

Katia Motta

**AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE LIPÍDICA NO PERÍODO  
FINAL DA GESTAÇÃO DE RATAS EXPOSTAS A  
DEXAMETASONA**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação Multicêntrico em  
Ciências Fisiológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para obtenção do grau de  
Doutor em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Alex Rafacho  
Coorientadora: Profa. Dra. Silvana  
Auxiliadora Bordin

Florianópolis  
2017

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

Motta, Katia

AValiação DA HOMEOSTASE LIPÍDICA NO  
PERÍODO FINAL DA GESTAÇÃO DE RATAS  
EXPOSTAS A DEXAMETASONA / Katia Motta ;  
orientador, Alex Rafacho, coorientador, Silvana  
Auxiliadora Bordin, 2017. 109 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas,  
Florianópolis, 2017.

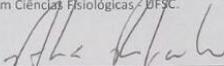
Inclui referências. 1. Ciências Fisiológicas. 2. Gestação.  
3. Dexametasona. 4. Homeostase lipídica. I. Rafacho,  
Alex . II. Bordin, Silvana Auxiliadora. III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
Multicêntrico em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

"Avaliação da homeostase lipídica no período final da gestação de ratas expostas a dexametasona"

Por

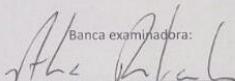
Katia Motta

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (06/PPGMCF/2017) do Programa de Pós-Graduação em Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, UFSC.



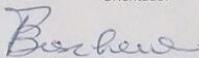
Prof. Dr. Alex Rafacho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Multicêntrico em Ciências Fisiológicas



Banca examinadora:

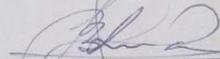
Dr. Alex Rafacho (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador



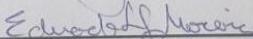
Dr. Antonio Carlos Boschero (Universidade Estadual de Campinas)



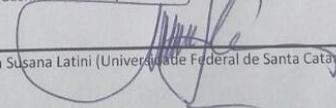
Dr. Everardo Magalhães Carneiro (Universidade Estadual de Campinas)



Dr.ª Fernanda Barbosa Lima Christian (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Alexandra Susana Latini (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 01 de setembro de 2017.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Rui e Solange e minha irmã Ariana, sem os quais essa longa caminhada não seria possível. Obrigada pelo apoio e esforço que dedicaram ao longo de todos esses anos para que eu alcançasse os meus objetivos.

Agradeço ao meu namorado Raphael, que esteve comigo em todos os momentos e me ajudou a superar cada dificuldade.

Agradeço ao meu orientador Alex, por ter aberto as portas da pós-graduação, pelos ensinamentos e incentivo à pesquisa.

Agradeço a prof. Silvana Bordin por ter aceito ser minha coorientadora e por todas as suas contribuições.

Aos professores Alexandra Susana Latini, Fernanda Barbosa Lima Christian, Helena Iturvides Cimarosti, Antonio Carlos Boschero, Everardo Magalhães Carneiro, Eduardo Luis Gasnhar Moreira e Everson Araújo Nunes por disponibilizarem do seu tempo para avaliar e aprimorar esse trabalho enquanto banca examinadora.

A todos os meus amigos do grupo LIDoC que fizeram parte desta história. Foram anos de amizade e aprendizado que jamais serão esquecidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e a Universidade Federal de Santa Catarina, por terem aberto as portas para meu ingresso na pesquisa.



## RESUMO

O período final da gestação é caracterizado por alterações nas concentrações hormonais maternas que resultam em hidrólise dos estoques de gordura, dislipidemia e redução da sensibilidade à insulina. Essas alterações maternas influenciam o crescimento e o desenvolvimento fetal. A prescrição de fármacos, como os glicocorticoides (GC) pode ocorrer durante qualquer fase da gestação. No terço final da gestação, os GCs podem ser prescritos se houver indicação de parto prematuro. Muitos estudos acerca do impacto da terapia a base de GC no período final da gestação têm direcionado o foco para os efeitos sobre a prole (i.e., baixo peso ao nascer, déficit no desenvolvimento de órgãos e prejuízos cardiometabólicos na vida adulta). No entanto, os efeitos sobre a saúde materna são negligenciados. Considerando os efeitos adversos que os GCs podem causar num contexto não gravídico, como dislipidemia e intolerância à glicose, o objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros relacionados à homeostase lipídica e glicêmica ao final da gestação em ratas tratadas com dexametasona, bem como identificar possíveis alterações na expressão de alvos moleculares hepáticos e do tecido adiposo. Para isto, ratas Wistar com 75-80 dias de idade receberam dexametasona (0,2 mg/kg/dia, diluída na água de beber) entre o 14º e o 19º dia de gestação. Ratas prenhes não tratadas com dexametasona e ratas virgens foram utilizadas como controles. Foram avaliados o peso corpóreo e o peso relativo dos órgãos, consumo de ração, concentração de glicose e triacilglicerol antes do início do tratamento (13º dia de gestação) e após o término (20º dia de gestação), teste oral de tolerância à glicose e aos lipídeos, avaliação da exportação hepática e depuração plasmática de triacilglicerol, expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico, bem como outros parâmetros funcionais, bioquímicos e moleculares. O tratamento com a dexametasona promoveu redução de peso corpóreo e de consumo de ração nas ratas virgens e interrompeu o ganho de peso nas ratas prenhes. Tanto o tratamento com a dexametasona como a prenhez *per se* não alteraram a homeostase glicêmica ao final da gestação, baseado nas concentrações de glicose sanguínea em jejum e no teste de tolerância à glicose. Sobre a homeostase lipídica, no entanto, a prenhez resultou em elevação nas concentrações de triacilglicerol em jejum, intolerância aos lipídios e redução de depuração plasmática no 20º dia de gestação, com impacto moderado causado pelo tratamento com dexametasona na tolerância aos lipídeos. Três dias após o termo as concentrações plasmáticas de triacilglicerol foram reestabelecidas e



assim se mantiveram até seis meses após o desmame, sem efeito tardio causado pela dexametasona. Com relação aos dados da prole, o tratamento com a dexametasona na gestação resultou redução do peso corpóreo e óbito dos neonatos até 3 dias após o nascimento. Desta forma, concluímos que a exposição ao GC durante o terço final da gestação de ratas não resulta em impactos marcantes na homeostase dos lipídeos maternos ou mais tarde na vida (pós-termo). No entanto, reforçamos que o uso de GC durante a gravidez deve ser limitado considerando o marcante impacto na sobrevivência pós-natal da prole.

Palavras-chaves: dexametasona, triacilglicerol, gestação, glicocorticoide, tolerância aos lipídeos



## ABSTRACT

The final period of gestation is characterized by changes in maternal hormonal concentrations that result in hydrolysis of fat stores, dyslipidemia and reduced insulin sensitivity. These maternal changes influence fetal growth and development. Prescription of drugs, such as glucocorticoids (GC) can occur during any stage of gestation. In the late third of gestation, GCs may be prescribed if there is indication of preterm delivery. Many studies on the impact of GC-based therapy in the late gestation period have targeted the effects on offspring (i.e., low birth weight, organ development deficit, and cardiometabolic damage in adult life). However, the effects on maternal health are neglected. Considering the adverse effects that GCs can cause in a non-gravid context, such as dyslipidemia and glucose intolerance, the objective of this study was to evaluate parameters related to lipid and glycemic homeostasis at the end of gestation in rats treated with dexamethasone, as well as to identify possible changes in expression of hepatic and adipose tissue targets. For this, female Wistar rats with 75-80 days of age received dexamethasone (0.2 mg / kg / day, diluted in drinking water) between the 14th and 19th day of gestation. Pregnant rats not treated with dexamethasone and virgin rats were used as controls. The body weight and relative organ weight, food intake, glucose and triacylglycerol concentration before the start of treatment (13th day of gestation) and after the end (20th day of gestation), oral glucose and lipid tolerance test, hepatic triacylglycerol export and plasma clearance of triacylglycerol, expression of genes involved in lipid metabolism, as well as other functional, biochemical and molecular parameters. Dexamethasone treatment resulted in reduced body weight and food intake in virgin rats and abrogated weight gain in pregnant rats. Both dexamethasone treatment and pregnancy *per se* did not alter glycemic homeostasis at the end of gestation, based on fasting blood glucose concentrations and the glucose tolerance test. On lipid homeostasis, however, pregnancy resulted in elevations in fasting triacylglycerol concentrations, lipid intolerance, and reduction of plasma clearance on the 20th day of gestation, with a moderate impact caused by dexamethasone treatment in lipid tolerance. Three days after the end of the study, plasma concentrations of triacylglycerol were reestablished and were maintained up to six months after weaning, with no delayed effect caused by dexamethasone. With regard to offspring data, treatment with dexamethasone during pregnancy resulted in a reduction in body weight and death of neonates up to 3 days after birth. Thus, we



conclude that exposure to GC during the final third of gestation of rats does not result in marked impacts on homeostasis of maternal lipids or later in life (post-term). However, we emphasize that the use of GC during pregnancy should be limited considering the marked impact on the postnatal survival of offspring.

**Key words:** dexamethasone, triacylglycerol, gestation, glucocorticoid, lipid tolerance



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental. ....	44
Figura 2 - Peso corpóreo e consumo de ração em ratas prenhes controles e tratadas com dexametasona .....	55
Figura 3 - Concentrações de glicose sanguínea e triacilglicerol plasmático em ratas prenhes controles e tratadas com dexametasona...	56
Figura 4 - Teste oral de tolerância aos lipídeos; exportação hepática e depuração plasmática de triacilglicerol em ratas prenhes controles e tratadas com dexametasona. ....	59
Figura 5 - Perímetro dos adipócitos do tecido adiposo perigonadal de ratas prenhes controle de tratadas com dexametasona. ....	60
Figura 6 - Expressão do RNAm de genes envolvidos no metabolismo lipídico no fígado. ....	66
Figura 7 - Expressão do RNAm de genes envolvidos no metabolismo lipídico no tecido adiposo perigonadal.....	67
Figura 8 - Parâmetros metabólicos das ratas até seis meses após o desmame.....	69
Figura 9 - Dados dos neonatos. ....	70



## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1- Sumário das alterações causadas pela prenhez e pelo tratamento com a dexametasona no terço final da gestação sobre os parâmetros avaliados .....	70
--	----



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das principais alterações hormonais que ocorrem nos terços inicial e final da gestação e seus efeitos sobre o metabolismo materno.....	33
Tabela 2 - Lista de primers.....	52
Tabela 3- Massa dos órgãos, dados plasmáticos e metabólicos no 20º dia de gestação. ....	61



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 $\beta$ -HSD1 - 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase, tipo 1  
11 $\beta$ -HSD2 - 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase, tipo 2  
ACC - Acetil-CoA carboxilase  
AGL - Ácidos graxos livres  
ApoA-I Apolipoproteína AI  
ApoB100 - Apolipoproteína B100  
ATGL - Lipase do triacilglicerol  
cDNA - DNA complementar  
CP – Ratas controle prenhe  
CRH – Hormônio liberador de corticotrofina  
DP – Ratas prenhes tratadas com dexametasona  
FAS - Sintase dos ácidos graxos  
GC – Glicocorticoides  
GH – Hormônio do crescimento  
GR - Receptor de glicocorticoide  
HDL - Lipoproteína de alta densidade  
HHA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal  
hPL - Lactogênio placentário humano  
HSL - Lipase hormônio-sensível  
HSP - Proteína de choque térmico “heat shock protein”  
IGF II – Hormônio semelhante à insulina II  
JNK - Cinase c-Jun N-terminal  
LDL - Lipoproteína de baixa densidade  
LDL- R - Receptor de LDL LPL – Lipase lipoproteica  
LRP - proteína relacionada ao receptor de LDL  
MAP cinase – proteína cinase ativada por mitógenos  
MGL - lipase do monoacilglicerol MKP-3 - cinase fosfatase 3 da  
proteína ativada por mitógenos  
MTP - proteína de transferência microsomal  
PERPP - proteólise pré-secretória pós-RE  
PI3K - fosfatidil inositol 3 cinase  
PKA - proteína cinase A  
PKB - Proteína Cinase B  
RE - retículo endoplasmático rugoso  
SREBP1c - proteína ligada ao elemento regulador de esteroides 1c  
VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade



## SUMÁRIO

1.1 REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE LIPÍDICA.....	27
1.2 ADAPTAÇÕES METABÓLICAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL .....	29
1.3 GLICOCORTICOIDES E GESTAÇÃO.....	34
1.4 EFEITOS DOS GCs SOBRE A HOMEOSTASE LIPÍDICA E POTENCIAIS EFEITOS NA GESTAÇÃO.....	38
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 ANIMAIS .....	43
3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO COM DEXAMETASONA.....	43
3.3 PESO CORPÓREO E CONSUMO DE RAÇÃO (LOTES 1, 2, 3, 4 e 5).....	44
3.4 GLICOSE SANGUÍNEA E TRIACILGLICEROL PLASMÁTICO EM JEJUM (LOTES 1, 2, 3, 4 E 5).....	45
3.5 SENSIBILIDADE À INSULINA PELO MODELO DE ANÁLISE HOMEOSTÁTICA (HOMA) (LOTE 3).....	45
3.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS (TODOS OS LOTES).....	45
3.7 PARÂMETROS PLASMÁTICOS E PERFIL HEPÁTICO (LOTE 3).....	45
3.8 PESO DE ÓRGÃOS (LOTE 3).....	46
3.9 CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO (LOTES 1 E 3) .....	46
3.10 CONTEÚDO DE TRIACILGLICEROL HEPÁTICO (LOTES 1 E 3) .....	46
3.11 LIPÓLISE DO TECIDO ADIPOSEO (LOTE 3).....	47



3.12	TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (ipGTT) (LOTES 1 e 3).....	47
3.13	TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA AOS LIPÍDEOS (oTTL) (LOTES 2 e 4).....	48
3.14	MORFOLOGIA DOS ADIPÓCITOS (Lote 3).....	48
3.15	EXPORTAÇÃO E DEPURACÃO DO VLDL HEPÁTICO (LOTE 5).....	49
3.16	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL (LOTE 3).....	49
3.17	INTEGRIDADE DO RNA (LOTE 3).....	50
3.18	OBTENÇÃO DO cDNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (LOTE 3).....	50
3.19	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS mRNAs POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL (LOTE 3).....	50
3.20	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
4.1.	PESO CORPÓREO E CONSUMO DE RAÇÃO .....	55
4.2	PARÂMETROS GLICÊMICOS E LIPÍDICOS .....	55
4.3	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FUNCIONAIS DO METABOLISMO LIPÍDICO E MORFOMETRIA DO TECIDO ADIPOSE.....	57
4.4	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS PÓS-EUTANÁSIA .....	60
4.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNA <sub>m</sub> POR PCR EM TEMPO REAL DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO LIPÍDICO.....	63
4.5	PARÂMETROS METABÓLICOS PÓS-TERMO E DADOS DA PROLE .....	68
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>109</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 REGULAÇÃO DA HOMEOSTASE LIPÍDICA

Os lipídeos circulam na corrente sanguínea por meio de lipoproteínas, que diferem em tamanho e densidade dependendo do conteúdo de lipídeos e apolipoproteínas que constituem cada partícula (GINSBERG, 1991; VERGÈS, 2015). Os lipídeos provenientes da dieta circulam por meio de quilomícrons (repletos de triacilglicerol, éster de colesterol, fosfolipídeos, vitaminas lipossolúveis, entre outros) enquanto que os lipídeos sintetizados no fígado (endógenos) circulam predominantemente por meio de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL). Esta última transfere lipídeos do plasma e dos tecidos extra-hepáticos ao fígado onde são depurados (GINSBERG, 1991).

As VLDLs estão constituídas por proteínas denominadas apolipoproteína B100 (ApoB100). Sua montagem inicia no retículo endoplasmático rugoso onde a ApoB100 sofre lipidação pela proteína de transferência microssomal (MTP) para formar a pré-VLDL (OLOFSSON; STILLEMARCK-BILLTON; ASP, 2000; VERGÈS, 2010). Após esse passo, a pré-VLDL tem mais lipídeos incorporados formando então a VLDL2 que deixa o retículo endoplasmático via vesículas Sar1/COPII em direção ao complexo de Golgi (OLOFSSON; STILLEMARCK-BILLTON; ASP; 2000). No complexo de Golgi, as VLDL2 podem ser secretadas na circulação; podem receber maior lipidação pelas enzimas fosfolipase D1 e cinase regulada por sinal extracelular 2 configurando assim VLDL1 ou podem ser degradadas por proteólise pré-secretória pós-retículo endoplasmático (PERPP) (VERGÈS, 2010).

A depuração do triacilglicerol do plasma é dependente da lipase lipoproteica (LPL), uma enzima ancorada aos capilares endoteliais de algumas células, que inclui miócitos, cardiomiócitos e adipócitos, e catalisa a hidrólise do triacilglicerol. Este processo promove a liberação de ácidos graxos livres (AGL) que são transportados a partir da membrana luminal do endotélio capilar dessas células favorecendo o seu armazenamento ou utilização intracelular (VERGÈS, 2005).

O tecido adiposo branco desempenha importante controle no balanço energético e do metabolismo de substratos energéticos. Suas

funções principais são atuar como um reservatório de triacilglicerol e mobilizar os AGL e glicerol, de acordo com demandas energéticas em situações como no jejum e durante exercício físico, condições que demandam energia (GIORGINO; LAVIOLA; ERIKSSON, 2005; MEEEX; SCHRAUWEN; HESSELINK, 2009; THOMPSON et al., 2010). O armazenamento de AGL na forma de triacilglicerol pelo tecido adiposo branco previne elevações nas suas concentrações plasmáticas (FRAYN, 2002).

A dinâmica entre o armazenamento e a utilização do triacilglicerol como fonte de energia é regulada por diferentes hormônios, especialmente pela insulina e pelas catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) (BODEN; HOELDTKE, 2003). Em situações de necessidade elevada de energia, como é observado durante o jejum, o exercício físico, o trauma e o estresse, os estoques de triacilglicerol são mobilizados a partir do tecido adiposo na forma de AGL e glicerol, processo denominado de lipólise, a fim de garantir o fornecimento de substrato energético aos tecidos num curto prazo (BELFRAGE et al., 1981). Os hormônios noradrenalina e adrenalina são os principais estimuladores da lipólise e agem por meio da ligação a receptores de membrana  $\beta$ -adrenérgicos que incluem os subtipos  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (STRALFORS; BELFRAGE, 1983).

