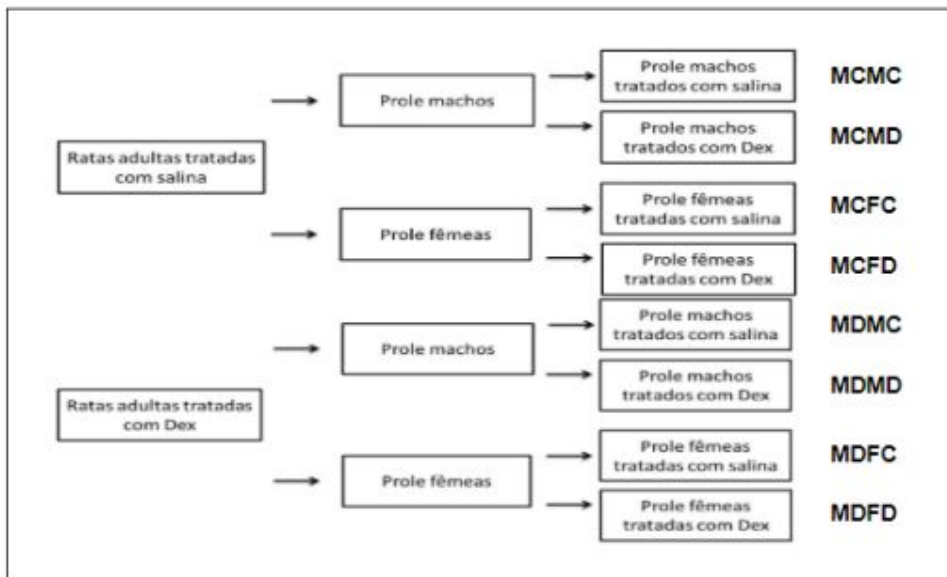
04 fêmeas com pesos próximos ao peso médio). Os neonatos excedentes foram eutanasiados por decapitação direta (em acordo com Resolução do CFMV No 1000). Os neonatos mantidos com as mães foram pesados semanalmente, após o desmame que ocorreu no 22º dia foram selecionados 2 filhotes de cada sexo por progenitora para montar os grupos experimentais, a prole foi mantida em gaiolas separados por sexo e grupo (controle vs. DEX), e mantidos com ração e água *ad libitum* até 6 meses de vida.



Quadro 1 - Desenho experimental. Esquema da ordem cronológica dos eventos durante a execução projeto. Ver metodologia para maiores informações.

Desenho experimental: Os animais (F0) foram aclimatados por 8 semanas antes de serem divididos em dois grupos. Os ratos F0 foram compostos por 5 fêmeas e 2 machos para cada grupo experimental. Metade das fêmeas adultas (grupo MC) recebeu uma injeção diária ($\approx 08:00$) de solução salina ou dexametasona (grupo MD) por 7 dias consecutivos. No último dia da injeção, grupos de ratas fêmeas foram alojadas com um rato macho por até 3 dias consecutivos (duas ou três fêmeas e um macho por gaiola). A presença do plugue copulatório, confirmado como a presença de espermatozoides no lavado vaginal, foi considerado o dia 0 da prenhez e essa fêmea foi transferida para uma gaiola separada. Todas as progenitoras foram mantidas com sua prole até o desmame. Os

ratos F1 foram alojados até seis meses de idade em condições padrão. Aos 6 meses de idade a prole foi dividida, metade dos machos e fêmeas adultos F1 (dos progenitores MC e MD) recebeu injeção diária ($\approx 08:00$) de solução salina por 5 dias consecutivos (quadro 1), compondo os seguintes grupos MCMC; MCFC; MDMC; MDFC; . A outra metade da ninhada recebeu uma injeção diária de dexametasona por 5 dias consecutivos, compondo os seguintes grupos MCMD; MCFD; MDMD; MDFD; (quadro 2 - sequência dos grupos ao longo do projeto).



Quadro 2 - Grupos experimentais. Esquema da ordem dos grupos e a ordem cronológica das subdivisões durante a execução projeto. Ver metodologia para maiores informações.

Teste de Tolerância à Glicose oral (oGTT): Realizado no 90° no 180° dia de vida após jejum de 12h em animais conscientes (machos e fêmeas). No 90° dia de vida os animais ainda não haviam sido tratados com a DEX. Já no 180° dia de vida, os ratos foram submetidos ao oGTT um dia antes da eutanásia (no quinto dia de tratamento com dexametasona ou solução salina) Os animais tiveram a extremidade da cauda seccionada para a dosagem da glicemia através do sistema de glicofitas e esta foi considerada a glicemia no tempo 0. Imediatamente, administramos solução de glicose 50% (2g/kg de peso corpóreo, o.g.) e coletamos amostras de sangue da cauda dos ratos aos 30, 60 e 120 min para determinação das concentrações de glicose sanguínea.

Eutanásia, massas orgânicas e análises bioquímicas: A eutanásia ocorreu após o desafio insulínico intraperitoneal e foi realizado por exposição ao CO₂, seguido de decapitação. Os órgãos de interesse (adrenais, fígado, pâncreas e depósitos de gordura visceral) foram cuidadosamente removidos e pesados em uma balança analítica eletrônica. Fragmentos de pâncreas e fígado foram utilizados para procedimentos histológicos, como descrito em detalhes posteriormente. A massa dos órgãos foi normalizada pela massa corporal total. O sangue do tronco foi coletado em um tubo de vidro contendo EDTA-NaF (Glistab, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e depois centrifugado a 1.500rpm por 10 minutos em temperatura ambiente (Eppendorf 5810R). As alíquotas de plasma foram armazenadas a -20 ° C para quantificação posterior de AST e ALT, enzimas que mostram função hepática, (kits comerciais da Biotécnica, Varginha, MG , Brasil) a dosagem foi feita de acordo com as instruções do fabricante.

Morfologia hepática e massa das ilhotas: Para a morfologia hepática, fragmentos de fígado (do mesmo lobo em todos os animais) foram coletados e fixados em formalina tamponada a 10%, pH 7,4, por 24h, desidratados e embebidos em parafina. Seções representativas de tecido (5µm) foram obtidas em um micrótomo rotativo (Leica, IL, EUA) e colocadas em lâminas de vidro. Após, as lâminas foram submetidas ao procedimento de coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação morfológica posterior. Imagens representativas foram obtidas no microscópio Opticam 0400S (OPTICAN INC; São Paulo, SP, Brasil), com ampliação de 40 × e 400 ×. Para determinação da massa das ilhotas, os fragmentos do pâncreas (região esplênica) foram coletados, fixados e embebidos como nos fragmentos de fígado. Seções representativas de tecido (4µm) foram obtidas em um micrótomo rotativo (Leica) e colocadas em lâminas de vidro. Posteriormente, as lâminas foram submetidas ao procedimento de coloração de HE e posteriormente escaneadas no scanner automático de lâminas AxioScan (ZEISS, Oberkochen, Alemanha) para análises morfométricas subsequentes. A área total do pâncreas e ilhotas pancreáticas foi calculada usando o software ZEN (ZEISS) e a soma das áreas correspondentes às ilhotas pancreáticas foi dividida pela área total do pâncreas e multiplicada por 100 para obter a porcentagem do pâncreas endócrino no seção. Para obter a massa absoluta das ilhotas, toda a massa do pâncreas foi multiplicada pela porcentagem de ilhotas (pâncreas

endócrino) na seção e expressa em mg. Imagens representativas foram tiradas no microscópio OLYMPUS IX83 (OLYMPUS; Tóquio, Japão) com ampliação de $40 \times$ e $200 \times$.

Análise Estatística dos Resultados: Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism Versão 6.01 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos). Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão (DP) ou média \pm erro padrão da média (EPM), para dados paramétricos ou mediana e intervalos interquartis para dados não paramétricos. A simetria dos dados foi testada pelos testes de normalidade de Kolmogorov – Smirnov, Shapiro – Wilk e D'Agostino e Pearson. Os dados foram considerados simétricos se aprovados por pelo menos um dos três testes. Nos gráficos de linha a análise foi feita ponto a ponto, comparando os grupos entre si. Adotado $p < 0,05$. O Teste-t foi utilizado para os dados antes do tratamento com DEX na prole, quando haviam apenas dois grupos por sexo, já a ANOVA foi utilizada para os dados pós tratamento da prole, quando haviam 4 grupos experimentais por sexo

4. RESULTADOS

O tratamento com DEX pré-coito não altera o peso corpóreo da prole ao longo da vida e glicemia da prole aos 3 meses: A prole, ambos machos e fêmeas, apresentaram peso similar ao nascer, ao longo do período avaliado o crescimento e os pesos se mantiveram semelhantes, sendo fêmeas em (Fig. 1a) e machos em (Fig. 1b). Estes também não apresentaram nenhum distúrbio glicêmico no desafio de glicose realizado no terceiro mês de idade, onde vemos glicemias de partida e após 60 minutos na mesma faixa, quando comparamos entre os grupos, sendo fêmeas em (Fig. 1c) e machos em (Fig. 1d).

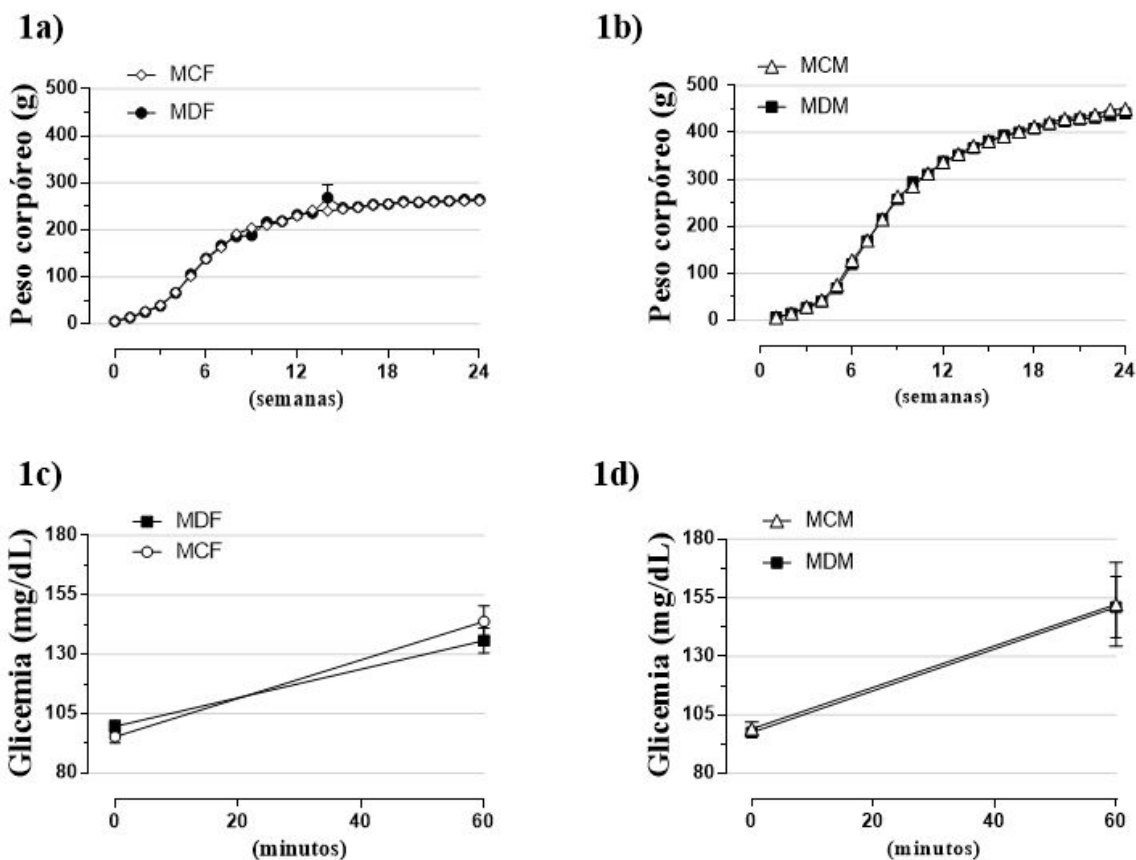


Fig 1 - Peso corpóreo (g) e Glicemia (mg/dL). Gráfico (Fig. 1a) se refere ao peso corpóreo da prole de fêmeas e (1b) a prole machos. Gráfico (Fig. 1c) se refere a glicemia da prole de fêmeas e (Fig. 1d) a prole machos. N= 16 para os gráficos (Fig. 1a e b), n= 6 para os gráficos (Fig. 1c e d). Grupos experimentais: MCF-fêmeas oriundas de progenitoras controle, MCM-machos oriundos de progenitoras controle, MDF-fêmeas oriundas de progenitoras tratadas com DEX e MDM machos oriundos de progenitoras tratadas com DEX. Os dados são expressos em média e EPM. A análise foi feita ponto a ponto, aplicado Teste-t não pareado com correção de Welch.

O tratamento com DEX pré-coito não agrava o perfil glicêmico e resposta à insulina, causado pelo tratamento com DEX na vida adulta da prole: Os animais que receberam DEX na vida adulta, tanto a prole de machos quanto de fêmeas, tiveram uma glicemia de partida mais elevada, e durante o teste apresentaram uma menor resposta à sobrecarga de glicose, observado nas fêmeas (**Fig. 2a**) nos minutos 0 e 30, nos machos (**Fig. 2b**) durante todo o teste. Já no desafio insulínico, vemos nas fêmeas - grupo MDFD uma elevação na glicemia porém não significativa, já nos machos - grupos MCMC e MDMD, com glicemias de partida mais elevadas, e após 25 minutos glicemias ao final do teste ainda elevada nos mesmos grupos, quando os comparamos com os controles, sendo fêmeas (**Fig. 2c**) e machos (**Fig. 2d**). Testes efetuados aos 6 meses de idade dos animais após o tratamento da prole.