A hidrólise do triacilglicerol depende da atividade de três enzimas lipolíticas, a lipase do triacilglicerol (ATGL), a lipase hormônio sensível (HSL) e a lipase do monoacilglicerol (MGL) (SCHWEIGER et al., 2006). A ATGL é responsável pela hidrólise do triacilglicerol, que resulta na dissociação em diacilglicerol e um ácido graxo. Na sequência, a HSL hidrolisa o diacilglicerol resultando em monoacilglicerol e outro ácido graxo. Por fim, a enzima MGL hidrolisa o produto resultante em glicerol e um terceiro ácido graxo (FREDRIKSON et al., 1981; ZIMMERMANN, 2004; SCHWEIGER et al., 2006).

No estado pós-prandial, o catabolismo induzido pelas catecolaminas é inibido dando lugar a um processo anabólico, antilipolítico, regulado principalmente pelas elevações das concentrações de insulina (LARGE et al., 2004). A insulina estimula a reesterificação dos AGL nos adipócitos, na forma de triacilglicerol, e suprime a atividade lipolítica no tecido adiposo (JENSEN; NIELSEN, 2007). Deste modo, a insulina regula a quantidade de AGL circulantes (AVRAMOGLU; BASCIANO; ADELI, 2006). A insulina também está envolvida nas outras etapas da produção e secreção de VLDL. No fígado, a insulina inibe a transcrição gênica da MTP, reduzindo a transferência de triacilglicerol para a ApoB100 (LIN; GORDON;

WETTERAU, 1995). A taxa de produção e degradação da ApoB100 é determinada pela quantidade de lipidação, de modo que a redução da disponibilidade hepática dos AGL, causada pela insulina, leva ao aumento da sua degradação, causando assim uma redução na síntese de VLDL (VERGÈS, 2010). Além disso, a insulina também reduz a síntese do RNAm da ApoB100 (KARIMIAN; ADELI, 2011).

Simultaneamente à inibição da lipólise, a insulina atua como um importante estimulador da lipogênese (GATHERCOLE et al., 2011). A lipogênese ocorre tanto pela reesterificação dos AGL com o glicerol como pela síntese de triacilglicerol a partir de substratos não lipídicos, como a glicose, processo chamado lipogênese *de novo*. A síntese de lipídeos ocorre no fígado e no tecido adiposo branco e os triacilgliceróis sintetizados se situam armazenados nas gotículas lipídicas citosólicas (STRAWFORD et al., 2004). Na lipogênese *de novo*, a síntese de AGL a partir de glicose inicia com a acetil-CoA, o produto da ação da piruvato desidrogenase no metabolismo final da via glicolítica. A acetil-CoA é carboxilada à malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACC), que é subsequentemente convertida a palmitato pela sintase dos ácidos graxos (FAS), uma enzima determinante da velocidade da lipogênese (HILLGARTNER; SALATI; GOODRIDGE, 1995; SUL; WANG, 1998). A insulina regula a lipogênese por meio da ativação da proteína ligada ao elemento regulador de esteroides 1c (SREBP1c), em hepatócitos (FORETZ et al., 1999) e adipócitos (LE LAY et al., 2002). A SREBP1c, por sua vez, aumenta a expressão de muitas enzimas envolvidas na síntese de colesterol, AGLs, triacilgliceróis e fosfolípidos como a FAS e a ACC (LOPEZ et al., 1996; BROWN; GOLDSTEIN, 1997; LE LAY et al., 2002; EBERLÉ et al., 2004). Além disso, a insulina é um potente ativador da LPL periférica, estimulando a depuração das lipoproteínas ricas em triacilglicerol, como os quilomícrons e as VLDLs (BERGÖ; OLIVECRONA; OLIVECRONA, 1996; LEE; SMITH; FRIED, 1998).

## 1.2 ADAPTAÇÕES METABÓLICAS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL

A gravidez (seres humanos) e a prenhez (animais) pode ser considerada um período de estresse para o organismo materno. Durante este período o organismo materno está exposto a maior atividade metabólica a fim de satisfazer as necessidades de desenvolvimento do feto e, para isto, seu metabolismo deve se adaptar às fases gestacionais

(WILLIAMS, 2003). Devido a mudanças nas condições hormonais (i.e., aumento nas concentrações de estrogênio, progesterona, prolactina, hormônio do crescimento (GH) placentário e lactogênio placentário (hPL)), uma série de alterações fisiológicas ocorre no metabolismo lipídico e glicêmico (POTTER; NESTEL, 1979; HERRERA et al., 1994a; COUSINS, 1991; LAIN; CATALANO, 2007).

O metabolismo lipídico normal durante a gravidez/prenhez tem sido investigado em diversos estudos tanto em mulheres (PUNNONEN, 1977; KNOPP et al., 1986; JIMENEZ et al., 1988) como em ratas (ARGILES; HERRERA, 1981; HERRERA; MUNILLA, 1997). Duas manifestações comuns que ocorrem ao longo da gestação são o acúmulo de lipídios nos tecidos maternos (VILLAR et al., 1992, ALVAREZ et al., 1996) e o desenvolvimento de hiperlipidemia materna (KNOPP et al., 1986; ALVAREZ et al., 1996; SORIA et al., 1996; MUNILLA; HERRERA, 1997).

O acúmulo de gordura é o maior responsável pelo aumento no peso corporal materno, além do próprio feto, durante a gestação (HYTTEN; LEITCH, 1971; KING et al., 1994) e prenhez (LÓPEZ-LUNA; MAIER; HERRERA, 1991). Este acúmulo de gordura ocorre durante os primeiros dois terços de gestação/prenhez, devido à hiperfagia, estimulada principalmente pelas altas concentrações plasmáticas de progesterona e prolactina e pela lipogênese que, além da progesterona e prolactina, é estimulada pelo aumento da secreção de insulina que ocorre no primeiro terço gestacional (LOPEZ-LUNA et al., 1986; HERRERA et al., 1991; MARTIN-HIDALGO et al., 1994; NEWBERN; FREEMARK, 2011). Este acúmulo de lipídeos diminui ou é interrompido durante o último terço, em parte, devido à diminuição da atividade da LPL do tecido adiposo (OTWAY; ROBINSON, 1968; RAMIREZ; LLOBERA; HERRERA, 1983; ALVAREZ et al., 1996). A redução da captação de lipídeos pelo tecido adiposo, juntamente com a atividade lipolítica aumentada, resulta em redução da massa adiposa neste terço final (HERRERA et al., 1988; HERRERA et al., 1994a).

As alterações na concentração de lipídeos plasmáticos são representadas por aumentos modestos, ou nenhuma alteração no início da gravidez/prenhez e relevantes elevações a partir do terceiro trimestre/terço final da gestação, especificamente, nas concentrações de triacilglicerol e, em menor extensão, de colesterol (ARGILES; HERRERA, 1981; HERRERA et al., 1994b; HERRERA; MUNILLA, 1997; ALVAREZ et al., 1996). Um estudo realizado em mulheres, de Brizzi et al., (1999) demonstraram que, no terço inicial da gestação, as concentrações de colesterol e triacilglicerol plasmáticos são semelhantes

ao de mulheres não grávidas (177 mg/dL e 88 mg/dL, respectivamente) e aumento significativo ocorre no segundo (247 mg/dL e 132mg/dL, respectivamente) e terceiro trimestre da gestação (286 mg/dL, 194 mg/dL, respectivamente). Corroborando esses achados, Desoye et al., (1987), demonstraram que as concentrações de colesterol total aumentam em 60%, a LDL aumenta em 44% enquanto as concentrações de triacilglicerol aumentam entre 2 a 4 vezes na 38ª semana de gestação. Também há alterações nas concentrações de outros fatores envolvidos na maquinaria lipídica; a atividade e RNAm da HSL são suprarreguladas, o que acarreta em maior hidrólise do triacilglicerol e aumento da produção de VLDL no fígado. Em paralelo a essas alterações, a atividade da enzima LPL diminui, principalmente no tecido adiposo, o que redireciona o triacilglicerol para outros tecidos, como útero e músculos esquelético (MARTIN-HIDALGO et al., 1994).

Outra adaptação fisiológica subjacente a todas as gestações é a alteração na sensibilidade à insulina. Durante a fase inicial da gravidez/prenhez, ocorre um aumento na função das células  $\beta$  pancreáticas, observado em mulheres (BUCH; HORNNES; KUHL, 1986) e em ratas (MUÑOZ; LÓPEZ-LUNA; HERRERA, 1995) que, em parte, está relacionada com a redução da produção do GH materno (NEWBERN; FREEMARK, 2011). Nesta fase, a sensibilidade à insulina é inalterada ou mesmo aumentada (FISHER et al., 1974; HERRERA et al., 1994b) e a glicemia de jejum está normalmente reduzida (MILLS et al., 1998). Em estudo com mulheres grávidas, Catalano; Drago; Amini, (1998) relataram que a primeira e segunda fase de secreção de insulina aumenta em quase 300% ao longo da gestação. Esse quadro se altera, em humanos, por volta de 24-28 semanas de gestação, quando pode ocorrer diminuição da sensibilidade à insulina que progride ao longo do terceiro trimestre (HERRERA; ORTEGA-SENOVILLA, 2010). Por volta da 34ª semana gestacional a sensibilidade à insulina é em torno de 50–60% do estado pré-gravídico (CATALANO et al., 1991) ainda que seja observada hiperinsulinemia materna (COUSINS, 1991; GIRARD et al., 1987; LETURQUE et al., 1980). A redução na sensibilidade à insulina ao longo da gestação é ocasionada pelo aumento nas concentrações de cortisol livre (MASTORAKOS; ILIAS, 2003), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (KIRWAN et al., 2002), progesterona (RYAN; ENNS, 1988) e, principalmente, o GH placentário, que, assim como o GH materno, é um potente antagonista da ação da insulina (NEWBERN; FREEMARK, 2011). Com o aumento da massa de células  $\beta$  pancreáticas e aumento na produção de insulina estimulados pela prolactina e hPL placentário em

face à resistência à insulina, não se observa alterações relevantes no metabolismo da glicose durante a gravidez/prenhez (CATALANO; DRAGO; AMINI, 1998). Caso a massa e/ou função das células  $\beta$  pancreáticas não acompanhem a demanda de insulina durante a gravidez, o diabetes *mellitus* tipo 2 pode se desenvolver (CATALANO et al., 1991; CATALANO; DRAGO; AMINI, 1998).

A diminuição da remoção de triacilglicerol pelas enzimas LPL e/ou lipase hepática é um dos mecanismos propostos para explicar o aumento do triacilglicerol circulante durante a gestação (ALVAREZ et al., 1996). A resistência à insulina observada em ratas prenhes no período final da gestação (RAMOS; HERRERA, 1996), bem como em estudos em adipócitos isolados de mulheres grávidas (SIVAN et al., 1999), contribui tanto para a diminuição da atividade da LPL como para o aumento da atividade lipolítica do tecido adiposo. Tal adaptação aumenta a biodisponibilidade de AGL para o fígado e a sua subsequente conversão em triacilglicerol, que são secretados na circulação sob a forma de VLDL (RAMOS; HERRERA, 1996).

Além da redução da sensibilidade à insulina, os hormônios maternos (prolactina, estrogênio, GH placentário e hPL) exercem importante ação sobre a hipertriacilgliceridemia materna. Por exemplo, o estrogênio plasmático estimula a síntese hepática de VLDL (DESOYE et al., 1987; ALVAREZ et al., 1996) enquanto os hormônios placentários hPL e GH desempenham ações pró lipolíticas. Essas atrações resultam numa flexibilidade metabólica (predomínio do metabolismo lipídico em detrimento do metabolismo glicídico) que favorece a economia de glicose para o feto (NEWBERN; FREEMARK, 2011; YOSHINO et al., 2014). A HSL também exerce uma ação sobre a hiperlipidemia materna. Martin-Hidalgo et al., (1994) relataram que a hidrólise acelerada dos depósitos de gordura que ocorre em mulheres e em ratas no terço final da gestação está associada com maior expressão de mRNA e atividade da HSL.

Ainda que o triacilglicerol não atravesse diretamente a barreira placentária (HERRERA; BONET; LASUNCIOÂN, 1998), a hipertriacilgliceridemia materna, é considerada benéfica para o feto e o recém-nascido em diversas maneiras. O depósito energético na forma de triacilglicerol pode ser rapidamente utilizado como substrato para a cetogênese hepática em condições de jejum, o que permite não somente poupar glicose para os tecidos maternos, mas também aumentar a biodisponibilidade de corpos cetônicos para o metabolismo fetal (HERRERA, 2000). Além disso, a hipertriacilgliceridemia materna contribui para a síntese de leite na preparação para a lactação

(HERRERA et al., 1994b). Com a proximidade do termo, ocorre um rápido aumento na expressão e atividade da LPL da glândula mamária (LÓPEZ-LUNA et al., 1994, RAMOS; HERRERA, 1996) como consequência do aumento das concentrações de prolactina e insulina e um aumento da sensibilidade à insulina na glândula mamária (CARRASCOSA et al., 1998; RAMOS et al., 1999). Isto ocorre juntamente à redução da atividade da LPL em outros tecidos periféricos, culminando no direcionamento de triacilglicerol plasmático para a glândula mamária e síntese de leite (ARGILES; HERRERA, 1989). A Tabela 1 mostra um resumo das principais ações exercidas pelos hormônios maternos.

Tabela 1 - Resumo das principais alterações hormonais que ocorrem nos terços inicial e final da gestação e seus efeitos sobre o metabolismo materno

<b>Hormônio</b>	<b>[1º terço]</b>	<b>[3º terço]</b>	<b>Metabolismo lipídico</b>	<b>Outras alterações</b>
<i>Estrogênio</i>	↑	↑↑	- ↑ síntese hepática de VLDL	- Preparo para a lactação por aumentar a síntese e secreção de prolactina
<i>Progesterona</i>	↑	↑↑	- Contribui para o aumento de depósitos de gordura	- Estimula a ingestão de alimentos - Atenua a ação da insulina em TA e músculos
<i>Prolactina</i>	↑	↑↑	- Contribui para o aumento de depósitos de gordura	- Estimula a ingestão de alimentos - Expansão de células β e produção de insulina - Iniciação e manutenção da lactação
<i>mGH</i>	↓	↓	- Aumento da sensibilidade à insulina - Contribui para o aumento de depósitos de gordura	----

<b><i>hPL</i></b>	↑	↑	- Estimula a lipólise	- Expansão de células β e produção de insulina
<b><i>hGH</i></b>	-	↑	- Estimula a lipólise	- Indução da RI materna
<b><i>Insulina</i></b>	↑	↑	- Estimula a lipogênese no primeiro terço e inibição da supressão da lipólise no terço final	- ↑ SI no primeiro terço e ↑ da RI no terço final
<b><i>Cortisol</i></b>	-	↑	----	- Atenua a ação da insulina em TA e músculos - Iniciação e resposta ao estresse durante o parto

↑ indica aumento; ↓ indica redução; hPL – lactogênio placentário; mGH – hormônio do crescimento materno; hGH – hormônio do crescimento placentário; SI – sensibilidade à insulina; RI – resistência à insulina; TA – tecido adiposo, [ ] – concentração hormonal.

### 1.3 GLICOCORTICOIDES E GESTAÇÃO

Os glicocorticoides (GC), cortisol (em seres humanos) e corticosterona (em roedores) são hormônios esteroides importantes para a regulação da homeostase do organismo em resposta a vários fatores de estresse (LAUDET et al., 1992; WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002). Os GCs são sintetizados e secretados pelo córtex da glândula suprarrenal e sua atividade é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Este eixo de ativação é regulado pelo receptor de glicocorticoide (GR), ao nível do hipotálamo e da hipófise anterior, que sinaliza para a redução da síntese e secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e do hormônio adrenocorticotrópico, respectivamente, quando há um aumento nas concentrações de GC plasmático (MALKOSKI; DORIN, 1999; WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002).

Sob condições fisiológicas, os GCs exercem funções reguladoras fundamentais em quase todos os tecidos, que incluem a regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, proliferação celular, sistemas nervoso e cardiovascular (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2011), respostas inflamatória e imunológica, desenvolvimento e reprodução (BOUMPA et al., 1993; SCHMID et al., 1995). Ainda, os GCs são fundamentais para a embriogênese e o desenvolvimento do pulmão durante a vida fetal (COLE et al., 1995; KITRAKI; KITTAS; STYLIANOPOULOU, 1997). Uma vez que os GCs desenvolvem ações vitais no organismo, alterações em suas concentrações plasmáticas podem resultar em condições patológicas. O excesso de GCs, como presente na Síndrome de Cushing pode acarretar em imunodeficiência, hipertensão arterial sistêmica, aumento da obesidade central e intolerância à (ANDREWS; WALKER, 1999; SHIBLI-RAHHAL; VAN BEEK; SCHLECHTE., 2006). Já sua deficiência, como observado na Doença de Addison, resulta na hipertrofia de órgãos linfóides, hipotensão postural, perda de peso e hipoglicemia (deficiência de GCs) (NIEMAN; TURNER, 2006).

Devido a sua ação anti-inflamatória, os GCs sintéticos como a prednisona, prednisolona, metilprednisolona, betametasona e dexametasona têm sido prescritos para o tratamento de uma gama de alterações que envolvem condições inflamatórias incluindo a asma, rinite alérgica, colite ulcerativa, doenças dermatológicas, oftálmicas, neurológicas e autoimunes (SCHACKE; DOCKE; ASADULLAH, 2002; RHEN; CIDLOWSKI, 2005).