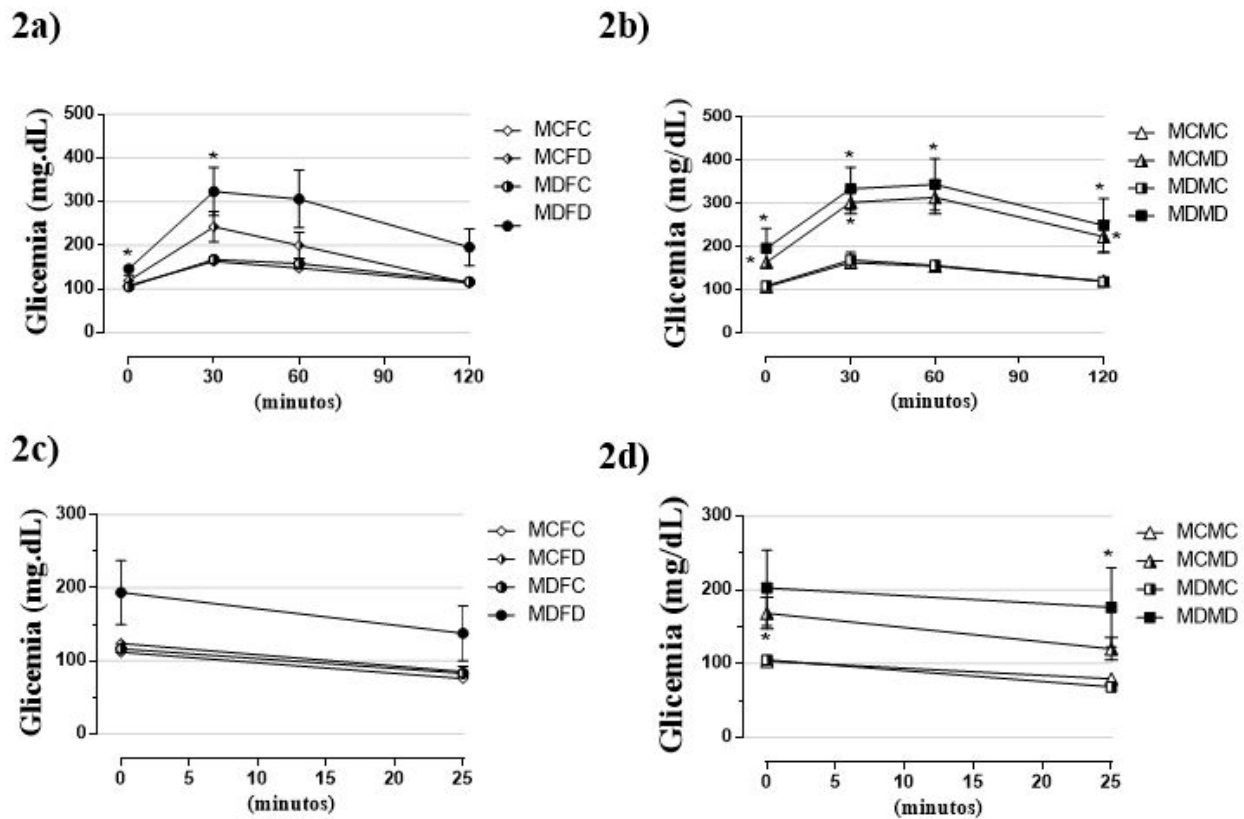


Fig 2 - Glicemia (mg/dL). Gráfico (**Fig. 2a**) se refere a glicemia durante o teste de tolerância à glicose da prole de fêmeas e (**Fig. 2b**) a prole machos. Gráfico (**Fig. 2c**) se refere a glicemia durante o desafio de insulina da prole de fêmeas e (**Fig. 2d**) a prole machos. N= 6 para esta figura. Grupos experimentais: MCMC - macho controle oriundo de progenitora controle, MCFC - fêmea controle oriundo de progenitora controle, MCMD - macho controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona , MCFD - fêmea controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona, MDMC - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora controle , MDFC - fêmea tratada com dexametasona oriunda de

progenitora controle, MDMD - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora tratada com dexametasona e MDFD - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora tratada com dexametasona. Os dados são expressos em média e EPM. A análise foi feita ponto a ponto, aplicado ANOVA de uma via.

O tratamento pré-coito com DEX, altera a soma da massa de gordura e a massa hepática nas fêmeas, mas não altera a massa das adrenais: Ocorreu uma redução da massa de depósitos viscerais de gordura, somente nas fêmeas oriundas de progenitoras tratadas, e tratadas novamente na vida adulta - grupo MDFD observado em **(Fig. 3a)**, que não é observado nos machos **(Fig. 3b)**. Quanto à massa hepática, foi observado um aumento da massa do órgão nas fêmeas tratadas com DEX na vida adulta - grupos MCFD e MDFD, quando comparados com o grupo controle MCFC, além disso há um incremento no grupo MDFD quando comparado com o grupo MCFD, sendo este incremento então resultado do tratamento na progenitora **(Fig. 3c)**. Nos machos houve um aumento da massa hepática causado pelo tratamento na vida adulta - grupos MCMD e MDMD **(Fig. 3d)**. Quanto a massa das adrenais, vemos uma redução oriunda do tratamento com DEX na vida adulta, nas fêmeas - grupos MCFD e MDFD **(Fig. 3e)** e nos machos - grupos MCMD e MDMD **(Fig. 3f)**.