Apesar da sua eficácia anti-inflamatória, a utilização terapêutica dos GCs é muitas vezes limitada devido às suas ações adversas, especialmente em doses mais elevadas e uma maior duração do tratamento, como observado em ensaios clínicos (DAVIS, 1986; RHEN; CIDLOWSKI, 2005) como experimentais (KORACH-ANDRÉ et al., 2005; BURÉN et al., 2008; RAFACHO et al., 2008b). Alguns dos efeitos adversos da terapia de longo prazo com GCs incluem diabetes *mellitus* tipo 2, osteoporose, hipertensão arterial, atrofia muscular, resistência à insulina e dislipidemias (SCHACKE; DOCKE; ASADULLAH, 2002; VEGIOPOULOS; HERZIG, 2007; MCDONOUGH; CURTIS; SAAG, 2008). A magnitude dos efeitos positivos ou negativos dos GCs é determinada pela dose e/ou duração do tratamento, as concentrações de GC, e pela transdução de sinal dos GCs nas células e tecido específicos (DANIELSEN; STALLCUP, 1984; VANDERBILT et al., 1987).

As concentrações de GCs dentro de tecidos específicos podem variar bastante daquelas do plasma (WALKER; ANDREW, 2006). A biodisponibilidade tecidual dos GCs é regulada por um processo conhecido como “metabolismo pré-receptor” por meio de duas isoenzimas 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1) e tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2). A 11 $\beta$ -HSD1 converte a forma inativa (cortisona em humanos e 11- dehidrocorticosterona em roedores) na sua forma biologicamente ativa (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002; YANG; ZHANG, 2004), enquanto a 11 $\beta$ -HSD2 converte o hormônio ativo na sua forma inativa (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002). A isoforma 11 $\beta$ -HSD1 é mais expressa nos tecidos responsivos aos GCs, como o fígado, tecido adiposo branco e muscular onde assegura a biodisponibilidade de cortisol intracelular (TOMLINSON et al., 2004). Por outro lado, a isoforma 11 $\beta$ -HSD2 está expressa principalmente nos tecidos-alvo dos mineralocorticoides, tais como, rins, cólon, glândulas parótidas, pâncreas e placenta. Sua função é proteger o receptor mineralocorticoide da ocupação pelo GC que apresenta a mesma afinidade que o seu ligante natural, a aldosterona (WHITE; MUNE; AGARWAL, 1997; TOMLINSON et al., 2004). A biodisponibilidade e, portanto, a ação dos GCs podem também ser alteradas devido a mutações nos genes dessas enzimas (FUNDER, 1992).

A exposição adequada de GCs *in útero* é essencial para uma implantação do embrião bem sucedida, regulação do crescimento fetal e da placenta, maturação fetal do pulmão (BALLARD; BALLARD, 1995), funções do sistema imunológico e do sistema nervoso central (WEINSTOCK, 2008). Além dos efeitos sobre o feto, os GCs também exercem uma ação importante no organismo materno, para a iniciação e resposta ao estresse durante o parto (SMITH; SHEARMAN, 1974). O período gestacional está relacionado com maior atividade do eixo HHA, que pode ser observado pela elevação nas concentrações de cortisol plasmático total e livre e cortisol urinário. Além disso, também é observada elevação nas concentrações da globulina transportadora de corticosteroides, que se deve a estimulação da sua produção hepática pelas altas concentrações de estrogênio plasmático e contribui para o aumento da atividade do eixo HHA (LINDSAY; NIEMAN, 2005).

O aumento do cortisol plasmático é observado já na 11<sup>a</sup> semana de gestação (DEMEY-PONSART et al., 1982) e pode aumentar em torno de 5 vezes entre o primeiro trimestre e o parto (CARR et al., 1981). As concentrações maternas de GCs são três a quatro vezes mais elevadas do que na circulação fetal devido à presença da enzima

placentária 11 $\beta$ -HSD2 (SHAMS et al., 1998; MURPHY et al., 2007). Na placenta, 11 $\beta$ -HSD2 protege o feto contra os efeitos potencialmente nocivos do GC materno. Um dos fatores que promove o aumento do cortisol plasmático é a síntese e secreção do CRH placentário. Ao contrário do que ocorre com CRH hipotalâmico, o cortisol exerce uma alça de retroalimentação positiva sobre o CRH placentário promovendo, simultaneamente, o aumento nas concentrações de CRH, hormônio adrenocorticotrópico e cortisol plasmático durante o curso da gestação (SMITH et al., 2009; SANDMAN; DAVIS, 2010).

Além desta retroalimentação positiva fisiológica entre os GC e o CRH placentário, os fetos também podem ser expostos a GC exógeno em contextos relacionados a terapias baseadas em GCs. Neste sentido, o tratamento pré-natal com os GCs sintéticos, como a dexametasona e a betametasona, que não são facilmente metabolizados pela enzima 11 $\beta$ -HSD2 e se difundem pela placenta, pode ter um efeito negativo sobre o desenvolvimento fetal (BROWN et al., 1996; MURPHY; CLIFTON, 2003). A prescrição de GCs pode ocorrer em qualquer momento da vida. Mulheres grávidas comumente recebem administração de GCs quando há risco de parto prematuro, a fim de garantir a sobrevivência do recém-nascido (SINGH; CUFFE; MORITZ, 2012). Esta prática clínica foi introduzida no ano de 1972 por Liggins e Howie, que demonstraram que seu uso poderia reduzir a incidência de síndrome do desconforto respiratório e mortalidade neonatal associada ao nascimento prematuro antes da 34<sup>o</sup> semana da gestação (LIGGINS; HOWIE, 1972). A atual prática clínica sugere que mulheres em risco de parto prematuro (24-34 semanas de gestação) devem receber um único curso de betametasona via intramuscular, administradas em duas doses de 12 mg com um intervalo de 24h por dose, ou dexametasona administrada em quatro doses de 6 mg em intervalos de 12h por dose (ACOG Committee on Obstetric Practice, 2011).

Entretanto, GCs sintéticos podem ser prescritos para mulheres em qualquer fase da gestação para o tratamento de uma variedade de condições clínicas, tais como asma, doença inflamatória do intestino, lúpus sistêmico eritematoso, artrite reumatoide, eritema nodoso, transplantes, além de uma série de doenças autoimunes (GUR et al., 2004; SINGH; CUFFE; MORITZ, 2012). No estudo de Gur et al. (2004) foram acompanhadas 311 gestantes quem receberam GCs em diferentes períodos da gestação. A maioria das mulheres foi exposta aos GCs durante o primeiro trimestre da gestação (65,4%), enquanto que 8,4% foram expostas durante o primeiro e segundo trimestres e 26,2% foram tratadas ao longo de toda a gravidez. A prednisolona foi o GC sintético

mais utilizado pelas mulheres desse estudo (70%), seguida pela betametasona, cortisona, dexametasona, flucocortolona, metilprednisolona, prednisolona, hidrocortisona e triancinolona.

Ainda que a exposição aos GCs seja necessária para a sobrevivência fetal, seus desfechos podem ser deletérios em longo prazo. Efeitos adversos incluem restrição de crescimento intrauterino (REINISCH et al., 1978; EMGARD et al., 2007), aumento do risco de parto prematuro (FIELD et al., 2006), efeitos sobre o desenvolvimento cerebral fetal (UNO et al., 1994; FIELD et al., 2005) e risco elevado da prole desenvolver doenças na idade adulta, como hipertensão e o diabetes *mellitus* tipo 2 (TANGALAKIS et al., 1992; DESSENS; HAAS; KOPPE, 2000; FRENCH et al., 2004; HOLMES et al., 2006).

#### 1.4 EFEITOS DOS GCs SOBRE A HOMEOSTASE LIPÍDICA E POTENCIAIS EFEITOS NA GESTAÇÃO

Os GCs são necessários para a regulação da biologia do tecido adiposo, dentre eles, a indução de genes lipogênicos, regulação da lipólise (PECKETT; WRIGHT; RIDDELL, 2011), diferenciação de precursores de adipócitos (HAUNER; SCHMID; PFEIFFER, 1987; PANTOJA; HUFF; YAMAMOTO, 2008), além de restringir o processo inflamatório do tecido adiposo na obesidade (PATSOURIS et al., 2009). A ação dos GCs é diferente em depósitos de gordura distintos (SLAVIN; ONG; KERN, 1994). Enquanto que em depósitos de gordura periférica, os GCs exercem preferencialmente ação pró-lipolítica, por modular a atividade das enzimas HSL e LPL, no tecido adiposo visceral ele possui atividade pró-lipogênica e adipogênica, além de promover hipertrofia celular (GAILLARD et al., 1991; SAMRA et al., 1998, SECKL et al., 2004).

A regulação da lipólise pelos GCs ocorre diretamente, por meio do aumento da expressão do mRNA da atividade das três enzimas lipolíticas do tecido adiposo (HSL, ATGL e MGL) (XU et al., 2009; KUO et al., 2012) ou indiretamente, por interferir nas concentrações de proteínas intracelulares envolvidas na cascata de sinalização lipolítica  $\beta$ -adrenérgica (XU et al., 2009; van RAALTE et al., 2012). Ainda, os GCs exercem efeitos permissivos sobre outros hormônios lipolíticos como as catecolaminas e glucagon (EXTON et al., 1972).

Os GCs regulam a lipogênese por aumentar a atividade da LPL, tanto em nível transcricional e pós-traducional, como pelo aumento da sua ativação ou redução da sua degradação (APPEL; FRIED, 1992; FRIED et al., 1993; OTTOSSON et al., 1994). A atividade da LPL é

estimulada pelos GCs, particularmente no tecido adiposo visceral, proporcionando maior entrega de AGL para esses depósitos, o que explica, em partes, a capacidade dos GCs em excesso para aumentar a adiposidade intra-abdominal (FRIED et al., 1993).

Os GCs também atuam sinergicamente com a insulina para regular positivamente a lipogênese (WILLIAMS; BERDANIER, 1982; MINSHULL; STRONG, 1985; WANG et al., 2004). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que os GCs estimulam a lipogênese por regular positivamente a expressão de enzimas envolvidas na síntese dos lipídios, como a ACC, FAS e DGAT 1 e 2 (DOLINSKY et al., 2004; WANG et al., 2004; GATHERCOLE et al., 2011; LEE, et al., 2011).

Enquanto os GCs são importantes para a regulação da homeostase lipídica em diferentes estados fisiológicos, doses elevadas e/ou longo período de exposição aos GCs podem causar alterações na homeostase lipídica e glicêmica como obesidade central, dislipidemias, esteatose hepática, hiperglicemia e resistência à insulina, que constituem importantes componentes da síndrome metabólica (COLE; WILCOX; HEIMBERG, 1982; MACFARLANE; FORBES; WALKER, 2008; MOTTA et al., 2014).

GCs sintéticos como dexametasona são rotineiramente utilizados para tratamento de fetos em risco de parto prematuro antes da 34ª semana de gestação. Numerosos estudos acerca dos efeitos adversos da terapia a base de GCs no período final da gestação têm focado principalmente na programação metabólica sobre a prole (RAVELLI et al., 1988; NYIRENDA et al., 1998). No entanto, os efeitos deletérios sobre o metabolismo materno têm sido negligenciados. Uma vez que mãe e feto estão sujeitos às mesmas condições ambientais, é importante que se compreenda os possíveis impactos da terapia a base de GC no terço final da gestação sobre a fisiologia materna.

Embora os efeitos adversos da terapia pré-natal com GCs na saúde materna sejam pouco esclarecidos, uma incidência aumentada de diabetes *mellitus* gestacional (24% vs. 4% no grupo controle) foi demonstrada em mulheres que receberam prescrição de GCs para ameaça de parto prematuro (FISHER et al., 1997). Além disso, no estudo realizado por Gomes e colaboradores (2014) sugeriu-se que esta exposição pode acarretar em prejuízo tardio da homeostase glicêmica. Neste estudo, ratas prenhes tratadas com dexametasona (0,2 mg/Kg de peso corpóreo, diluída na água de beber) no terço final da gestação desenvolveram intolerância à glicose a partir de 3 meses após o término da gestação que, segundo os autores é desencadeada como resultado da redução da função das células  $\beta$  pancreáticas.

Ainda que a elevação das concentrações de triacilglicerol, principalmente no terço final da gestação, seja fisiológica e transitória, estudos acerca das alterações causadas pelos GCs no metabolismo lipídico durante a gravidez são escassos. Uma vez que é bem conhecido o efeito hiperlipidêmico dos GCs e um número significativo de gestantes podem estar sujeitas a exposição de GCs durante o terço final da gestação, consideramos relevante a avaliação funcional e molecular dos seus efeitos sobre o metabolismo materno. Desta forma, hipotetizamos que a administração de dexametasona durante o período final da prenhez exerça um efeito exacerbador sobre as concentrações de triacilglicerol. Ainda, esperamos contribuir com a literatura no que diz respeito aos mecanismos pelos quais ocorre o aumento das concentrações de triacilglicerol no período gestacional, independente da administração de dexametasona.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros relacionados à homeostase lipídica e glicêmica ao final da gestação em ratas tratadas com dexametasona, bem como identificar possíveis alterações na expressão de alvos moleculares hepáticos e do tecido adiposo presente no final da prenhez em ratas tratadas com dexametasona.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o crescimento corpóreo e de órgãos metabólicos, bem como o consumo alimentar são influenciados pelo tratamento com a dexametasona no período final da gestação.
- Verificar se as concentrações de triacilglicerol plasmático e glicose sanguínea são modificadas pelo tratamento com dexametasona no período final da gestação.
- Avaliar se a sensibilidade periférica à insulina e tolerância à glicose em ratas são modificadas pelo tratamento com a dexametasona no período final da gestação.
- Avaliar se a tolerância aos lipídeos em ratas é modificada pelo tratamento com a dexametasona no período final da gestação.
- Verificar se a morfologia dos adipócitos é alterada pela dexametasona no período final da gestação.
- Avaliar se a exportação hepática e depuração plasmática de VLDL em ratas são modificadas pelo tratamento com a dexametasona no período final da gestação.
- Verificar se a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico em tecidos hepático e adiposo em ratas é modificada pelo tratamento com a dexametasona no período final da gestação.
- Avaliar se o peso e número de fetos de ratas são modificados pelo tratamento com a dexametasona no período final da gestação.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

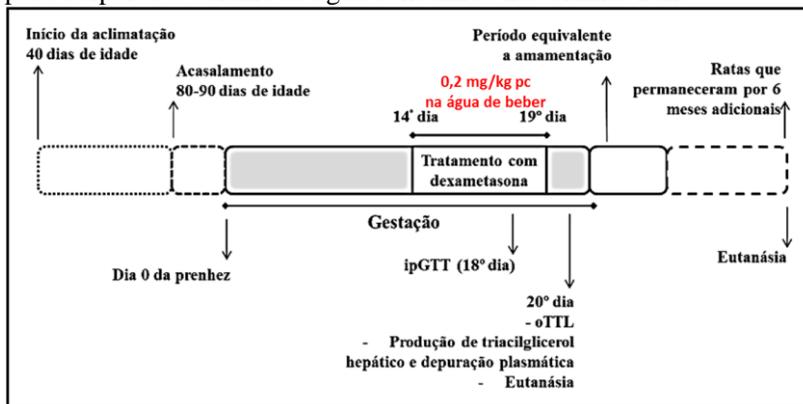
#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados *rattus norvegicus* fêmeas e machos provenientes do Biotério Central da UFSC, localizado no Campus Trindade, Florianópolis, SC. Os animais com aproximadamente 35 dias de vida foram recebidos e mantidos em gaiolas coletivas e em ambiente com temperatura controlada ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) em ciclo de iluminação claro-escuro (06:00-18:00 claro, 18:00-06:00 escuro), com livre acesso à comida (Nuvilab® CR-1; Nuvital, PR, Brazil,) e água. Por volta dos 75-80 dias dois grupos de ratas foram ambientadas com machos por cinco dias (três fêmeas para cada macho). O dia 0 da gestação foi caracterizado pela presença de espermatozoides e células estrais no lavado vaginal. As ratas prenhes foram mantidas em gaiolas coletivas contendo 3 animais, de acordo com os grupos a serem definidos na próxima seção e, a partir do dia 12 de gestação as ratas de todos os grupos foram alocadas individualmente até o final do protocolo experimental. As ratas virgens (controles não expostas aos machos) seguiram o mesmo delineamento das prenhes no que se refere a disposição em gaiolas. Um total de 204 fêmeas e 41 machos foi utilizado neste estudo, do número total de fêmeas 51 não ficaram prenhes e não seguiram com o protocolo experimental. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) (PP nº 782) (Anexo 1).

#### 3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO COM DEXAMETASONA

Os grupos experimentais foram divididos em: **Grupo controle virgens (CV)** – ratas virgens continuaram recebendo apenas água filtrada *ad libidum*; **Grupo controle prenhes (CP)** – ratas prenhes continuaram recebendo apenas água filtrada conforme descrito para o grupo CV; **Grupo dexametasona virgens (DV)** – ratas virgens receberam dexametasona (Decadron®, Aché, Campinas, SP, Brasil) 0,2 mg/Kg/dia diluída na água filtrada *ad libidum* por 6 dias consecutivos

compreendendo do 14<sup>o</sup> ao 19<sup>o</sup> dia de gestação; **Grupo dexametasona prenhes (DP)** – ratas prenhes receberam dexametasona conforme descrito para o grupo DV (Figura 2). A determinação da dose foi baseada em publicação prévia (GOMES et al., 2014). A concentração da dexametasona foi recalculada diariamente pela manhã de acordo com o peso corpóreo e volume de água consumido nas últimas 24h.



**Figura 1** - Delineamento experimental.

As ratas prenhes foram tratadas com dexametasona (0.2 mg/Kg/dia diluída na água de beber) do 14<sup>o</sup> ao 19<sup>o</sup> dia de gestação. Ratas virgens foram conduzidas e submetidas ao mesmo protocolo experimental em paralelo (não mostrado na figura).

### 3.3 PESO CORPÓREO E CONSUMO DE RAÇÃO (LOTES 1, 2, 3, 4 e 5)

Peso corpóreo: Em todos os grupos experimentais a determinação do peso corpóreo foi realizada diariamente desde o 13<sup>o</sup> até o 19<sup>o</sup> dia de gestação (dia antecedente à eutanásia) e para o primeiro lote de ratas a verificação ocorreu periodicamente até seis meses após o desmame em balança eletrônica digital (SF-400). Consumo de ração: Em todos os grupos experimentais o consumo de ração foi acompanhado pela pesagem da ração remanescente (não ingerida) descontada do total depositado no dia anterior. A diferença representou a quantidade ingerida por animal diariamente. Os resultados foram expressos em gramas de ração ingeridos por 100 gramas de peso corpóreo para se obter a normalização destes parâmetros.

### 3.4 GLICOSE SANGUÍNEA E TRIACILGLICEROL PLASMÁTICO EM JEJUM (LOTES 1, 2, 3, 4 E 5)

A glicemia foi determinada por meio do sistema de fitas (monitor digital) “Accu-Check Performa” (ROCHE, Brasil) a partir da segunda gota de sangue obtida da ponta da cauda do animal e o triacilglicerol plasmático foi determinado por ensaio colorimétrico enzimático de acordo com as instruções do fabricante (Biotécnica®, Varginha, MG, Brasil) a partir da coleta de 70 µl de sangue da ponta da cauda, aliquotado em microtubo contendo anticoagulante NaF (Glistalab – Labtest; Lagoa Santa, MG, Brasil) posteriormente centrifugado a 400 x g por 10 min a 21°C (KASVI - K14-1215, Curitiba, PR, Brasil) para obtenção do plasma. As aferições foram realizadas no 13º e 20º dias de gestação com os animais em jejum de 12h.

### 3.5 SENSIBILIDADE À INSULINA PELO MODELO DE ANÁLISE HOMEOSTÁTICA (HOMA) (LOTE 3)

O HOMA foi calculado a partir da fórmula: [glicemia de jejum (mM) x insulinemia de jejum (µIU/mL)]/22.5 (MATTHEWS et al., 1985).

### 3.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS (TODOS OS LOTES)

Para todos os grupos a eutanásia se procedeu com os animais em jejum de 12h por exposição ao CO<sub>2</sub>, seguido por decapitação por guilhotina. Os fetos foram imediatamente pesados e eutanasiados por decapitação direta com uso de tesoura cirúrgica, exceto para o primeiro lote de ratas, o qual foi permitida a amamentação até o 21º primeiro dia de vida dos neonatos.

### 3.7 PARÂMETROS PLASMÁTICOS E PERFIL HEPÁTICO (LOTE 3)

Imediatamente após a eutanásia, o sangue do tronco das ratas foi coletado em tubo de ensaio de vidro previamente lavado em solução salina, contendo anticoagulante NaF (Glistab – Labtest; Lagoa Santa, MG, Brasil). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400 x g por 10 min a 21 °C (SIRIUS 4000, Campo Mourão, PR, Brasil) e o plasma foi

aliquotado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior quantificação das concentrações plasmáticas de albumina, colesterol total e colesterol HDL, de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica® -Varginha, MG, Brasil) e a insulinemia foi determinada por meio do kit AlphaLISA® (AL204C) (PerkinElmer, Waltham, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O colesterol VLDL foi estimado utilizando um fator ajustável para a razão triacilglicerol:VLDL, de acordo com Martin et al., (2013).

### 3.8 PESO DE ÓRGÃOS (LOTE 3)

Imediatamente após a eutanásia dos animais, os órgãos de interesse foram cuidadosamente removidos e pesados em balança eletrônica analítica digital (TECNAL, SP, Brasil).

### 3.9 CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO (LOTES 1 E 3)

Para determinação do glicogênio hepático, amostras de fígado (300 a 500 mg) obtidas logo após a eutanásia (mesmo lobo hepático para todos os animais) foram transferidas para tubos de centrífuga contendo KOH 30% e fervidas por 1 h para completa digestão. Em seguida, foi adicionado  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e o glicogênio foi precipitado com etanol submetido ao banho-maria por aproximadamente 15 seg. As amostras foram centrifugadas a  $800 \times g$  por 10 min, o sobrenadante contendo lípidos saponificados, aminoácidos, etc, foi descartado e o ‘pellet’ ressuspendido em água destilada quente. Etanol foi adicionado em seguida, o material foi homogeneizado e levado rapidamente ao banho-maria, e as amostras foram conduzidas novamente à centrifugação. Após diluição do precipitado em 25 mL de água destilada quente o conteúdo do glicogênio foi quantificado por espectrofotometria em reação com reagente fenol e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . A absorbância foi determinada a 490 nm (LO et al., 1970; RAFACHO et al., 2008a).

### 3.10 CONTEÚDO DE TRIACILGLICEROL HEPÁTICO (LOTES 1 E 3)

Para determinação do conteúdo de triacilglicerol hepático, 100 mg de fígado obtidos logo após a eutanásia (mesmo lobo hepático para todos os animais) foram transferidas para tubos de centrífuga contendo NaCl (1M) e homogeneizados (UltraTurrax® - IKA® Staufen, Alemanha)

Posteriormente foi adicionado clorofórmio/metanol (2:1) e centrifugado a 5000 x g por 5 min. Formou-se 3 fases e a fase inferior (metanólica) foi retirada para posterior secagem em banho-maria fervente. Em seguida, a amostra foi ressuspendida em Triton X100/Metanol (2:1) seguida por agitação em vórtex. Logo após, foi realizada a dosagem do triacilglicerol por ensaio colorimétrico enzimático de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica<sup>®</sup>) (TRINH et al., 1998; BARBOSA et al., 2016).

### 3.11 LIPÓLISE DO TECIDO ADIPOSEO (LOTE 3)

A taxa de lipólise do tecido adiposo foi analisada por incubação de fragmentos deste tecido e avaliação da liberação do glicerol ao meio de incubação de acordo com estudos prévios publicados (NUNES et al., 2013; MOTTA et al., 2014). Fragmentos de tecido adiposo perigonadal (100 mg) (fragmento unilateral esquerdo) foram incubados em tampão de Krebs aerado com carbogênio pH 7,4, contendo 1% de albumina bovina e glicose a 5,6 mM por 1 h a 37°C na presença ou não de 20 µM de isoproterenol. Ao final da incubação, amostras do meio de incubação foram coletadas e mantidas a 4°C. O glicerol foi determinado por um ensaio colorimétrico enzimático de acordo com Bucolo; David, (1973). Resultados foram expressos como microgramas por miligrama de tecido por hora (µg/mg/1h).

### 3.12 TESTE INTRAPERITONEAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (ipGTT) (LOTES 1 e 3)

O ipGTT foi realizado no 18º dia de gestação com os animais em jejum de 12-14h, sem uso de anestesia. Os animais tiveram a ponta da cauda seccionada para a coleta de 2 gotas de sangue. A primeira gota foi descartada e a segunda utilizada para determinação da glicemia no tempo 0. Imediatamente, foi administrada via intraperitoneal uma solução de D-glicose 50% a 36°C (2 g/Kg de peso corpóreo) e amostras de sangue foram posteriormente coletadas aos 30, 60 e 90 min para determinação da glicemia (RAFACHO et al., 2008a).

### 3.13 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA AOS LIPÍDEOS (oTTL) (LOTES 2 e 4)

O oTTL foi realizado no 20º dia de gestação, em um grupo separado de animais em jejum de 12-14 h. Os animais tiveram a ponta da cauda seccionada para a coleta de sangue de acordo com o item 3.4 para determinação do triacilglicerol no tempo 0. Imediatamente, foi administrado azeite de oliva (Andorinha – Portugal) via gavagem na concentração de 5 mL/Kg de peso corpóreo e amostras de sangue foram posteriormente coletadas aos 60, 120, 180 e 240 min para determinação das concentrações de triacilglicerol plasmático por ensaio colorimétrico enzimático de acordo com instruções do fabricante (Biotécnica®).

### 3.14 MORFOLOGIA DOS ADIPÓCITOS (Lote 3)

Fragmentos do tecido adiposo periovariano (mesma região para todos os animais) foram coletados no dia da eutanásia e alocados em cassete histológico. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 48 h a 8°C, desidratadas em etanol e incluídas em parafina. Secções representativas da maior área de tecido emblocado (5 µm) foram obtidas com a utilização de micrótomo manual e colocadas em lâminas de vidro individuais. Em seguida, as lâminas contendo as secções foram desparafinizadas em xilol e reidratadas. Finalmente, as lâminas contendo as secções foram coradas com hematoxilina de Harris e eosina e montadas com lamínulas utilizando bálsamo do Canadá. As lâminas coradas foram levadas ao digitalizador de lâminas Axio Scan (ZEISS, Oberkochen, Alemanha) para escaneamento das imagens e o software ZenLite (Blue edition, ZEISS) para quantificação das células. Aleatoriamente, 10 a 15 campos (média de 250 células por secção) foram analisados para determinação do perímetro médio dos adipócitos. Totalizando 283±42, 335±90, 373±79 e 419±40 células por lâminas para CV, DV, CP e DP, respectivamente. A distribuição do perímetro foi classificada de acordo com intervalos predefinidos em pequenas, médias, grandes e X-grandes (STRAKOVSKY et al., 2015).

### 3.15 EXPORTAÇÃO E DEPURAÇÃO DO VLDL HEPÁTICO (LOTE 5)

A produção de triacilglicerol hepático e a taxa de depuração plasmática foram realizadas no 20º dia de gestação em um grupo separado de animais não anestesiados em jejum de 12-14 h. Os ratos tiveram o sangue coletado (70 µl) conforme descrito no item 3.4 e o triacilglicerol plasmático (Tempo 0) foi posteriormente mensurado. Uma solução contendo Poloxamer (P-407) (1 g/Kg/pc, *i.p.*) diluída em solução salina 0,9% (Millar *et al.* 2005) foi imediatamente administrada e o sangue foi coletado a partir da ponta da cauda em 60, 120, 180 e 240 min para posterior quantificação da triacilgliceridemia. O composto P-407 foi dissolvido durante a noite e mantido em refrigeração antes da administração para preservar o polímero em um estado viscoso móvel durante a injeção.

A taxa de liberação de triacilglicerol hepático foi dada pelo cálculo: (triacilgliceridemia final - triacilgliceridemia basal)/240 (o tempo de acúmulo em minutos) e normalizado por 100 g de p.c. A depuração plasmática foi a razão entre o triacilglicerol liberado pelo fígado pela concentração basal de triacilglicerol (MILLAR *et al.*, 2005; OAKES *et al.*, 2005).

### 3.16 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL (LOTE 3)

O RNA total foi extraído a partir de tecido hepático e adiposo periovariano (sempre as mesmas frações anatômicas) utilizando reagente Trizol (TRIzol Reagente®, Invitrogen, Life Technologies, Palo Alto, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A análise da concentração e pureza do RNA total foi mensurada por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), nos comprimentos de onda 260 e 280 nm para determinação da concentração (ng/µL) e da razão 260/280 nm, que é um indicativo de qualidade do RNA extraído. As amostras foram tratadas com Turbo DNA-free™ (Ambion, Austin, TX, EUA) para eliminar possível contaminação com DNA genômico, de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram mantidas em -80°C para posterior síntese do DNA complementar (cDNA).

### 3.17 INTEGRIDADE DO RNA (LOTE 3)

Para verificar a integridade do RNA total extraído dos tecidos hepático e adiposo foi preparado um gel de agarose a 1% submerso em tampão de corrida TAE 1x, em cada poço do gel foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de amostra acrescido de 0,5  $\mu\text{L}$  de Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Cotia, SP – Brasil) e 3,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ. Em seguida o gel foi submetido à eletroforese (80 V, 400 mA, por aproximadamente 45 min) e, posteriormente verificado sob luz ultra violeta (UV) observando a presença e qualidade de duas bandas (28S e 18S) na proporção de 1,5/1. As imagens foram obtidas através do sistema de fotografia UV transluminador BenchTop 3UV<sup>TM</sup> (BioDoc – It<sup>TM</sup> Imaging System, CA, EUA).

### 3.18 OBTENÇÃO DO cDNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (LOTE 3)

Este procedimento envolveu a obtenção de cDNA a partir das amostras de RNA total extraídos. Para tanto foi necessário acrescentar 1  $\mu\text{g}$  de RNA total e 0,5  $\mu\text{L}$  de random diluído 1:3 [0,5  $\mu\text{g}$  de random primer (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )] em uma quantidade suficiente de  $\text{H}_2\text{O}$  para completar o volume final de 5  $\mu\text{L}$ . Essa mistura foi incubada em termociclador a 70°C por 5 min. Posteriormente 15  $\mu\text{L}$  da mistura para transcrição reversa que continha 4  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima (50 nM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ ), 2,4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs e 1  $\mu\text{L}$  da enzima Improm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Promega Corporation, WI, EUA), em volume final de 20  $\mu\text{L}$ . As reações foram incubadas em termociclador por 5 min a 25°C para anelamento, seguida de 60 min a 42°C para extensão e 15 min a 70°C para inativação da enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C.

### 3.19 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS mRNAs POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL (LOTE 3)

Os mRNAs de interesse foram quantificados por análise quantitativa da expressão gênica por meio da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho Stratagene Mx3005P<sup>®</sup> (Agilent Technologies<sup>®</sup>, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 6,25  $\mu\text{L}$  de SYBR Green mix (SABiosciences<sup>TM</sup>, Frederick,

MD, EUA), 2,25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ, 2  $\mu\text{L}$  de primer (0,5  $\mu\text{L}$  de primer anti-sense, 0,5  $\mu\text{L}$  de primer sense e 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ), 2  $\mu\text{L}$  de cDNA (20 ng) com os seguintes parâmetros de amplificação: (1) etapa inicial de ativação da enzima a 95°C por 10 min, (2) 40 ciclos que incluíram a desnaturação a 95°C por 15 min, o anelamento dos primers a 60°C (temperatura ótima para todos os pares de primers usados) por 30 seg e a extensão a 72°C por 30 seg, e (3) um ciclo para análise do melting que consistiu em 95°C por 30 seg, 60°C por 1 min e posterior aumento gradativo da temperatura para 95°C para obtenção das curvas de melting. O limiar para desconsideração do ruído na fluorescência de cada amostra foi determinado automaticamente pelo software de análise MxPro – Mx 3005P (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, Estados Unidos), que também determinou as curvas de melting, além de quantificar o número de cópias de cada gene utilizando o método de derivação secundária. Após a determinação do número de cópias de cada gene, o valor obtido para os genes de interesse foi normalizado pelos valores dos genes constitutivos (18S e RPL37a em amostras de fígado e ciclofilinaB, 18S e RPL37a em amostras de tecido adiposo), cujos valores mantiveram-se uniformes em todos os grupos estudados. A lista com os primers utilizados pode ser observada Tabela 1.

**Tabela 2 - Lista de primers**

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
<b>CiclofinilaB</b>	CTCCGTGGCCAACGATAAGA	AGGTCACTCGTCTACAGGT
<b>18S</b>	GAC TCA ACA CGG GAA ACC TCA TCG CTC CAC CAA CTA AGA ACG CC	G
<b>RPL37a</b>	CAA GAA GGT CGG GAT CGT CG	ACC AGG CAA GTC TCA GGA GGT G
<b>ACC</b>	TGCTTATAATTGTGGATGGCTTG	TTCTACTGTCCCTTCTGGTTCC
<b>ApoB</b>	CTGCGGTGGCAGAAATAACG	CCTTGAGCAAACCTTAGGTAGGG
<b>DGAT2</b>	AAGCCCATCACCACCGTTG	TTCCTTCCAGGAGCTGGCAC
<b>FASN</b>	TGGTGAAGCCCAGAGGGATC	CACTTCCACACCCATGAGCG
<b>FOXO1</b>	CTCACACATCTGCCATGAACCG	GTCCATGAGGTCGTTCCGAATG
<b>GR</b>	TTCCTCCATCCAGCTCGTCAGC	TGCAGCTTCCACATGTCAGCACC
<b>MKP3</b>	TGTCCTGGTGCATTGCTTGG	GGTGAAGTAGAGCTGCTGTGCG
<b>MTTP</b>	TATGACCGTTTCTCCAAGAGTGG	TCAAGGTTCTCCTCTCCCTCATC
<b>LRP</b>	CCT ACC AAC TTC ACC AAC CCA G	GTT CTC GCT TCT CGT CCG TG
<b>LDL-R</b>	CTG CTG TGT CAC TGA AGC G	GTC ACC TTG GAC TTG GAA G

### 3.20 ANÁLISE ESTATÍSTICA

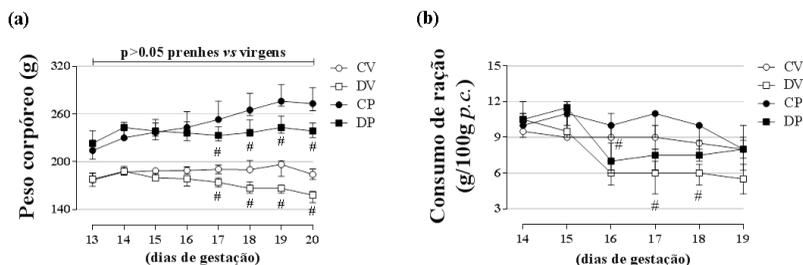
As variáveis quantitativas foram descritas e apresentadas em média e erro padrão da média (EPM) se a distribuição foi simétrica ou em mediana e intervalo interquartil se foi assimétrica. Para avaliação da distribuição dos dados foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk e o teste de Barlett (para verificação da homocedasticidade). Foi utilizada a análise de variância de uma via (one way - ANOVA) seguido de *post hoc* de Tukey para comparação múltipla de valores paramétricos, ou Kruskal-wallis se as variáveis foram assimétricas. Método de desvio diferenciado foi aplicado para determinar se um dos valores atingiu significante *outlier* (Grubb's test – disponível *online* GraphPad QuickCalcs). Referências no texto para “seus respectivos controles” significa diferença entre grupos CP e DP *vs.* grupos CV e DV, respectivamente (efeito da gestação), ou grupos DV e DP *vs.* grupos CV e CP, respectivamente (efeito da dexametasona). Símbolo \* indica diferença entre prenhes *vs.* virgens e # indica diferença entre ratas tratadas com dexametasona *vs.* ratas controles. Para todos os grupos foi utilizado o nível de significância  $P < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

### 4.1. PESO CORPÓREO E CONSUMO DE RAÇÃO

O peso corpóreo inicial foi similar entre os grupos de ratas prenhes 215±4 g e 226±4 g para CP e DP, respectivamente [não significativo ( $n=7-8$ , NS)] e entre os grupos de ratas virgens, 176±3 g e 178±2 g para CV e DV, respectivamente ( $n=7-8$ , NS). Seis dias de tratamento com dexametasona resultou em redução do peso corpóreo no grupo DV e aboliu o ganho de peso no grupo DP ( $n=7-8$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 2a). A redução do peso corpóreo foi associada à redução no consumo de ração em ambos os grupos tratados com dexametasona, que foi mais pronunciada no grupo DV (Figura 2b) ( $n=7-8$ ;  $p<0,05$ ).