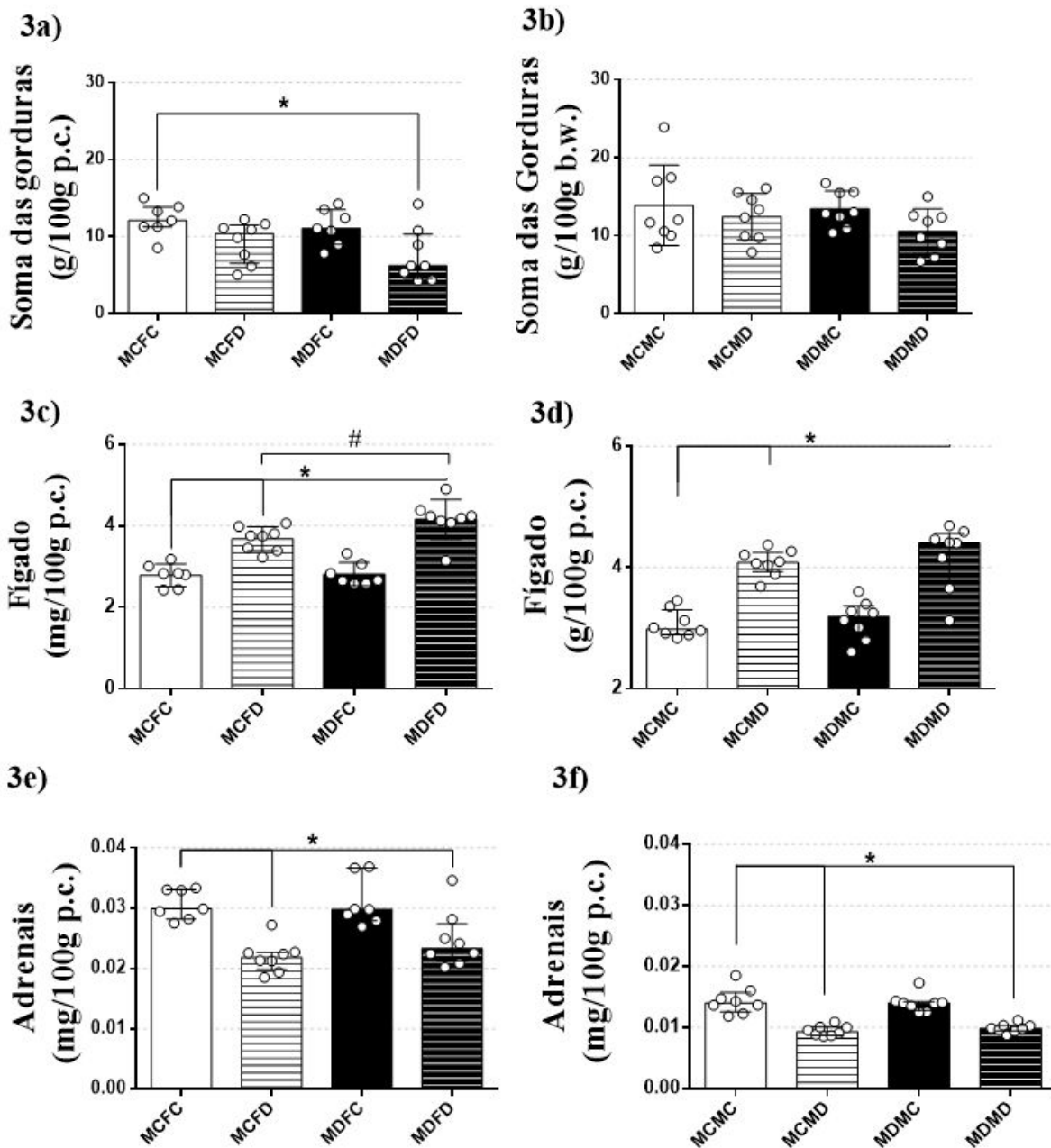


Fig 3 - Massa relativa dos órgãos (mg/100 g p.c.). Gráfico (Fig. 3a) se refere a soma dos depósitos de gordura visceral da prole de fêmeas e (Fig. 3b) a prole machos. Gráfico (Fig. 3c) se refere a massa hepática relativa da prole de fêmeas e (Fig. 3d) a prole machos. Gráfico (Fig. 3e) se refere a massa das adrenais relativa da prole de fêmeas e (Fig. 3f) a prole machos. N= 7-8 para esta figura. Grupos experimentais: MCMC - macho controle oriundo de progenitora controle, MCFC - fêmea controle oriundo de progenitora controle, MCMD - macho controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona , MCFD - fêmea controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona, MDMC - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora controle , MDFC - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora controle, MDMD - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora tratada com dexametasona e MDMD - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora tratada com dexametasona. Os dados são expressos em mediana e

intervalo interquartil, aplicado Kruskal-Wallis nos gráficos (Fig. 3a, c, e e f). Os dados são expressos em média e desvio padrão, aplicado ANOVA de uma via nos gráficos (Fig. 3b, d).

A DEX pré-coito não altera os níveis ALT, aumentados pelo tratamento com DEX na vida adulta, mas reduz os níveis de AST nos machos: Na prole de fêmeas representadas em (Fig. 4a), não houve alteração dos níveis AST, porém nos machos vemos uma redução dessa enzima, apenas no grupo MDMD, redução essa então causada pelo tratamento na progenitora (Fig. 4b). Já nos níveis da ALT, vemos um aumento nos níveis plasmáticos em todos os grupos que receberam DEX na vida adulta, sendo fêmeas do - grupo MCFD e MDFD (Fig. 4c) e machos - grupo MCMD e MDMD (Fig. 4d).