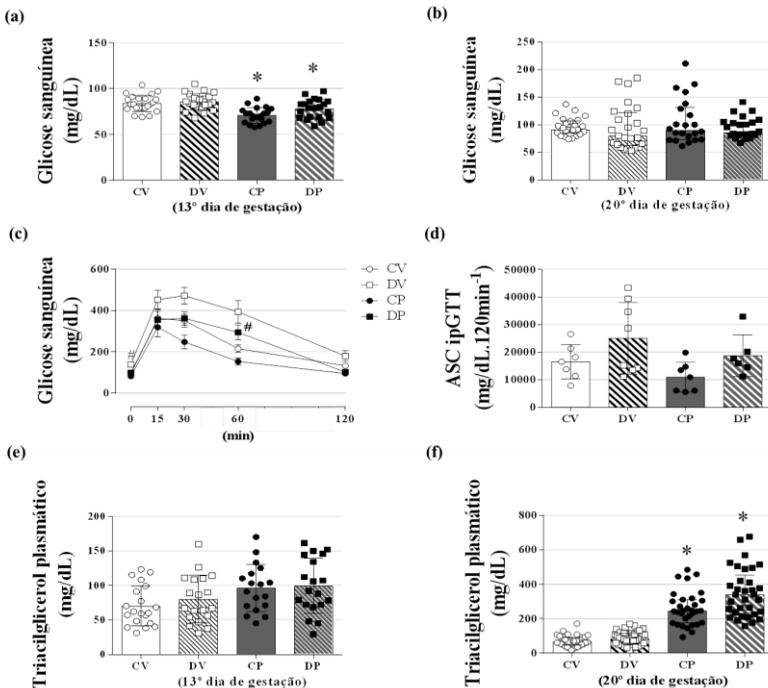
**Figura 2** - Peso corpóreo e consumo de ração em ratas prenhes controles e tratadas com dexametasona

. Peso corpóreo a partir do 13º dia de gestação até o 20º dia de gestação (a). Consumo de ração a partir do dia 14 até o dia 19 de gestação (b) em ratas tratadas com dexametasona, 0,2 mg/Kg p.c. diluída na água de beber durante o 14º até o 19º dia de gestação (ou dias equivalentes para ratas virgens). Resultados são expressos como mediana ± intervalo interquartil. Cerquilha (#) indica diferença significativa entre grupo tratado com dexametasona vs grupo controle. Utilizado Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn,  $n=7-8$ ,  $p<0,05$ .

### 4.2 PARÂMETROS GLICÊMICOS E LIPÍDICOS

A glicemia de jejum reduziu significativamente no 13º dia de gestação nos grupos CP e DP ( $n=21-23$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 3a), efeito causado pela prenhez, uma vez que o tratamento com a dexametasona ainda não havia

iniciado no grupo CP. Ao 20º dia de gestação, um dia após o término do tratamento, as concentrações de glicose sanguínea dos grupos CP e DP retornaram aos valores basais e foram similares entre os quatro grupos ( $n=22-25$ , NS) (Figura 3b). Tanto a gestação como o tratamento com a dexametasona não acarretaram em alterações na tolerância à glicose, baseado nos valores de glicose sanguínea e área sob a curva (ASC) após administração intraperitoneal de um *bolus* de glicose (Figuras 3c e d, respectivamente) ( $n=6-8$ , NS). A prenhez exerceu um maior impacto no metabolismo lipídico. Apesar da concentração de triacilglicerol plasmático avaliada no 13º dia de gestação ser semelhante entre os quatro grupos ( $n=18-20$ , NS) (Figura 3e), no 20º dia de gestação, as concentrações de triacilglicerol aumentaram significativamente em ambos os grupos prenhes comparados aos seus respectivos controles. No entanto, a dexametasona não apresentou nenhum efeito adicional (Figura 3f) ( $n=32-38$ ;  $p<0,05$ ).



**Figura 3 -** Concentrações de glicose sanguínea e triacilglicerol plasmático em ratas prenhes controles e tratadas com dexametasona.

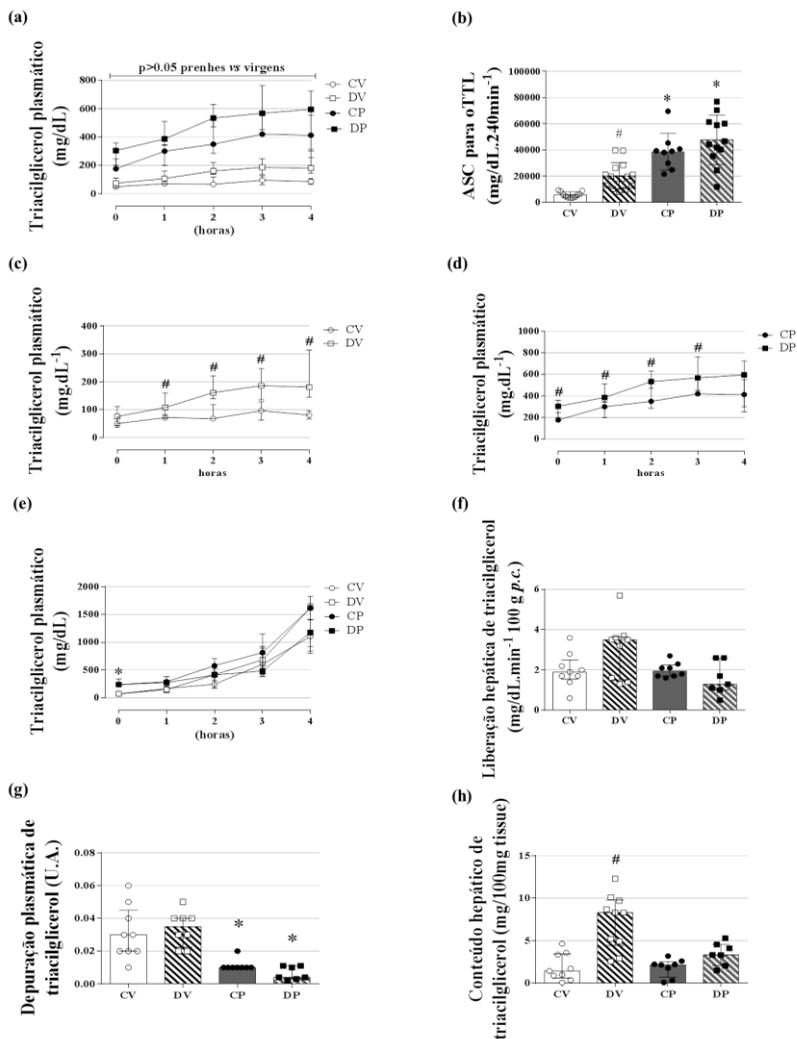
Concentrações de glicose sanguínea no 13º dia de gestação (a) e ao 20º dia de gestação (b); valores de glicose sanguínea durante um ipGTT (c); ASC para

glicose sanguínea durante um ipGTT (**d**); concentrações de triacilglicerol plasmático no 13º dia de gestação (**e**) e 20º dia de gestação (**f**) em ratas tratadas com dexametasona 0,2 mg/Kg/dia diluída na água de beber durante o 14º até o 19º dia de gestação (ou dias equivalentes para ratas virgens). Resultados são expressos como média  $\pm$  EPM para ‘**a**’, ‘**c**’, ‘**d**’ e ‘**e**’ e como mediana  $\pm$  intervalo interquartil para ‘**b**’ e ‘**f**’. Asterísco (\*) indica diferença significativa entre grupos de ratas prenhes vs grupos ratas virgens. Utilizado ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey para ‘**a**’, ‘**c**’, ‘**d**’ e ‘**e**’ e Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn para ‘**b**’ e ‘**f**’,  $n=7-8$ ,  $p<0,05$ . ASC - área sob a curva ipGTT – teste intraperitoneal de tolerância à glicose.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FUNCIONAIS DO METABOLISMO LIPÍDICO E MORFOMETRIA DO TECIDO ADIPOSEO

Considerando que as ratas prenhes apresentaram valores elevados de triacilglicerol plasmático, seguimos com a avaliação da tolerância aos lipídeos, exportação e depuração hepática de triacilglicerol. O teste de tolerância aos lipídeos revelou incremento nos valores de triacilglicerol após a administração do *bolus* oral de azeite de oliva em todos os grupos avaliados, sendo a intolerância aos lipídeos observada entre os grupos de ratas prenhes em comparação às virgens. A dexametasona promoveu intolerância aos lipídios no grupo de ratas virgens comparação ao grupo de ratas virgens controles (Figura 4b e 4c). ( $n=9-15$ ;  $p<0,05$ ). Os grupos CP e DP apresentaram valores basais de triacilglicerol elevados em relação aos grupos CV e DV ( $201\pm33$ ,  $308\pm32$ ,  $55\pm6$  e  $81 \pm 12$  mg/dL, respectivamente) ( $n=9-15$ ;  $p<0,05$ ) e esta elevação persistiu por 240 min após a sobrecarga de lipídeos ( $n=9-15$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 4a). Os valores da ASC durante o oTTL foram 2,3 e 1,95 vezes maiores nos grupos CP e DP em relação aos grupos CV e DV respectivamente ( $n=9-15$ ;  $p<0,05$ ) Embora não foi observado efeito da dexametasona sobre a tolerância aos lipídios no grupo DP quando avaliamos os quatro grupos conjuntamente (ANOVA), quando analisamos os grupos CP vs. DP isoladamente (teste ‘t’) podemos observar que há um aumento significativo das concentrações de triacilglicerol desde o momento basal até o minuto 180 após a administração do azeite de oliva (Figura 4d). Constatada a alteração na tolerância aos lipídeos, seguimos com a avaliação da exportação hepática e depuração plasmática do VLDL após inibição da LPL como composto P407. A curva de acúmulo do triacilglicerol plasmático apresentou valores elevados de triacilglicerol plasmático, porém

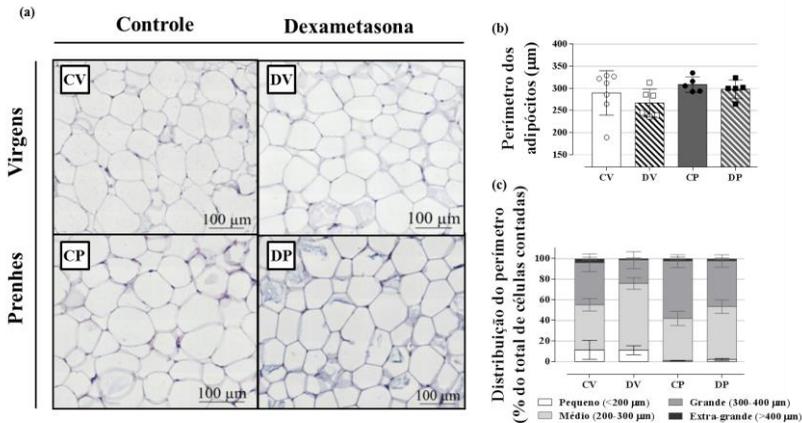
similares, em todos os quatro grupos após a administração do composto ( $n=8-9$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 4e). Os valores basais elevaram significativamente nos grupos CP e DP em relação aos grupos CV e DV ( $72\pm7,0$ ,  $78\pm9,0$ ,  $246\pm19$  e  $257\pm28$  mg/dL para CV, DV, CP e DP, respectivamente) e aumentaram expressivamente nas horas subsequentes à administração do composto P407, com valores finais de  $1.173\pm159$ ,  $1.461\pm211$ ,  $1.617\pm73$  e  $1.180\pm172$  mg/dL para CV, DV, CP e DP, respectivamente ( $n=7-10$ , NS) (Figura 4e). O cálculo para a produção de triacilglicerol hepático não revelou alteração significativa por efeito do tratamento com a dexametasona ou pela gestação (Figura 4f) ( $n = 8-9$ ; NS). A depuração plasmática de triacilglicerol plasmático reduziu significativamente em ambos os grupos prenhes comparados com os grupos de ratas virgens (Figura 4g) ( $n=8-9$ ;  $p<0,05$ ). Novamente, o tratamento com a dexametasona não causou nenhum impacto nesse parâmetro. O conteúdo de triacilglicerol hepático, coletado imediatamente após o término do teste, aumentou significativamente no grupo DV em relação aos demais grupos ( $n=9-10$ ;  $p<0,05$ ) (Figura 4h). Em seguida nós avaliamos o perímetro dos adipócitos para investigar se houve associação entre a elevação nas concentrações de triacilglicerol plasmático e hiperplasia e/ou hipertrofia dos adipócitos no tecido adiposo perigonadal. A média do tamanho dos adipócitos, baseado no perímetro, foi similar entre os quatro grupos (Figura 5a,b) ( $n = 5-7$ ; NS). Para melhor caracterizar a morfologia do tecido adiposo, os adipócitos foram subcategorizados em quatro tamanhos: pequeno ( $<200$   $\mu\text{m}$ ), médio (200-300  $\mu\text{m}$ ), grande (300-400  $\mu\text{m}$ ) e extra grande ( $>400$   $\mu\text{m}$ ). Mesmo após as subdivisões, não foi evidenciada nenhuma alteração nas subcategorias nos quatro grupos experimentais, seja por efeito da prenhez ou pelo tratamento com a dexametasona (Figura 5c).



**Figura 4** - Teste oral de tolerância aos lipídeos; exportação hepática e depuração plasmática de triacilglicerol em ratas prenhes controles e tratadas com dexametasona.

Valores de triacilglicerol plasmático durante um oTTL (5 mL/Kg, *p.c.*) no 20º dia de gestação **(a)** ASC para triacilglicerol plasmático durante um oTTL **(b)**, Valores de triacilglicerol plasmático durante um oTTL (5 mL/Kg, *p.c.*) no 20º dia de gestação para os grupos de ratas virgens **(c)** e Valores de triacilglicerol plasmático durante um oTTL (5 mL/Kg, *p.c.*) no 20º dia de gestação para os

grupos de ratas prenhes (**d**). Valores de triacilglicerol plasmático durante quatro horas consecutivas após administração de Poloxamer (1 g/Kg, *p.c.*) no 20º dia de gestação (**e**) Liberação hepática de triacilglicerol (**f**) Depuração plasmática de triacilglicerol (**g**) e Conteúdo hepático de triacilglicerol (**h**) após horas consecutivas após administração de Poloxamer (1 g/Kg, *p.c.*) no 20º dia de gestação em ratas tratadas com dexametasona 0,2 mg/Kg *p.c.* diluída na água de beber durante o 14º até o 19º dia de gestação (ou dias equivalentes para ratas virgens) . Resultados são expressos como média  $\pm$  EPM para ‘b’ e como mediana  $\pm$  intervalo interquartil para ‘a’, ‘c’, ‘d’, ‘e’, ‘f’, ‘g’ e ‘h’. Asterísco (\*) indica diferença significativa entre grupos de ratas prenhes vs grupos ratas virgens e Cerquilha (#) indica diferença significativa entre grupo tratado com dexametasona vs grupo controle. Utilizado ANOVA de uma via seguido de post test de Tukey para ‘b’ e Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn para ‘a’, ‘c’, ‘d’, ‘e’, ‘f’, ‘g’ e ‘h’.  $n=7-8$ ,  $p<0,05$ . ASC - área abaixo da curva; oTTL – teste oral de tolerância aos lipídeos.



**Figura 5** - Perímetro dos adipócitos do tecido adiposo perigonadal de ratas prenhes controle e de tratadas com dexametasona.

Imagem representativa dos adipócitos (**a**) Média do perímetro dos adipócitos (**b**) Porcentagem da distribuição do perímetro em relação ao número de células contadas (**c**) no 20º dia de gestação em ratas tratadas com dexametasona 0,2 mg/Kg *p.c.* diluída na água de beber durante o 14º até o 19º dia de gestação (ou dias equivalentes para ratas virgens) . Resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. Utilizado ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey,  $n=7-8$ , NS. Seções foram coradas com hematoxilina & eosina.

#### 4.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E METABÓLICOS PÓS-EUTANÁSIA

A fim de verificar se as alterações típicas causadas pelo tratamento com a dexametasona em ratas virgens poderiam também ocorrer em ratas prenhes nós avaliamos alguns parâmetros bioquímicos e metabólicos. As ratas prenhes e virgens tratadas com dexametasona exibiram aumento no conteúdo de glicogênio hepático (Tabela 3) ( $n=7-16$ ;  $p<0,05$ ). A massa relativa do tecido perigonadal e omental foram similares entre os quatro grupos, em contrapartida, a massa relativa do tecido retroperitoneal reduziu nas ratas virgens após o tratamento com a dexametasona ( $n=7-16$ ;  $p<0,05$ ). A massa relativa da glândula adrenal (somente nas ratas prenhes) e a massa esplênica (em ambas prenhez e virgens) foram reduzidas após o tratamento com a dexametasona (Tabela 3) ( $n=7-16$ ;  $p<0,05$ ). O tratamento com a dexametasona também resultou em hiperinsulinemia e elevação do colesterol total e do HDL plasmáticos em ambos os grupos prenhes e virgens ( $n=7-9$ ;  $p<0,05$ ). A prenhez resultou em aumento nas concentrações do colesterol VLDL em ambos os grupos CP a DP (Tabela 3) ( $n=7-9$ ;  $p<0,05$ ). O conteúdo de triacilglicerol hepático não foi alterado pelo tratamento com a dexametasona, mas foi reduzido no grupo CP (Tabela 3) ( $n=7-9$ ;  $p<0,05$ ). A liberação de glicerol foi similar entre os quatros grupos (Tabela 3) ( $n = 5-7$ , NS). O índice HOMA, um método que prediz a sensibilidade à insulina alterada, foi elevado em ambos os grupos tratados com a dexametasona (Tabela 3) ( $n=7-9$ ;  $p<0,05$ ). As concentrações de albumina plasmática aumentaram nos grupos tratados com a dexametasona em relação aos seus respectivos grupos controle (Tabela 3) ( $n=7-9$ ;  $p<0,05$ ).