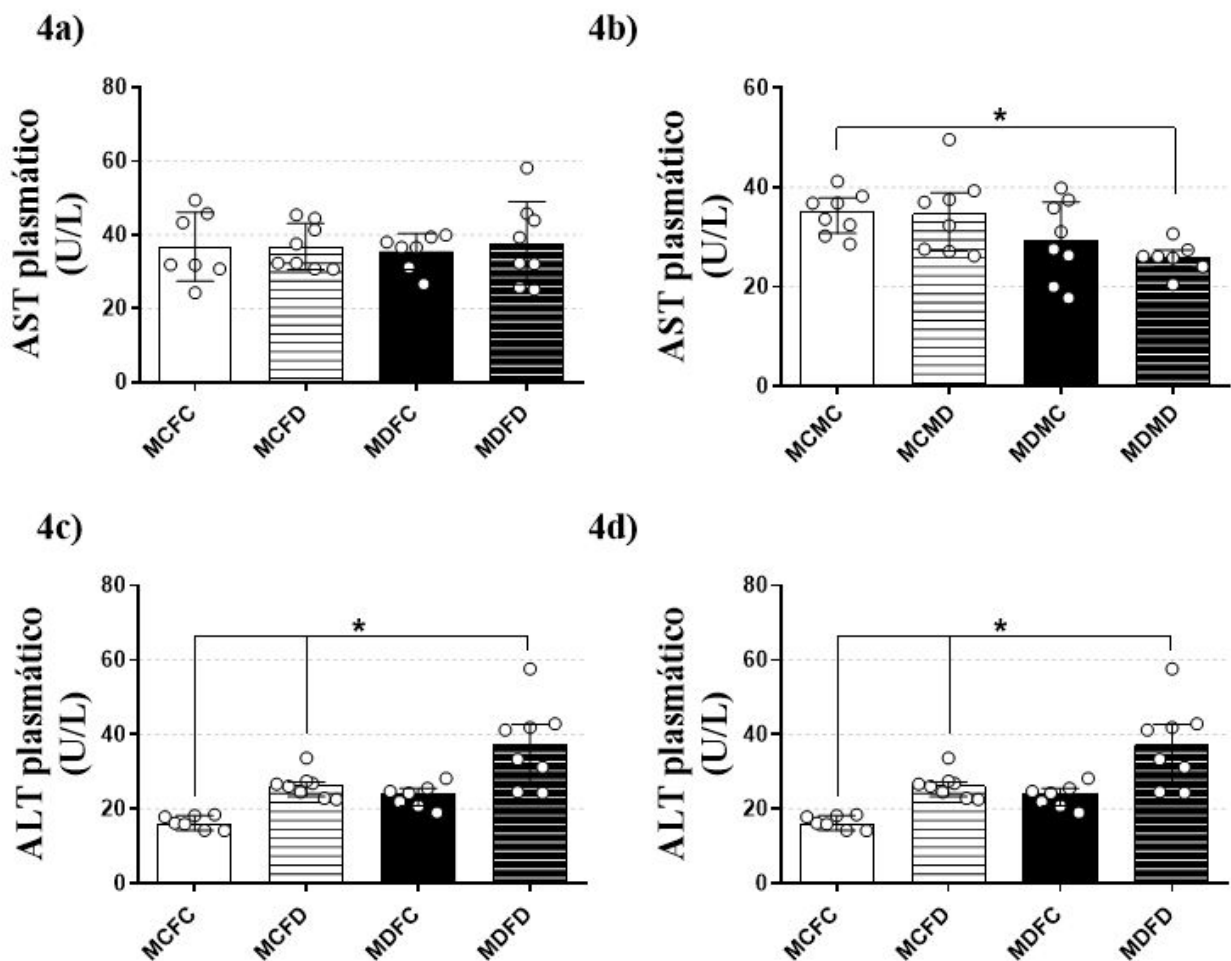


Fig 4 - Transaminases hepáticas (U/L). Gráfico (Fig. 4a) se refere aos níveis de AST da prole de fêmeas e (Fig. 4b) a prole machos. Gráfico (Fig. 4c) se refere aos níveis de ALT da prole de fêmeas e (Fig. 4d) a prole machos. N= 8 para esta figura. Grupos experimentais: MCMC - macho controle oriundo de progenitora controle, MCFC - fêmea controle oriundo de progenitora controle, MCMD - macho controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona , MCFD - fêmea controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona, MDMC - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora controle , MDFC - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora controle, MDMD - macho tratado

com dexametasona oriundo de progenitora tratada com dexametasona e MDFD - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora tratada com dexametasona. Os dados são expressos em mediana e intervalo interquartil, aplicado Kruskal-Wallis nos gráficos (Fig. 3a, c, d). Os dados são expressos em média e DP, aplicado ANOVA de uma via no gráfico (Fig. 3b).

O excesso de DEX nas progenitoras não exacerbou o fenótipo histológico do fígado ou alterações na massa das ilhotas causadas pelo tratamento com GC na prole: O impacto negativo do tratamento com GC na vida adulta no tecido hepático foi associado à presença de glicogênio e conteúdo de triacilglicerol no fígado na prole feminina - coluna da esquerda, e masculina - coluna da direita (Fig. 5). Em alguns animais do grupo MDFC percebemos um fenótipo parecido com o dos animais que receberam DEX na vida adulta, porém isso não foi observado no grupo inteiro.

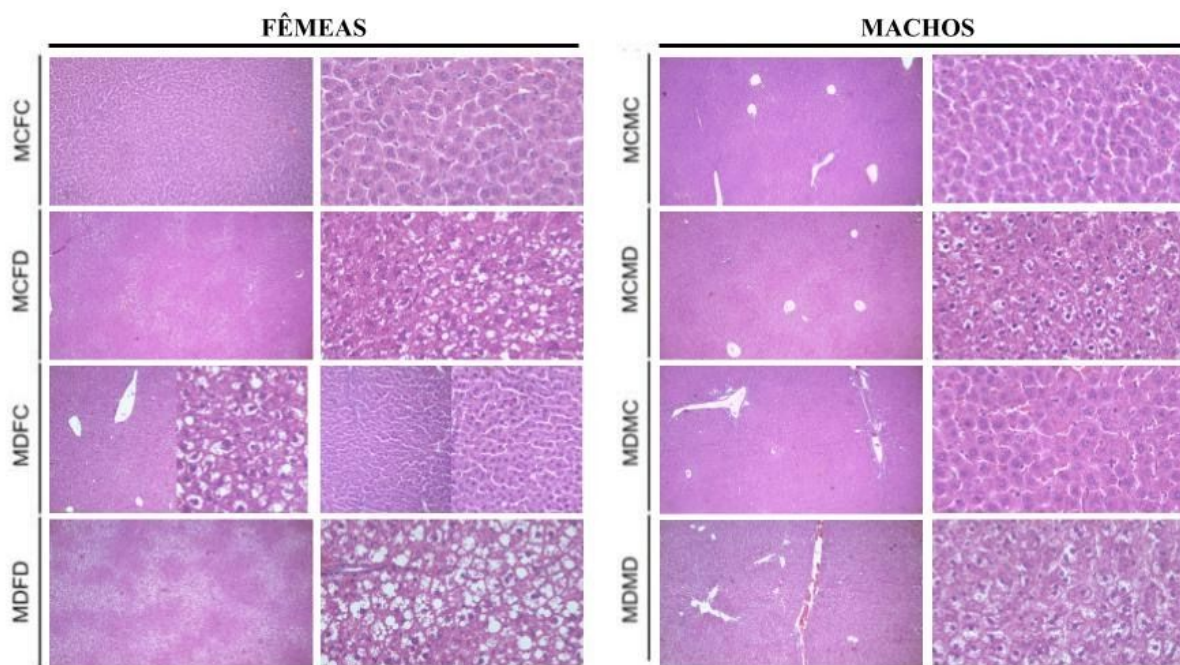


Fig. 5. Fígado da prole após tratamento com dexametasona na vida adulta. Imagens representativas da seção hepática com magnitudes finais de $40 \times$ e $400 \times$. Sendo a coluna da esquerda referente as fêmeas e a coluna da direita aos machos. As seções foram coradas com Hematoxilina e Eosina. Grupos experimentais: MCMC - macho controle oriundo de progenitora controle, MCFD - fêmea controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona, MCMD - macho controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona, MDMD - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora tratada com dexametasona, MDMC - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora controle, MDFC - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora controle, MDFD - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora tratada com dexametasona.

Na prole fêmea, o tratamento com GC na vida adulta resultou em maior massa das ilhotas no grupo MDFD (**Fig. 6a**), porém nos ratos machos, a exposição à GC, na progenitora ou na vida adulta, não influenciou a massa das ilhotas (**Fig. 6b**). Ocorreu um aumento da % endócrina nas fêmeas tratadas com DEX na vida adulta - grupos MCDFD e MDFD (**Fig. 6c**), mas nos machos (**Fig. 6d**) essa diferença não é encontrada.