**Tabela 3-** Massa dos órgãos, dados plasmáticos e metabólicos no 20º dia de gestação.

	CV	DV	CP	DP
<sup>1</sup> <i>Fígado</i>	3.0±0.3	3.7±0.5 <sup>#</sup>	3.0±0.3	3.7±0.3 <sup>#</sup>
<sup>1</sup> <i>Gordura retroperitoneal</i>	1.4±0.4	0.9±0.4 <sup>#</sup>	1.5±0.2	1.3±0.3
<sup>1</sup> <i>Goordura gonadal</i>	1.8±0.8	1.3±0.6	1.8±0.4	1.7±0.5
<sup>2</sup> <i>Gordura omental</i>	132±55	133±62	153±34	143±71

<sup>1</sup> <i>Gordura visceral</i>	3.3±0.8	2.6±1.0	3.8±1.0	3.0±0.9
<sup>2</sup> <i>Glândula adrenal</i>	35±5.0	34±5.0	28±1.3	23±2.0 <sup>#</sup>
<sup>2</sup> <i>Baço</i>	240±28	170±16 <sup>#</sup>	235±28	122±21 <sup>#</sup>
<sup>3</sup> <i>Insulinemia</i>	0.15[0.07;0.25]	1.18[0.8;1.7] <sup>#</sup>	0.29[0.07;0.49]	1.48[1.2;1.6] <sup>#</sup>
<sup>4</sup> <i>Colesterol total</i>	92[79;103]	156[125;185] <sup>#</sup>	121[103;143]	201[171;245] <sup>#</sup>
<sup>4</sup> <i>Colesterol-HDL</i>	61[48;74]	103[85;119] <sup>#</sup>	57[48;72]	93[82;104] <sup>#</sup>
<sup>4</sup> <i>Colesterol-VLDL</i>	12.40[0.9;14]	14[10.5;16.5]	29[24;33]*	47[29;75]*
<sup>5</sup> <i>Albuminemia</i>	3,6±0,15	4,4±0,18 <sup>#</sup>	3,5±0,12	4,3±0,12 <sup>#</sup>
<sup>6</sup> <i>Conteúdo de glicogênio hepático</i>	0.3[0.13;0.53]	2.7[2.4;3.0] <sup>#</sup>	0.4[0.20;0.72]	2.1[1.5;2.0] <sup>#</sup>
<sup>6</sup> <i>Contúdo de triacilglicerol hepático</i>	8.0±1.0	9.3±3.2	5.2±1.5*	6.4±2.0
<sup>7</sup> <i>Liberção basal de glicérol</i>	5.6[3.5;7.8]	7.5[5.3;8.9]	2.2[2.0;6.7]	5.3[1.2;6.9]
<sup>8</sup> <i>HOMA-IR</i>	1.0[0.4;1.9]	8.7[5.0;7.0] <sup>#</sup>	1.6±[0.27;2.9]	10.0[8.5;11.5] <sup>#</sup>

<sup>1</sup> (g/100 g *p.c.*); <sup>2</sup> (mg/100 g *p.c.*); <sup>3</sup> (pg/mL); <sup>4</sup> (mg/dL); <sup>5</sup> (g/dL); <sup>6</sup> (mg/g tecido); <sup>7</sup> ( $\mu$ /g tecido.h<sup>-1</sup>); <sup>8</sup> ler métodos para maiores detalhes. Resultados são expressos como média  $\pm$  EPM para <sup>1,2,5</sup> e mediana  $\pm$  intervalo interquartil para <sup>3,4,6,7,8</sup>. Asterísco (\*) indica diferença significativa entre grupos de ratas prenhes vs grupos ratas virgens e Cerquilha (#) indica diferença significativa entre grupo tratado com dexametasona vs grupo controle. Utilizado ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey para <sup>1,2,5</sup> e Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn para <sup>3,4,6,7,8</sup> n=6-9, p<0,05.

#### 4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAm POR PCR EM TEMPO REAL DE GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO LIPÍDICO

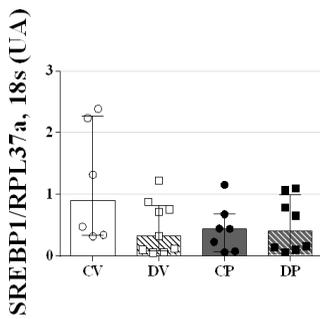
Em seguida nós avaliamos os genes envolvidos na via lipogênica. A expressão da SREBP1, o gene que codifica a proteína ligada ao elemento regulador de esteroides 1c e a FASN, que codifica a ácido graxo sintase, não foram alteradas por efeito do tratamento com a dexametasona ou pela gestação, tanto no fígado (Figuras 6 a; c, respectivamente) ( $n = 7-9$ ; NS) como no tecido adiposo perigonadal (Figuras 7 a; c respectivamente) ( $n = 4-7$ ; NS). No entanto, o gene para a ACC, que codifica a acetil CoA-carboxilase, foi suprarregulado no tecido hepático (Figura 6 b) e tecido adiposo perigonadal (Figura 7 b) nas ratas virgens tratadas com a dexametasona ( $n=6-9$ ;  $p<0,05$ ). O DGAT2, um gene que codifica a isoenzima O-aciltransferase 2 foi suprarregulado no fígado de ratas prenhes tratadas com dexametasona (Figura 6 d) ( $n=6-12$ ;  $p<0,05$ ), mas não no tecido adiposo perigonadal (Figura 7 d) ( $n = 4-7$ ; NS).

Em seguida nós avaliamos a expressão de genes relacionados com a montagem e depuração hepática do triacilglicerol. A expressão do gene que codifica a proteína de transferência microssomal (MTTP) e a ApoB, duas proteínas envolvidas na montagem do triacilglicerol, não foram alteradas pelo tratamento com a dexametasona ou pela gestação (Figuras 6 e,f respectivamente) ( $n = 7-12$ ; NS). Do mesmo modo, a expressão dos genes que codificam dois receptores hepáticos, a proteína relacionada ao receptor de LDL (LRP) e o receptor de LDL (LDL-R) também não foram alterados em nenhum dos grupos (Figuras 6 g,h respectivamente) ( $n = 7-9$ ; NS).

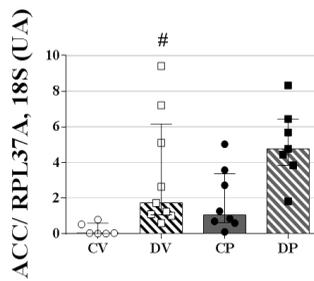
A expressão da FOXO1, um gene relacionado com a regulação da gliconeogênese foi suprarregulado no fígado em ambos os grupos tratados com dexametasona (Figura 6 i) ( $n=7-11$ ;  $p<0,05$ ). A expressão do gene que codifica para a cinase fosfatase 3 da proteína ativada por

mitógenos (MKP-3), que desfosforila e ativa a FOXO1, não foi alterada no tecido hepático de nenhum dos grupos (Figura 6 j) ( $n = 8-10$ ; NS). A expressão do gene para o GR, conhecido por ser regulado positivamente pelo MKP-3 no fígado, não foi alterada nem por efeito do tratamento com a dexametasona nem por efeito da gestação (Figura 6 k) ( $n = 7-8$ ; NS). No tecido adiposo perigonadal nenhum desses genes tiveram suas expressões alteradas dentre os quatro grupos (Figuras 7 i; j; k respectivamente) ( $n = 4-8$ ; NS). Finalmente, a expressão do gene para a proteína cinase B (PKB) não foi alterada tanto no fígado como no tecido adiposo perigonadal em nenhum dos quatro grupos (Figuras 6 l e 7 l respectivamente) ( $n = 4-7$ ; NS).

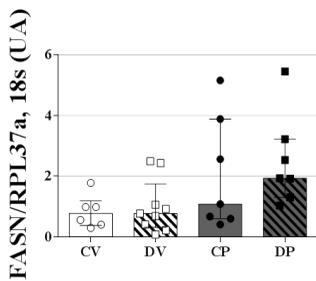
(a)



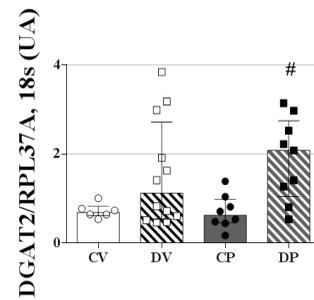
(b)



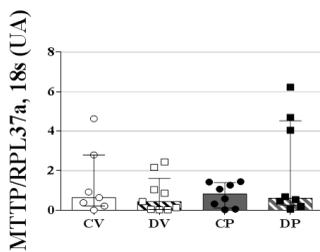
(c)



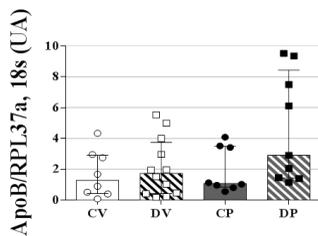
(d)

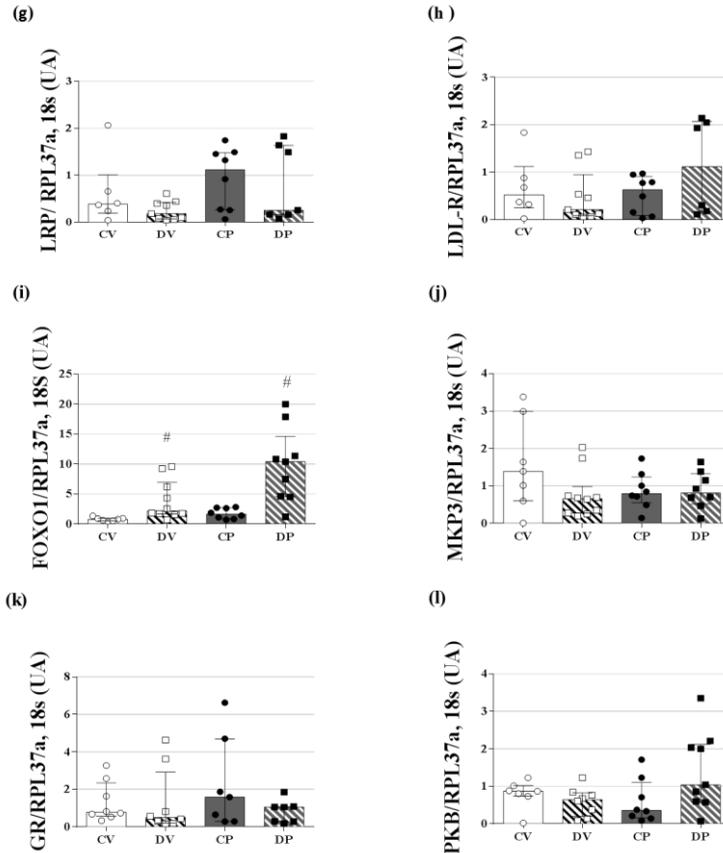


(e)



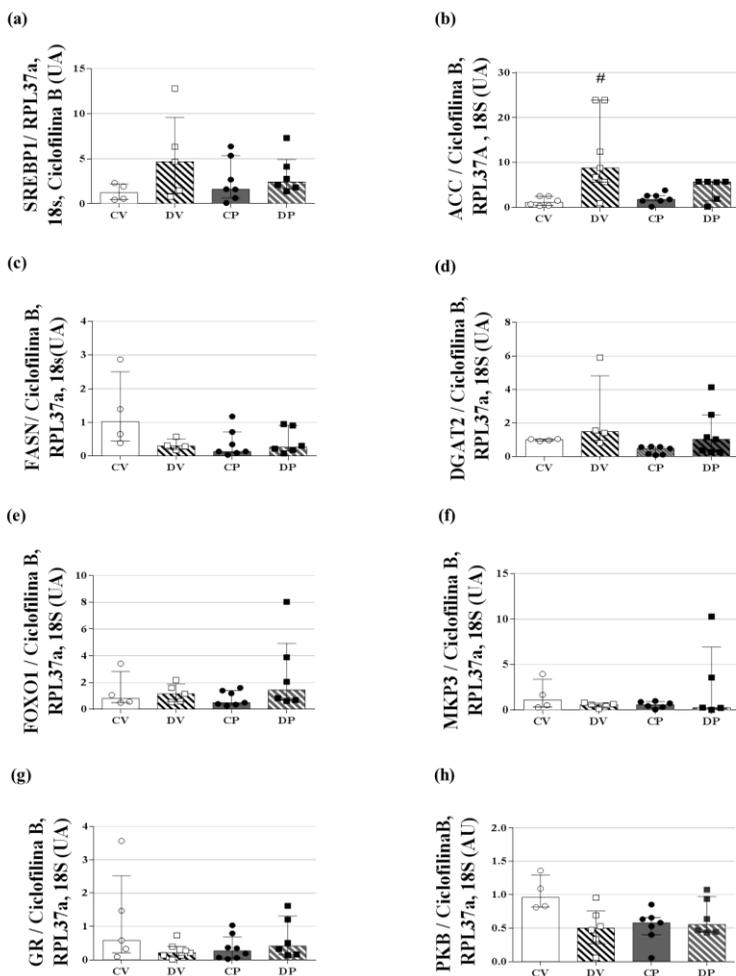
(f)





**Figura 6** - Expressão do RNAm de genes envolvidos no metabolismo lipídico no fígado.

Expressão do RNAm para a SREBP1 (a); FASN (b); ACC (c); DGAT2 (d); MTP (e); ApoB (f); LRP (g); LDL-R (h); FOXO1 (i); MKP-3 (j); GR (k); PKB (l) em fígado de ratas tratadas com dexametasona 0,2 mg/Kg p.c. diluída na água de beber durante o 14º até o 19º dia de gestação (ou dias equivalentes para ratas virgens). Resultados são expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil. Cerquilha (#) indica diferença significativa entre grupo tratado com dexametasona vs grupo controle. Utilizado Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn ( $n=4-12$ ;  $p<0,05$ ).



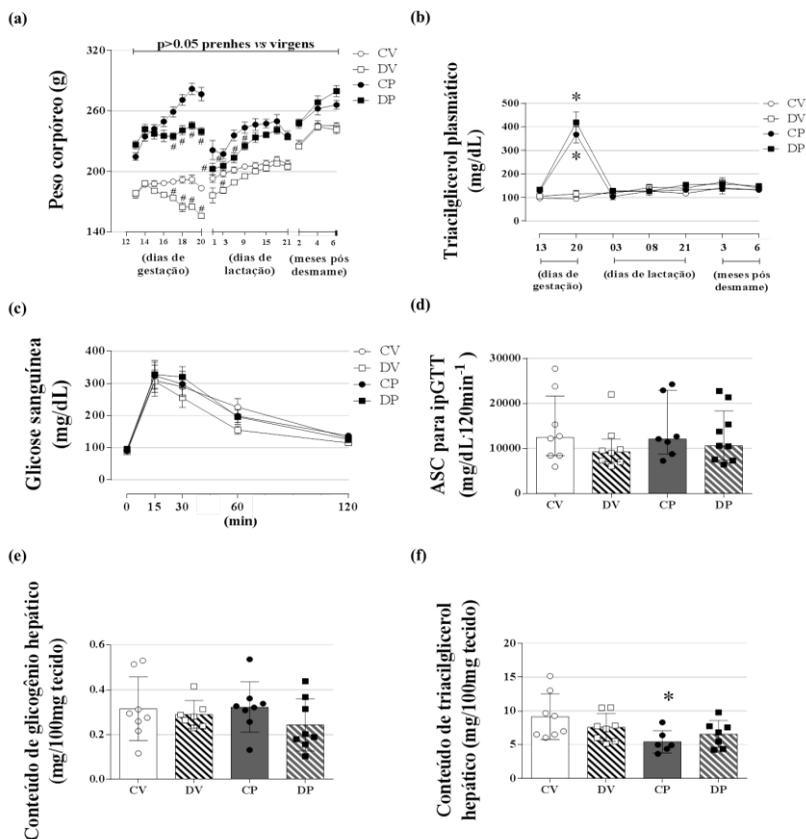
**Figura 7** - Expressão do RNAm de genes envolvidos no metabolismo lipídico no tecido adiposo perigonadal.

Expressão do RNAm para a SREBP1 (a); FASN (b); ACC (c); DGAT2 (d); FOXO1 (e); MKP-3 (f); GR (j); PKB (k) em tecido adiposo perigonadal de ratas tratadas com dexametasona 0,2 mg/Kg p.c. diluída na água de beber durante o 14<sup>o</sup> até o 19<sup>o</sup> dia de gestação (ou dias equivalentes para ratas virgens). Resultados são expressos como mediana  $\pm$  intervalo interquartil. Cerquilha (#) indica diferença significativa entre grupo tratado com dexametasona vs grupo controle. Utilizado Kruskal-Wallis com **post test de Dunn** ( $n=4-12$ ;  $p<0,05$ ).

#### 4.5 PARÂMETROS METABÓLICOS PÓS-TERMO E DADOS DA PROLE

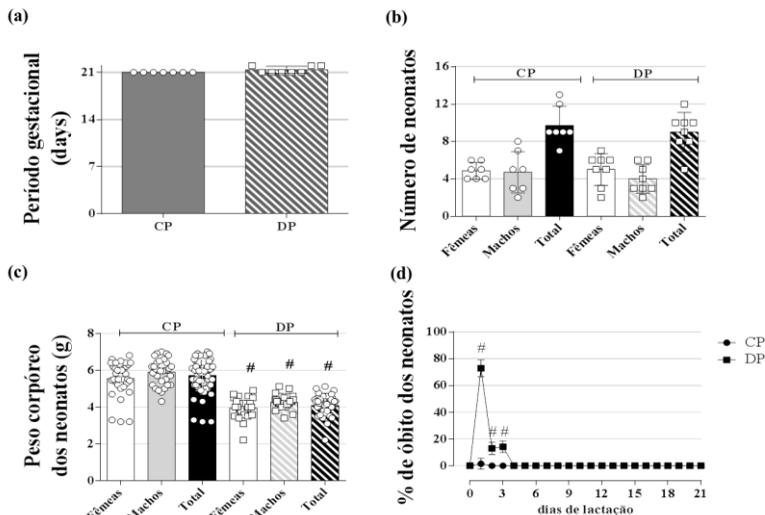
Para verificar se o tratamento com dexametasona durante a gestação poderia resultar em prejuízos no metabolismo materno após o período pós-termo, nós observamos alguns parâmetros maternos durante a lactação e aos 3 e 6 meses após o desmame. A interrupção do tratamento com a dexametasona, que coincidiu com o término da gestação, resultou em recuperação do peso corporal comparado ao grupo CP (Figura 8 a) ( $n = 7-8$ ). As concentrações de triacilglicerol plasmático retornaram aos valores basais três dias após o parto e permaneceram inalterados até 6 meses após o desmame em ambos os grupos prenhes (Figura 8 b) ( $n = 7-8$ ). As concentrações de glicose sanguínea em jejum e a tolerância à glicose permaneceram inalteradas 6 meses após o desmame em ambos os grupos (Figuras 8 c; d respectivamente) ( $n = 7-8$ ; NS). O conteúdo de glicogênio hepático retornou aos valores dos grupos controles em ambos os grupos tratados com dexametasona (Figura 8 e) ( $n = 7-8$ ; NS) e o triacilglicerol hepático reduziu no grupo CP comparado ao grupo CV (Figura 8 f) ( $n=6-8$ ;  $p<0,05$ ).

O tratamento com dexametasona não afetou a duração da gestação ou o número total de neonatos (Figura 9 a; b respectivamente) ( $n=7-8$ ; NS). Como previamente demonstrado (FIELDS et al., 2006) a administração de dexametasona durante o terço final da gestação promoveu redução significativa do peso corpóreo da prole, comparado com o peso da prole das ratas controle prenhes (Figura 9 c) ( $n=7-8$ ;  $p<0,05$ ). Ainda, o tratamento com a dexametasona, na dose utilizada neste estudo, foi deletéria e resultou em óbito de 100% da prole dentro de três dias após o parto (Figura 9 d) ( $n=7-8$ ;  $p<0,05$ ). O Quadro 1 mostra um resumo de todas as alterações causadas pela prenhez e pelo tratamento com a dexametasona.



**Figura 8 - Parâmetros metabólicos das ratas até seis meses após o desmame.**

Média do peso corporal (a); concentração de triacilglicerol plasmático durante a gestação, lactação e pós-desmame (b); valores da glicose sanguínea durante um ipGTT (c); ASC para valores de glicose sanguínea durante um ipGTT (d); conteúdo de glicogênio hepático (e) e triacilglicerol hepático (f) seis meses após o desmame de ratas tratadas com dexametasona 0,2 mg/Kg p.c. diluída na água de beber durante o 14<sup>o</sup> até o 19<sup>o</sup> dia de gestação (ou dias equivalentes para ratas virgens). Resultados são expressos como média  $\pm$  EPM para 'a', 'b', 'c' e 'd', e como mediana  $\pm$  intervalo interquartil para 'e'. Asterísco (\*) indica diferença significativa entre grupos de ratas prenhes vs grupos ratas virgens e Cerquilha (#) indica diferença significativa entre grupo tratado com dexametasona vs grupo controle. Utilizado ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey para 'a', 'b', 'c' e 'd' e Kruskal-Wallis com *post test* de Dunn para 'e'  $n=7-8$ ,  $p < 0,05$ . ASC - área abaixo da curva; oGTT - teste oral de tolerância à glicose.



**Figura 9 - Dados dos neonatos.**

Média do período gestacional (a); número de neonatos (b); peso corpóreo dos neonatos (c); % de óbito dos neonatos (d) de ratas tratadas com dexametasona 0,2 mg/Kg p.c. diluída na água de beber durante o 14<sup>o</sup> até o 19<sup>o</sup> dia de gestação. Resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. Cerquilha (#) indica diferença significativa entre grupo tratado com dexametasona vs grupo controle. Utilizado ANOVA de uma via seguido de *post test* de Tukey,  $n=7-8$ ,  $p<0,05$ .

**Quadro 1-** Sumário das alterações causadas pela prenhez e pelo tratamento com a dexametasona no terço final da gestação sobre os parâmetros avaliados

Parâmetro avaliado	CV	DV	CP	DP
Peso corpóreo	-	↓	↑	-
Consumo de ração	-	↓	-	-
Glicemia 13 <sup>o</sup> dia de gestação	-	-	↓	↓
Glicemia 20 <sup>o</sup> dia de gestação	-	-	-	-
Tolerância à glicose	-	-	-	-
Triacilgliceridemia 13 <sup>o</sup> dia de gestação	-	-	-	-
Triacilgliceridemia 20 <sup>o</sup> dia de gestação	-	-	↑	↑
Tolerância aos lipídeos	-	↓	↓	↓
Exportação de VLDL hepático (pós P407)	-	-	-	-
Depuração plasmática de triacilglicerol (pós P407)	-	-	↓	↓
Conteúdo de gordura hepática (pós P407)	-	↑	-	-

<i>Dados pós-eutânasia</i>				
Tamanho e número de adipócitos (gordura perigonadal)	-	-	-	-
Colesterolemia total	-	↑	-	↑
Colesterolemia HDL	-	↑	-	↑
Insulinemia	-	↑	-	↑
Índice HOMA	-	↑	-	↑
Conteúdo de gordura hepática	-	-	-	-
Conteúdo de glicogênio hepático	-	↑	-	↑
Liberação de glicerol (gordura perigonadal)	-	-	-	-
<i>Massa dos órgãos</i>				
Fígado	-	↑	-	↑
Tecido adiposo retroperitoneal	-	↓	-	-
Baço	-	↓	-	↓
Adrenais	-	-	-	↓
<i>Alteração na expressão gênica</i>				
ACC (fígado e tecido adiposo)	-	↑	-	-
DGAT2 (fígado)	-	-	-	↑
FOXO1 (fígado)	-	↑	-	↑
<i>Dado da prole</i>				
Massa corpórea	NA	NA	↓	↓
<i>Parâmetros metabólicos e bioquímicos 6 meses após o desmame</i>				
Massa corpórea	NA	NA	-	-
Glicemia	NA	NA	-	-
Tolerância à glicose	NA	NA	-	-
Triacilgliceridemia	NA	NA	-	-
Conteúdo de glicogênio hepático	NA	NA	-	-
Conteúdo de gordura hepática	NA	NA	↓	-

NA não se aplica; - sem alterações; ↓ redução; ↑ aumento.



## 5 DISCUSSÃO

A hipertriacilgliceridemia é uma característica comum durante o terço final da gestação onde as concentrações de triacilglicerol circulantes aumentam ao longo do segundo e, especialmente no terceiro trimestre e diminuem após o parto, como pode ser observado tanto em mulheres (KNOPP et al., 1986; ALVAREZ et al., 1996) como em ratas (BOSCH; CAMEJO, 1967; OTWAY; ROBINSON, 1968).

O tratamento com GCs, dependendo da dose e do tempo de administração, promove aumento das concentrações de triacilglicerol entre outros efeitos adversos (PECKETT; WRIGHT; RIDDELL, 2011; PASIEKA; RAFACHO, 2016). Neste presente estudo, demonstramos que a exposição a dexametasona nos últimos seis dias da gestação de ratas não exacerbou as concentrações basais de triacilglicerol plasmático e não causou nenhum prejuízo nos parâmetros metabólicos avaliados até seis meses após o desmame. Por meio de testes funcionais (teste de tolerância aos lipídeos, exportação e depuração hepática de VLDL), pudemos observar que a concentração elevada de triacilglicerol observada nas ratas prenhes ocorreu mais provavelmente devido a menor depuração de triacilglicerol plasmático do que por um aumento na exportação hepática de triacilglicerol e/ou o aumento da liberação de glicerol pelo tecido adiposo.

No que diz respeito à interpretação dos resultados de massa corpórea, o tratamento com a dexametasona reduziu a massa corpórea nas ratas virgens e aboliu o ganho de massa nas ratas prenhes, o que ocorreu em paralelo com a redução do consumo de ração em ambos os grupos. Estes dados estão em acordo com publicações prévias tanto em ratos (CAPERUTO et al., 2006, RAFACHO et al., 2010a) como em ratas (Dos SANTOS et al., 2014; BATTISTON et al., 2017). Um fator que pode explicar, pelo menos em partes, esse comportamento anorexígeno e, consequentemente, a perda de massa corpórea se dá pela elevação das concentrações de insulina e leptina plasmáticas, dois hormônios com ação anorexígena e que são regulados positivamente pelos GCs (CALDEFIE-CHEZET et al., 2001). Ratas da linhagem Sprague Dawley tratadas com dexametasona na dose de 1,5 mg/kg, via intraperitoneal, durante três, cinco e sete dias (diferentes grupos de tratamento) desenvolveram anorexia transitória do dia três ao dia cinco de tratamento (somente nas ratas de 3 meses) e anorexia persistente, até o dia sete (nas ratas de 24 meses, consideradas idosas) (CALDEFIE-

CHÉZET et al., 2001). Esses resultados se relacionaram com hiperleptinemia e resistência à insulina. De fato, embora não avaliamos as concentrações de leptina em nossos animais, ambos os grupos de ratas tratados com dexametasona apresentaram concentrações de insulina plasmática elevadas (Tabela 2). Outro fator a ser levado em consideração no que tange a perda de massa corpórea é o aumento do catabolismo proteico. O catabolismo proteico pode ser observado por meio de aumento da albuminemia observada nos grupos tratados com dexametasona em relação a seus respectivos controles. A via da ubiquitina é o principal sistema de degradação de proteínas miofibrilares e o tratamento com GCs causa aumento na expressão gênica da ubiquitina, resultando assim em aumento da proteólise (DARDEVET et al., 1995; WING et al., 1995; AUCLAIR et al., 1997). De fato, em estudo realizado por Chrysis e Underwood (1999) corroboram nossos achados. Em seu estudo, ratos que receberam tratamento com dexametasona (5 mg/Kg/dia, durante 3 dias) apresentaram redução de 14,6% do peso corpóreo em relação ao grupo controle.

É importante salientar que a massa corporal das ratas prenhes tratadas com dexametasona não foi reduzida, primeiramente pela presença dos fetos, mas também pelo estado orexígeno conduzido pelos hormônios maternos. A progesterona e prolactina induzem hiperfagia por um mecanismo direto e indireto, durante a gestação (STRADER; BUNTIN, 2003; AUGUSTINE; GRATTAN, 2008; TRUJILLO et al., 2011). O aumento na ingestão de comida no início da gestação, antes da elevação nas concentrações séricas de leptina, pode ser resultado das ações diretas da progesterona e prolactina sobre o neuropeptídeo Y e/ou peptídeo relacionado ao Agouti, no hipotálamo. Após o terço médio da gestação, as concentrações plasmáticas de leptina se elevam devido ao aumento da síntese pelo tecido adiposo e placenta. No entanto, sua ação anorexígena sobre a expressão de genes hipotalâmicos é atenuada pelos hormônios lactogênicos em partes pela redução do seu transporte pela barreira hematoencefálica e pela redução da expressão da pró-opiomelanocortina (TRUJILLO et al., 2011). Assim, no terço final da gestação, se instala um quadro de resistência hipotalâmica à leptina que favorece maior apetite e ingestão calórica (DOUGLAS; JOHNSTONE; LENG, 2007; NEWBERN; FREEMARK, 2011). De fato, Douglas; Johnstone; Leng (2007) demonstraram que no terço final gestacional, mais especificamente no 21º dia de gestação, a ingesta aumenta em torno de 60 % nas ratas. Newbern; Freemark (2011) demonstraram que o crescimento fetal é regulado por hormônios hipofisários maternos e placentários; que o GH placentário mobiliza nutrientes para o

crescimento fetal por meio da indução da RI materna; que a prolactina e hPL promovem expansão das células beta pancreáticas e produção de insulina que regulará a homeostase glicêmica; e, que uma desregulação no GH placentário e/ou no hPL pode impactar negativamente no crescimento fetal e na função metabólica pós-natal.

A homeostase glicêmica, haja vista a normotolerância à glicose e a normoglicemia, não sofreu grandes impactos durante a gestação nem pelo tratamento com dexametasona. A ausência do efeito do GC sobre a glicemia em jejum pode ser devida a hiperinsulinemia compensatória observada em ambos os grupos e está de acordo com estudos prévios em ratos tratados com a dexametasona (0,1 e 0,5 mg/Kg *p.c*) por 5 dias consecutivos. (RAFACHO et al., 2008b). Embora o tratamento com dexametasona normalmente resulte em intolerância à glicose, ocorrem ajustes compensatórios adaptativos que incluem a hipersecreção de insulina em resposta à glicose (KARLSSON et al., 2001; NOVELLI et al. 2009; RAFACHO et al., 2010b). Karlsson et al. (2001), em estudo utilizando ratas Sprague Dowley tratadas com dexametasona na dose de 2 mg/Kg, via intraperitoneal, durante 12 dias consecutivos, observaram que ilhotas isoladas de animais com RI, a resposta da insulina à 3,3 mM ou 8,3 mM de glicose foi três vezes maior durante a perfusão em comparação com os grupos controle. Também mostraram que as ilhotas de ratas tratadas com o GC ficaram mais sensíveis e mais responsivas à glicose. No mesmo sentido, Rafacho et al. (2010b) demonstraram que ratos Wistar tratados com dexametasona na dose de 1 mg/Kg, via intraperitoneal, durante 5 dias consecutivos, apresentaram aumento na sensibilidade à glicose nas células  $\beta$  e que essa alteração está relacionada com a função mitocondrial aumentada, com interações na sinalização envolvendo cálcio e envolvimento da via PLC/PKC. Ainda, estudo de Dos Santos et al (2014) em que ratos e ratas Wistar adultos (3 meses) e idosos (12 meses) foram tratados com dexametasona na dose de 1 mg/Kg, via intraperitoneal, durante 5 dias consecutivos, demonstrou que somente as ratas fêmeas adultas não se tornaram intolerantes à glicose. De acordo com os autores, as ratas fêmeas adultas (mas não as de 12 meses) estão protegidas da intolerância à glicose devido a uma maior capacidade de secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas.

É sabido que no terço final da prenhez há redução da sensibilidade à insulina com consequente aumento da massa de células  $\beta$  pancreáticas e aumento da síntese e secreção de insulina estimulada pela glicose, regulada principalmente pelos hormônios prolactina e hPL (CATALANO; DRAGO; AMINI, 1998; AMARAL et al., 2004). Juntos,

esses fatores resultam em aumento da secreção de insulina, que poderia explicar a tolerância normal à glicose durante a gestação (KNOPP et al., 1981). Neste sentido, Amaral et al. (2004) demonstraram o envolvimento da via da fosfatidil inositol 3 cinase (PI3K) e da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) no desenvolvimento e crescimento das ilhotas pancreáticas em ratas prenhes. Esses autores demonstraram um aumento na expressão proteica de PKB e p70<sup>S6K</sup> (via da PI3K) e SHC (via da MAPK). Ainda, observaram que essa cascata de sinalização é regulada por sinalização envolvendo a prolactina; dessa forma, essas vias participam no aumento da massa das ilhotas e na sensibilização à glicose durante a prenhez.

Com relação à homeostase lipídica é de conhecimento que ocorre aumento nas concentrações de triacilglicerol plasmático durante o terço final da gestação tanto em mulheres (KNOPP et al., 1986; ALVAREZ et al., 1996) como em ratas (BOSCH; CAMEJO 1967; OTWAY; ROBINSON, 1968). As ratas dos grupos CP de DP desenvolveram marcante hipertriacilgliceridemia em nosso estudo revelando ausência de efeito sinérgico do GC nesse contexto. A elevação das concentrações de triacilglicerol plasmático no terço final da gestação pode ser o resultado de um ou mais mecanismos como: aumento da exportação hepática; diminuição da depuração plasmática (ROBINSON, 1963) ou aumento da lipólise periférica (ALVAREZ et al., 1996). Apesar do triacilglicerol plasmático basal não ter sido grandemente influenciado pelo GC o mesmo não foi observado no teste oral de tolerância aos lipídios (TTL). No TTL pudemos observar um efeito tanto da prenhez quanto do tratamento com o GC, que resultaram em intolerância aos lipídios. Isso é provavelmente resultado da redução da atividade da LPL do tecido adiposo, principal enzima responsável pela depuração plasmática de triacilglicerol (PICARD et al., 1999). Esses dados são corroborados por vários estudos que demonstram uma redução da ação da LPL do tecido adiposo em ratas prenhes e redução da atividade da LPL no plasma após administração de heparina em mulheres durante o terço final/terceiro trimestre da prenhez/gravidez (OTWAY; ROBINSON, 1968; HERRERA, 2002). De fato, Otway; Robinson (1968), utilizando ratas Wistar prenhes, demonstraram que a concentração de triacilglicerol plasmático aumenta a um máximo de 2-4 dias antes do parto, havendo um rápido declínio em sua concentração plasmática chegando a valores basais próximo ao parto e que este aumento está relacionado com menor atividade da enzima LPL do tecido adiposo, não havendo compensação por outros tecidos extra-hepáticos, como os pulmões, coração ou diafragma. Quando observado o efeito

isolado da dexametasona sobre a tolerância aos lipídios observamos que esta também estava reduzida em ambos os grupos. Esses resultados são corroborados por Bagdade et al., (1976) que utilizou ratos machos adultos recebendo injeções intramusculares de dexametasona (0,125 mg/Kg) diariamente durante duas semanas. Neste estudo, os ratos tratados com dexametasona apresentaram elevadas concentrações de triacilglicerol plasmático e este aumento esteve relacionado a redução da remoção de VLDL devido à redução da atividade da LPL do tecido adiposo. Esta observação está em acordo com estudos realizados em humanos tratados com GCs em que foi avaliado a atividade lipolítica da LPL após a administração de heparina e foi observado redução da atividade da LPL do tecido adiposo associada com aumento das concentrações de VLDL plasmáticas (STERN et al., 1972; CASARETTO et al., 1974).

A lipólise, baseada na liberação basal de glicerol manteve-se similar entre todos os grupos, sugerindo que esse fator não influenciou a hipertrigliceridemia em nossos animais (Tabela 2). A ausência de alteração na liberação basal de glicerol pelo tecido adiposo neste estudo pode estar relacionada à baixa dose de dexametasona administrada. Estudos em ratos tratados com dexametasona demonstram aumento da atividade lipolítica do tecido adiposo; no entanto, esses estudos foram realizados em contextos distintos, como doses mais elevadas (1 mg/Kg por 5 dias consecutivos, BARBOSA et al., 2016) e/ou período prolongado (0,5 mg/Kg por 15 dias consecutivos). Além disso, a taxa de produção hepática de triacilglicerol e seu aparecimento na circulação, calculada durante o tratamento com o composto P407 (inibidor de LPL), não revelou diferença entre os grupos. Este resultado foi corroborado pela expressão inalterada de genes que codificam enzimas cruciais envolvidas na via lipogênica (SREBP1, FASN) e na montagem de VLDL (MTTP, ApoB). De fato, estudos prévios já demonstraram que o tratamento com a dexametasona não afeta a expressão de ApoB (STAELS et al., 1991) e MTTP no fígado (LU et al., 2002). Apesar de estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que os GCs estimulam a lipogênese por regular positivamente a expressão de enzimas envolvidas na síntese dos lipídios, como a ACC, FASN e DGAT 1 e 2 (DOLINSKY et al., 2004; WANG et al., 2004; GATHERCOLE et al., 2011; LEE et al., 2011), não encontramos nenhuma alteração nos demais genes relacionados à síntese de triacilglicerol, exceto pela suprarregulação hepática da DGAT2 no grupo DP. Essas divergências podem estar relacionadas aos contextos em que os protocolos experimentais foram realizados. Estudo de Xu; Rooney (1997)

demonstrou que a dexametasona aumenta a expressão da FASN, no entanto o ensaio foi realizado em cultura de pulmão fetal durante 44 h com uma dose de 100 mM de dexametasona, contexto bem diferente do realizado no presente estudo. No entanto, em ambos os grupos de ratas prenhes, a depuração plasmática de triacilglicerol, obtidos durante o experimento com o composto P407, foi reduzida, o que demonstra uma habilidade prejudicada do fígado em remover o triacilglicerol da circulação. Embora os receptores LDL-R E LRP, responsáveis em parte pela depuração de remanescentes de VLDL e quilomícrons não tiveram alteração na expressão gênica em nenhum dos grupos avaliados, a apolipoproteína E (ApoE) pode estar envolvida na redução da depuração plasmática de triacilglicerol ((MCGLADDERY; FROHLICH, 2001).

A ApoE desempenha um importante papel na regulação do metabolismo dos quilomícrons, VLDL e HDL via seu receptor ApoE. Este receptor é responsável, em parte, pela captação do colesterol da dieta na forma de quilomícrons remanescentes, depuração das remanescentes de VLDL e remoção do excesso de colesterol de tecidos periféricos através da depuração hepática de HDL contendo ApoE. Uma vez que durante a gestação/prenhez parece haver redução na atividade da LPL, a conversão de VLDL em remanescentes de VLDL pode estar diminuída. Isto, por sua vez, reduziria a disponibilidade de substratos ApoE e poderia reduzir a necessidade de captação de partículas contendo ApoE pelo fígado (MCGLADDERY; FROHLICH, 2001).

A intolerância aos lipídeos observada durante o oTTL, que sugere redução da atividade da LPL do tecido adiposo, juntamente à redução da depuração plasmática, explica ao menos em partes o motivo da hipertriacilgliceridemia durante a gestação que se dá, neste modelo, em detrimento de outros fatores, como aumento na exportação hepática de triacilglicerol e aumento da lipólise.

Com relação aos parâmetros murinométricos e bioquímicos, os dados obtidos após a eutanásia confirmaram algumas alterações que ocorrem por efeito da exposição ao GC em excesso, como a atrofia do baço e das adrenais (CHIMIN et al., 2014; MITEVSKA; KOSTADINOVA-PETROVA; KOSTOVSKA, 2015; BATTISTON et al., 2017), aumento da massa relativa do fígado e aumento do conteúdo de glicogênio hepático e diminuição da massa da gordura retroperitoneal (NUNES et al., 2013, GONÇALVES-NETO et al., 2014; MOTTA et al., 2014). Os GCs podem aumentar o conteúdo de glicogênio hepático aumentando a atividade da glicogênio sintase (RAY; FOSTER; LARDY, 1964; de WULF; HERS, 1967; STALMANS; LALOUX, 1979). A atividade desta enzima é regulada negativamente

pela proteína cinase A (PKA) e pela cinase da glicogênio sintase 3 (GSK3) que fosforilam e inativam a glicogênio sintase (RYLATT et al., 1980; PUGAZHENTHI; KHANDELWAL, 1995). Em contrapartida, a proteína fosfatase 1 (PP1) promove sua desfosforilação e ativação (BRADY; NAIRN; SALTIEL, 1997; PRINTEN; BRADY; SALTIEL, 1997). Estudos sugerem que a ativação da PP1 seja dependente dos GCs, embora o exato mecanismo não esteja esclarecido (VANSTAPEL; DOPERE; STALMANS, 1980; LALOUX; STALMANS; HERS, 1983). Ainda, as ratas tratadas com dexametasona (virgens e prenhes) apresentaram aumento da expressão de mRNA para a FOXO1 no fígado. Este fator de transcrição é conhecido por regular positivamente a via gliconeogênica no fígado (NAKAE et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2007) onde parte da síntese de glicose a partir de substratos como glicerol, lactato e aminoácidos, pode ser desviada para a glicogênese e contribuir com o aumento do conteúdo de glicogênio hepático. Embora estudos afirmem que os GCs exercem atividade pró-lipogênica e adipogênica em tecido adiposo visceral (GAILLARD et al., 1991), neste estudo, a adiposidade perigonadal não foi alterada, a julgar pela massa da gordura perigonadal e confirmada pela ausência de alterações no tamanho dos adipócitos, com base no perímetro do adipócito perigonadal (Figura 6). Essa discordância de resultados pode ocorrer, pelo menos em partes, devido às condições em que a pesquisa foi reproduzida. Ao contrário de nosso estudo, a maioria desses ensaios foi realizada em culturas primárias de pré-adipócitos de ratos (WIEDERER; LOFFLER, 1987), camundongos (CHAPMAN et al., 1985; GAILLARD et al., 1991) e humanos (HAUNER et al., 1989).

As concentrações de colesterol total e colesterol HDL circulantes também foram elevadas nos grupos de ratas tratados com dexametasona. Esta alteração pode ser parcialmente explicada pela ação genômica do GR sobre o promotor de Apo1, como demonstrado em estudos prévios realizados em humanos, que envolveu tratamento com prednisolona oral 0,35 mg/Kg/dia, durante 14 dias (ETTINGER; KLINEFELTER; KWITEROVITCH, 1987; ETTINGER; HAZZARD, 1988). Esta regulação positiva da Apo1 leva ao aumento da síntese e secreção do colesterol HDL. O tratamento com dexametasona também reduziu a sensibilidade à insulina conforme observado pelas elevadas concentrações de insulina plasmática e corroborado pelo índice HOMA, resultados que estão de acordo com estudos anteriores realizados com tratamento com GC (CAPERUTO et al., 2006; BURÉN et al., 2008;

RAFACHO et al., 2010b). Caperuto et al. (2006) investigaram o conteúdo e fosforilação do receptor de insulina e de substratos do receptor; além de sua associação com a via da PI3K no tecido adiposo de ratos machos tratados com dexametasona 1mg/kg via intraperitoneal durante 5 dias consecutivos. Como resultado, observaram redução no conteúdo e fosforilação do IRS-1 e IRS-2 e redução da associação com a via da PI3K. Burén et al. (2008) em experimento realizado com ratos Wistar machos, tratados com dexametasona na dose de 1 mg/kg, pela via intraperitoneal, durante 11 dias consecutivos demonstraram que o tratamento com dexametasona diminui o conteúdo da PKB e sua fosforilação estimulada por insulina nos músculos e tecido adiposo. Além disso, demonstraram que o tratamento com dexametasona aumenta a fosforilação da GS nos músculos e diminui seu conteúdo no tecido adiposo. Sugerindo, portanto, o papel da PKB e da GS na RI induzida por dexametasona. Corroborando os autores supracitados Motta et al., 2014 investigaram a fosforilação da PKB e do IRS1 em tecido adiposo gonadal após um *bolus* oral de glicose em ratos Wistar tratados com dexametasona (1mg/Kg via intraperitoneal durante 5 dias consecutivos) e observaram que ambas as proteínas tiveram suas atividades reduzidas no tecido adiposo dos animais tratados com o GC.

As concentrações de triacilglicerol elevadas observadas no final da gestação retornaram aos valores basais assim que iniciou a lactação e permaneceram inalteradas até seis meses após o desmame. Este processo foi independente da presença ou não da prole, uma vez que os neonatos das prenhes tratadas com dexametasona morreram dentro de 3 dias após o nascimento. O retorno aos valores basais do triacilglicerol plasmático foi previamente demonstrado em estudos envolvendo ratas (OTWAY; ROBINSON, 1968; AGIUS et al., 1981) e mulheres (MONTES et al., 1984; KNOPP et al., 1986; DESOYE et al., 1987). Estes estudos sugerem que, imediatamente após o parto, esta hipertriacilgliceridemia materna diminui para os valores pré-gestacionais como resultado de uma diminuição da taxa de entrada de triacilglicerol na circulação (AGIUS et al., 1981) e pelo aumento da atividade LPL nas glândulas mamárias que desvia o triacilglicerol do plasma que irá servir para a síntese do leite materno (OTWAY; ROBINSON, 1968). Os fatores hormonais responsáveis por essas alterações incluem declínio nas concentrações de progesterona plasmática e aumento subsequente nas concentrações de prolactina que ocorrem nos últimos dias da gestação (AMENOMORI; CHEN; MEITES, 1970). Em ratas, a prolactina medeia diretamente o controle da atividade de LPL na glândula mamária e no tecido adiposo

durante a fase final da gestação e na lactação (ZINDER et al., 1974; SPOONER; GARRISON; SCOW, 1977).

Com relação aos impactos tardios, os GCs não promoveram nenhum impacto que tenha sido relevante no longo prazo sobre o ganho de massa corporal, o metabolismo lipídico (baseado na triacilgliceridemia e conteúdo de triacilglicerol hepático) e sobre o metabolismo da glicose (baseado na tolerância à glicose e conteúdo de glicogênio hepático) no período pós-termo (até 6 meses após o período equivalente ao desmame). Esses dados são corroborados por um estudo prévio onde foi demonstrado a normalização de praticamente todas as alterações estruturais, funcionais e moleculares relacionadas ao metabolismo de glicose e lipídios 10 dias após o tratamento com a dexametasona (1 mg/Kg pc) ser interrompida (RAFACHO et al., 2010a). Estes resultados, entretanto, vão de encontro aos resultados obtidos por Gomes et al., (2014) que utilizando o mesmo protocolo experimental do presente trabalho observaram a intolerância à glicose a partir dos 3 meses após o desmame e mantidos até o 12 mês, período em que se encerra o estudo. Segundo os autores, essa intolerância é desencadeada pela redução da função das células  $\beta$  pancreáticas. Essa divergência entre os resultados de Gomes e colaboradores e o nosso pode ocorrer devido as diferentes matrizes animais, por se tratarem de animais oriundos de fornecedores distintos. Assim, temos uma questão que merece mais estudos a fim de consolidarmos os achados.

Embora a exposição à dexametasona no terço final da gestação não tenha causado impactos relevantes nos parâmetros avaliados, seus efeitos sobre a prole foram bastante deletérios. O período gestacional e o número de neonatos não foram alterados pela dexametasona; no entanto, esta exposição resultou em restrição do crescimento intrauterino e causou o óbito de 100% da prole logo nos primeiros dias da lactação. A redução do crescimento intrauterino é corroborada por outros estudos (REINISCH et al., 1978; EMGARD et al., 2007). Um estudo com ratas Sprague Dawley tratadas com a dexametasona (0,1 mg/Kg, i.p.) do 8º ao 21º dia de gestação demonstrou que a exposição pré-natal ao GC afetou funções cognitivas, como a memória, e por meio da redução da função de vias colinérgicas. Os efeitos deletérios da exposição pré-natal aos GCs sintéticos também incluem déficit no desenvolvimento de órgãos (rins, cérebro e coração) e aumento do risco de doenças crônicas na idade adulta, como obesidade, desenvolvimento de diabetes mellitus 2 e hipertensão arterial (NYIRENDA et al., 1998; SINGH; CUFFE; MORITZ, 2012). Esses efeitos são associados com um quadro de insuficiência placentária, desregulação de hormônios produzidos pela

placenta e inibição do hormônio semelhante à insulina-2 (IGF-2) placentário, um importante fator de crescimento placentário (CONSTANCIA et al., 2002). Além do baixo peso ao nascer ser uma das causas da morte dos neonatos (BARKER, 1995; SECKL, 2004), um estudo em humanos demonstrou que a terapia neonatal com GC está associada com risco elevado de desenvolvimento de infecções severas nos neonatos, podendo ser outro fator causal dos óbitos na prole de ratas tratadas com a dexametasona (ALTHABE et al., 2016).

Dessa forma, podemos concluir que os GC são importantes e necessários para o desenvolvimento fetal, todavia é necessário cautela na sua utilização, uma vez que diversos estudos experimentais e clínicos sugerem que a exposição fetal excessiva aos GCs pode resultar em efeito deletério, seja logo no início da vida, ou no longo prazo. A exposição fetal aos GCs pode ocorrer durante toda a gestação caso a mãe tenha que fazer uso desta medicação (i.e., no tratamento da asma, ou outras doenças prévias) ou no terço final caso haja ameaça de parto prematuro. Assim, como os GCs sintéticos podem atravessar a barreira placentária, acaba exercendo efeito benéfico, pelo menos em curto prazo, tanto para a saúde da mãe quanto para a sobrevivência fetal. Todavia, quando a exposição é excessiva, há aumento nas chances de aborto, baixo peso ao nascer e alterações metabólicas na vida adulta (i.e., HAS e hiperglicemia) além de alterações cognitivas. Contudo, a natureza e o grau de gravidade de prejuízo fetal serão dependentes do período em que são expostos ao GC, do tipo de GC utilizado, da dose e da duração do tratamento.

A dexametasona tem sido comumente utilizada como modelo para restrição do crescimento intrauterino (RCIU). Em ratas, as doses utilizadas para este fim variam na faixa de 100 a 400 µg/kg p.c., tanto pela via subcutânea, oral ou intramuscular, e são administradas diariamente entre o 14º e 21º dia gestacional (LANGDOWN; SUGDEN 2001; SUDGEN et al., 2001; SOMM et al., 2012; ALGARYYAN et al., 2017). A RCIU é observada na prática clínica quando GC sintéticos, como a dexametasona e a betametasona, são utilizados em casos de risco de parto prematuro antes da 34ª semana de gestação (RAVELLI et al., 1988; NYERENDA et al., 1998). Para este fim, são utilizadas 2 doses de 12 mg de betametasona com intervalo de 24 h por dose ou 4 doses de 6 mg de dexametasona com intervalo de 12 h por dose via intramuscular. A dose utilizada neste presente protocolo experimental (0,2 mg/Kg p.c.) se calculada a equivalência para humanos, baseada na equação de Nair; Jacob, (2016), deveria ser de ~0,03 mg/Kg de massa corpórea, dose consideravelmente menor do que a administrada em mulheres em risco

de parto prematuro (i.e., se uma mulher de 65 Kg receber 2 mg/Kg, então deveria receber 2 mg (6 vezes menor do que os 12 mg de dexametasona por dia). Se trabalharmos no conceito inverso e transferir a dose do equivalente em humano (i.e., 12 mg em uma mulher de 65 Kg) para o rato, os animais deveriam receber ~1,2 mg/Kg (6 vezes mais do que foi proposto no trabalho). Como 0,2 mg/Kg foi muito agressivo para os neonatos, evitamos tal dose equivalente. Os estudos de Anderson et al (1981) corroboram nosso racional ao considerarem a dose de 0,1 mg/Kg insuficiente para o tratamento em ratos. Contudo, a consideram uma dose compatível com a utilizada para promover a maturação pulmonar em humanos. Os mesmos autores consideram a dose de 0,2 mg/Kg deletéria. No entanto, no protocolo utilizado por esses autores, a via de administração escolhida foi a subcutânea, enquanto que em nosso estudo se deu pela via oral (diluído na água de beber). A via oral foi escolhida em nosso estudo por causar menos estresse ao animal, uma vez que evita a manipulação do mesmo. Contudo, ressaltamos como fatores limitantes em nosso delineamento, o fato de que os GC administrados pela via oral estão sujeitos ao metabolismo hepático em sua primeira passagem no sistema portal. Com isso há redução de sua biodisponibilidade (RANG; DALE, 2012). Também reconhecemos que a oferta do GC na água de beber pode ser um limitante ao nosso estudo já que o animal está constantemente exposto aos efeitos do GC.

Em resumo, a elevação nas concentrações de triacilglicerol plasmático e a redução da depuração hepática do triacilglicerol observados durante o terço final da gestação não foram agravados pelo tratamento com dexametasona. Contudo, o GC parece atenuar a atividade da LPL, a julgar pelo impacto sobre a tolerância diminuída aos lipídeos. Assim, concluímos que a exposição ao GC durante o terço final da gestação não representa grande impacto na homeostase lipídica basal, nem mais tarde na vida. No entanto, reforçamos que o uso de GC durante a gravidez deve ser limitado considerando o impacto deletério aos recém-nascidos.



## REFERÊNCIAS

ACOG Committee on Obstetric Practice. ACOG Committee Opinion No. 475: antenatal [corticosteroid therapy for fetal maturation. **Obstet. Gynecol.**, v. 177, p. 422-4, 2011.

AGIUS, L. et al. Rates of triacylglycerol entry into the circulation in the lactating rat. **Biochem. J.**, v. 15, n. 2, p. 637-40, 1981.

ALQARYYAN, M. et al. Dexamethasone-Induced Intrauterine Growth Restriction Is Associated With Altered Expressions of Metastasis Tumor Antigens and Cell Cycle Control Proteins in Rat Placentas