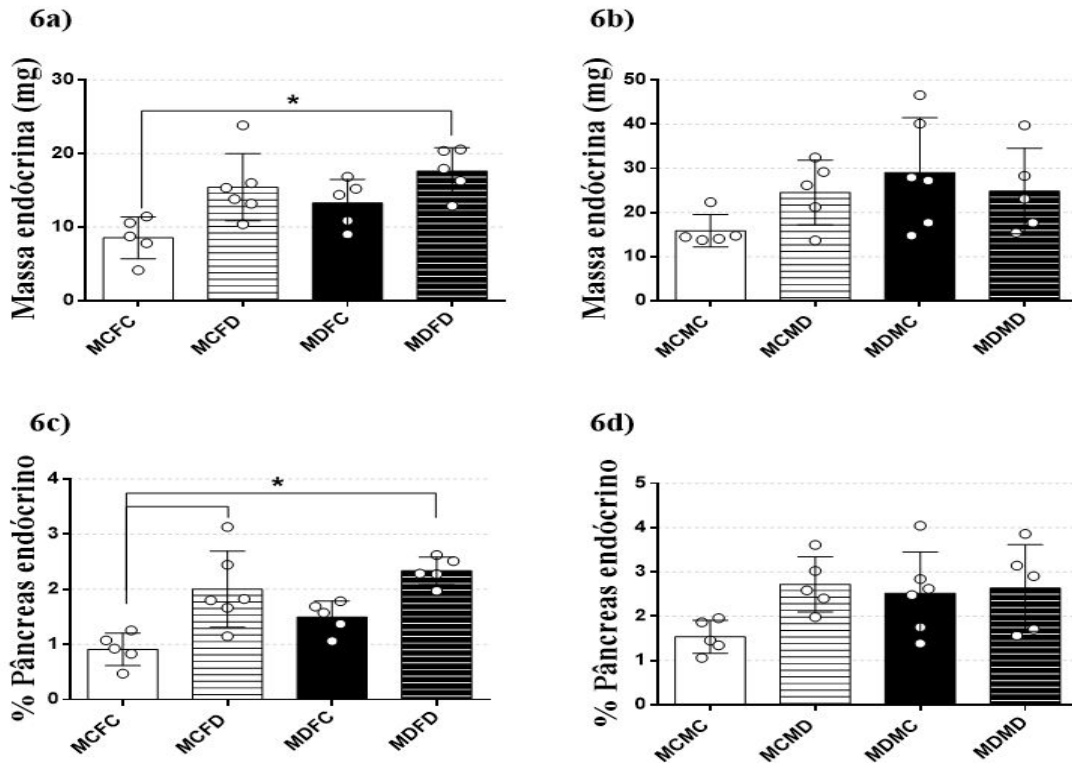


Fig. 6. Massa e % endócrina do pâncreas. A massa relativa das ilhotas (%) nos grupos feminino e masculino, respectivamente. Em (**Fig. 6**) a massa absoluta de ilhotas (mg) nos grupos feminino e masculino, respectivamente. Os resultados são expressos em média ± DP. O asterisco indica uma diferença significativa em comparação com os respectivos grupos controle (efeito do tratamento com dexametasona na vida adulta). Grupos experimentais: MCMC - macho controle oriundo de progenitora controle, MCFC - fêmea controle oriundo de progenitora controle, MCMD - macho controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona, MCDFD - fêmea controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona, MDMC - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora controle, MDFC - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora controle, MDMD - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora tratada com dexametasona e MDFD - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora tratada com dexametasona. Os dados são expressos em mediana e intervalo interquartil, aplicado Kruskal-Wallis nos gráficos (**Fig. 6**)

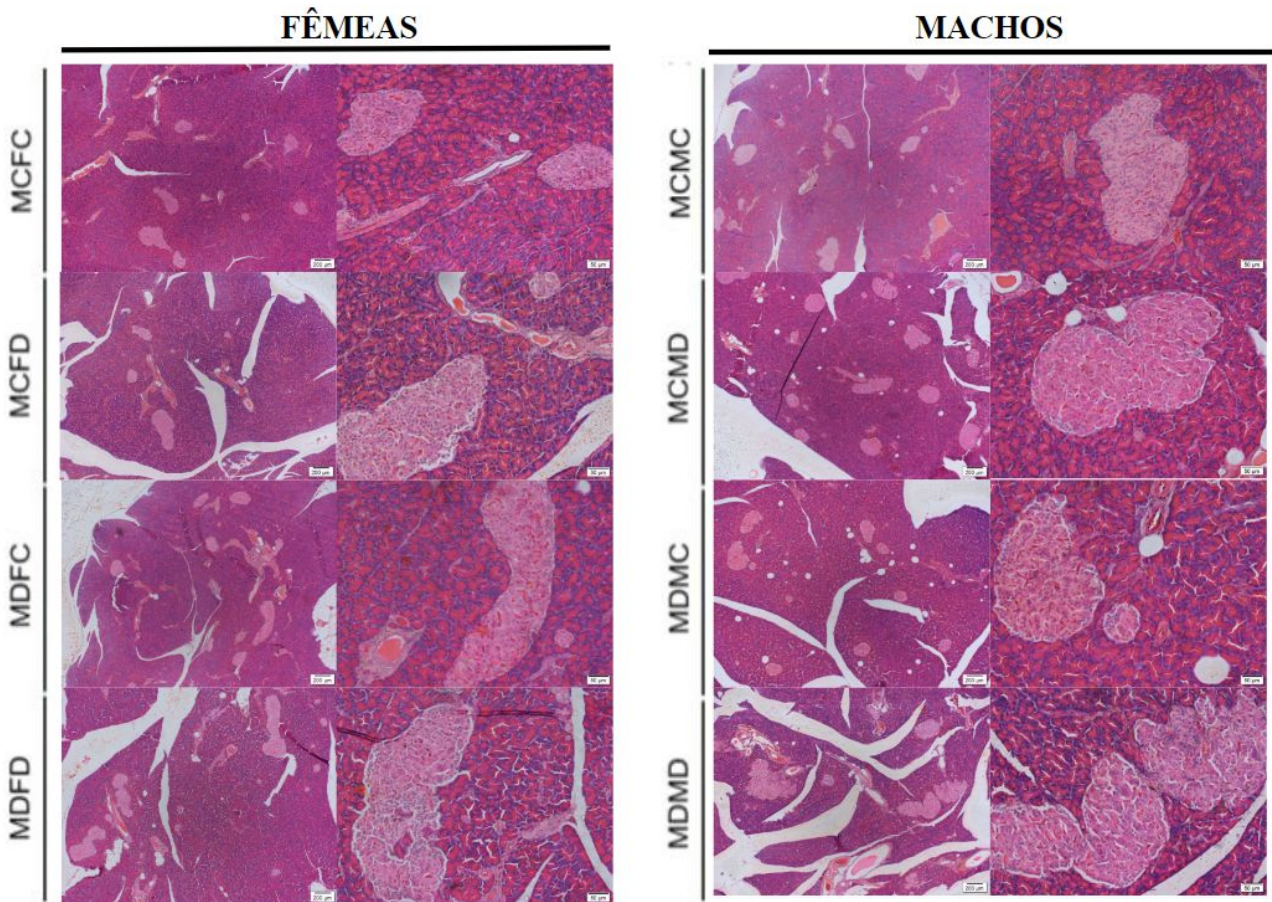


Fig. 7. Histologia de pâncreas - imagens representativas. As seções foram coradas com Hematoxilina e Eosina. Em **(Fig. 7)** Imagens representativas da seção do pâncreas com magnitudes finais de $40 \times$ e $200 \times$ (inserções) nos grupos masculino e feminino. Grupos experimentais: MCMC - macho controle oriundo de progenitora controle, MCFC - fêmea controle oriundo de progenitora controle, MCMD - macho controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona , MCFD - fêmea controle oriundo de progenitora tratada com dexametasona, MDMC - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora controle , MDFC - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora controle, MDMD - macho tratado com dexametasona oriundo de progenitora tratada com dexametasona e MDFD - fêmea tratada com dexametasona oriunda de progenitora tratada com dexametasona.

5. DISCUSSÃO

Os efeitos colaterais dos GCs são uma preocupação que reflete na escolha terapêutica, uma vez que tratamentos em doses altas ou de duração prolongada são comumente associados a efeitos diabetogênicos (20, 21). Em nosso estudo, expusemos as progenitoras ao tratamento com dexametasona na janela pré-gestacional e demonstramos que a prole de machos e fêmeas exibem pequenas disfunções hepáticas. No geral, a prole não teve modificações do peso ao nascer, variação da massa corporal, glicemia e tolerância à glicose aos 3 e 6 meses de idade, nem qualquer exacerbação relevante dessas ações diabetogênicas do GC quando expostos aos 6 meses de idade.

Estudos mostram que a exposição durante a prenhez (dia 14 a 21) ao GC (100µg/kg/dia) leva a um quadro de baixo peso ao nascer, que geralmente é normalizado durante o desenvolvimento desses animais (22, 23). Em nosso trabalho, demonstramos que o tratamento com dexametasona no período pré-coito não influencia a massa corporal dos filhotes no nascimento nem a variação da massa corporal dos filhotes até os 6 meses de idade. A literatura traz que independentemente de o GC ser na primeira ou na segunda semana de prenhez, não ocorre restrição de crescimento, vista no peso corporal, não tem efeito na resposta à insulina e na glicemia da prole, em ratos. Estes efeitos só ocorrem quando o GC entra no terço final da prenhez (24).

Como nenhum dos efeitos diabetogênicos clássicos foi observado na prole de até 6 meses de idade, desafiamos estes animais com a DEX em um modelo que é conhecido por levar à um contexto semelhante ao pré-diabetes (isto é, intolerância à glicose e dislipidemia) (19), esperando que este insulto revelasse a vulnerabilidade metabólica. Como observamos em nossos dados, esses ratos exibiram prejuízos mínimos nos efeitos colaterais esperados pelo tratamento com GC, como a redução da massa adiposa e o aumento da massa hepática na prole de fêmeas, redução dos níveis de AST plasmáticos na prole de machos.

A tolerância à glicose em ratos tratados com GC varia dependendo da dose, duração ou idade (25, 26). Ratos adultos machos normais submetidos a 5 dias de tratamento com DEX a 1 mg / kg p.c. se tornam intolerantes à glicose (27), o que também foi observado em nossos animais (**Fig. 3a-b**), porém não há um incremento causado pelo tratamento pré-coito com DEX nas progenitoras. A responsividade à insulina em ratos saudáveis tratados com DEX é diminuída, e ocorre de forma similar em seres humanos (5). Este fator também depende do tempo, da dose, da idade de

administração e é um efeito comum. Em nossos animais pudemos observar uma hiperglicemia de jejum acompanhada de menor responsividade à insulina, porém também não foi agravada pelo tratamento na progenitora.

O tecido adiposo é um órgão endócrino que desempenha um papel importante no fornecimento e estoque de energia, predominantemente mediado pela ação de hormônios - como a insulina, catecolaminas, entre outros. A regulação do tecido adiposo também é influenciada pelos GCs. Estudos demonstram que os GCs aumentam consistentemente a taxa de lipólise através do aumento da expressão de lipases do tecido adiposo, o que resulta na liberação de glicerol e ácidos graxos livres na circulação (28), que vai ao encontro com os dados observados na prole de fêmeas - grupo MDFD, onde vemos uma redução do acúmulo de gordura, provavelmente ocasionado pelo aumento da lipólise, porém que não tem relação com o tratamento na progenitora.

Vários estudos demonstram que a administração de GC, em altas doses e / ou períodos crônicos, promovem uma desregulação no metabolismo hepático da glicose, como o aumento da síntese de Triacilglicerol hepático, acúmulo de gordura e gliconeogênese, diretamente relacionada à redução da ação da insulina no fígado (29, 30, 31). Além das alterações funcionais, o tratamento com GC também altera a morfologia hepática, causando um maior acúmulo de gordura e glicogênio nos hepatócitos (32, 33). Então vemos animais com a massa do fígado aumentada nos grupos que receberam DEX na vida adulta. A administração de dexametasona no período pré-coito não altera a função hepática da prole (AST na prole fêmeas e ALT em ambos os sexos), porém a soma dos insultos parece causar uma redução dos níveis de AST plasmáticos nos machos. Não há piora das alterações no metabolismo lipídico e na função hepática causadas pela dexametasona na vida adulta (ou seja, aumento do acúmulo de glicogênio e triacilglicerol no fígado). Entretanto observamos o fenótipo celular hepático dos animais tratados com DEX na vida adulta em algumas fêmeas do grupo MDFC.

A literatura traz que em um primeiro momento o tratamento com GCs leva à um aumento da produção de insulina, pelas células β pancreáticas. Já em tratamentos prolongados, só o aumento da atividade celular já não é suficiente para vencer o quadro de resistência à insulina e intolerância à glicose, o que leva à um aumento da proliferação deste tipo celular, resultando um aumento da massa endócrina (34). O tratamento com DEX na vida adulta da prole de fêmeas causou um aumento da

massa de ilhotas e da % endócrina, porém o insulto durante período pré-gestacional não alterou estes parâmetros. Na prole de machos não foi observado esse aumento pelo tratamento com DEX na prole adulta, nem pelo insulto pré-gestação .

6. CONCLUSÃO

A administração de dexametasona no período pré-coito não causou impacto no metabolismo da prole adulta, nem piorou a ação diabetogênica do GC esperada quando esses ratos adultos foram tratados com dexametasona. Assim, concluímos que a exposição periconcepcional ao GC não tem um impacto na homeostase glicêmica na vida adulta. Esses resultados conferem validade ao uso do GC como propósitos anti-inflamatórios nesse período crítico.

7. REFERÊNCIAS

- 1) J.R. Seckl, M.C Holmes. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2007.
- 2) A. Jahan-Mihan, J. Rodriguez, C. Christie, M. Sadeghi, T. Zerbe. The Role of Maternal Dietary Proteins in Development of Metabolic Syndrome in Offspring. [Nutrients](#). 2015.
- 3) E. N. Ndonwi, B. Atogho-Tiedeu, E. Lontchi-Yimagou, T. S. Shinkafi, D. Nanfa, E. V. Balti, R. Indusmita, A. Mahmood, J. C. Katte, A. Mbanya, T. Matsha, J. C. Mbanya, A. Shakir, E. Sobngwi. Gestational Exposure to Pesticides Induces Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Offspring that Persist at Adult Age in an Animal Model. *Toxicol Res.* 2019.
- 4) T. O. Owuor, M. Reid, L. Reschke, I. Hagemann, S. Greco, Z. Modi, K. H. Moley. Maternal obesogenic diet induces endometrial hyperplasia, an early hallmark of endometrial cancer, in a diethylstilbestrol mouse model. *PLoS One.* 2018
- 5) N.O. McPherson; T. Fullston; H. W. Bakos; B. P. Setchell; M. Lane. Obese father's metabolic state, adiposity, and reproductive capacity indicate son's reproductive health. *Fertil Steril*, 2014.
- 6) K. I. Stanford, M. Rasmussen, L. A. Baer, A. C. Lehnig, L. A. Rowland, J. D. White, K. So, A. L. Sousa-Coehlo, M. F. Hirshman, M. Patti, O. J. Rando, L. J. Goodyear. Paternal Exercise Improves Glucose Metabolism in Adult Offspring. *Diabetes*, 2018.
- 7) Schäcke H.; Döcke W.; Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002
- 8) A. Rafacho; T. M. Cestari; S. R. Taboga; A. C. Boschero; J. R. Bosqueiro. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009
- 9) A. Rafacho; L. Marroquí; S. R. Taboga; L. J. Abrantes; L. R. Silveira; A. C. Boschero; E. M. Carneiro; J. R. Bosqueiro; A. Nadal; I. Quesada. Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. *Endocrinology.* 2010.
- 10) N. Nicod, V. Giusti, C. Besse, L. Tappy. Metabolic adaptations to dexamethasone-induced insulin resistance in healthy volunteers. *Obes Res.* 2003

- 11) B. Kuriya; S. Hernández-Díaz; J. Liu; B. L. Bermas; G. Daniel; D. H. Solomon. Patterns of medication use during pregnancy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2011.
- 12) A. Bachelot, V. Grouthier, C. Courtillot, J. Dulon, P. Touraine. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: update on the management of adult patients and prenatal treatment. *European Journal of Endocrinology*. 2017
- 13) R. S. Lindsay, R. M. Lindsay, B.J. Waddell, J. R. Seckl. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycemia in the rat: studies with the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia*, 39: 1299-1305, 1996.
- 14) M J Nyirenda, R S Lindsay, C J Kenyon, A Burchell, and J R Seckl. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest*. 101(10):2174–2181, 1998.
- 15) J R Seckl and M C Holmes. Mechanisms of Disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal ‘programming’ of adult pathophysiology. *Nature*, 2007.
- 16) M. Dahlhoff; S. Pfister; A. Blutke; J. Rozman; M. Klingenspor; M. J. Deutsch; B. Rathkolb; B. Fink; M. Gimpfl; M. Hrabě de Angelis; A. A. Roscher; E. Wolf; R. Ensenauer. Peri-conceptual obesogenic exposure induces sex-specific programming of disease susceptibilities in adult mouse offspring. *Biochim Biophys Acta*, 2014.
- 17) A. J. Drake; B. R. Walker; J. R. Seckl. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005.
- 18) A. S. Leonard, K. M. Rasmussen, J. C. King, B. Abrams. Trajectories of maternal weight from before pregnancy through postpartum and associations with childhood obesity. *Am J Clin Nutr*. 2017.
- 19) T. O. Owuor, M. Reid, L. Reschke, I. Hagemann, S. Greco, Z. Modi, K. H. Moley. Maternal obesogenic diet induces endometrial hyperplasia, an early hallmark of endometrial cancer, in a diethylstilbestrol mouse model. *PLoS One*. 2018
- 20) H. Schäcke, W.D. Döcke, K. Asadullah, Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids, *Pharmacol. Ther.* 2002.

- 21) A.M. Pasiaka, A. Rafacho, Impact of glucocorticoid excess on glucose tolerance: clinical and preclinical evidence, *Metabolites*, 2016.
- 22) D. O'Regan, C.J. Kenyon, J.R. Seckl, M.C. Holmes, Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004.
- 23) A.J. Drake, B.R. Walker, J.R. Seckl, Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2005.
- 24) M.J. Nyirenda, R.S. Lindsay, C.J. Kenyon, A. Burchell, J.R. Seckl, Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring, *J. Clin. Investig.* 101 (1998)
- 25) Novelli M, De Tata V, Bombara M, Lorenzini A, Masini M, Pollera M, Bergamini E, Masiello P. Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. *J Endocrinol.* 1999.
- 26) Holness M.J. & Sugden M.C. Dexamethasone during late gestation exacerbates peripheral insulin resistance and selectively targets glucose-sensitive functions in beta cell and liver. *Endocrinology.* 2001.
- 27) Rafacho A1, Giozzet VA, Boschero AC, Bosqueiro JR. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas.* 2008.
- 28) Djurhuus C.B., Gravholt C.H., Nielsen S., Pedersen S.B., Møller N., Schmitz O. Additive effects of cortisol and growth hormone on regional and systemic lipolysis in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004;
- 29) Mokuda O., Sakamoto Y., Ikeda T., Mashiba H. Sensitivity and responsiveness of glucose output to insulin in isolated perfused liver from dexamethasone-treated rats. *Horm. Metab. Res.* 1991
- 30) Van Raalte D.H., Nofrate V., Bunck M.C., van Iersel T., Elassaiss Schaap J., Nässander U.K., Heine R.J., Mari A., Dokter W.H., Diamant M. Acute and 2-week exposure to prednisolone impair different aspects of beta-cell function in healthy men. *Eur. J. Endocrinol.* 2010;

31) Nader N., Ng S.S., Wang Y., Abel B.S., Chrousos G.P., Kino T. Liver X receptors regulate the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor: Implications for the carbohydrate metabolism. PLoS ONE. 2012.

32) A. Rafacho, J.L. Abrantes, D.L. Ribeiro, F.M. Paula, M.E. Pinto, A.C. Boschero, J.R. Bosqueiro, Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats, Horm. Metab. Res. 2011.

33) F.A. Gomes, R.A. Flores, M.A. Bruxel, F.N. da Silva, E.L.G. Moreira, D.B. Zoccal, R.D. Prediger, A. Rafacho, Glucose homeostasis is not affected in a murine model of Parkinson's disease induced by 6-OHDA, Front. Neurosci. 12 (2019) 1020, [https:// doi.org/10.3389/fnins.2018.01020](https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01020).

34) Rafacho A.; Boschero A.C.; Ortsäter H. Capítulo: “Functional and Molecular Aspects of Glucocorticoids in the Endocrine Pancreas and Glucose Homeostasis”. INTECH Open Access Publisher. 2012: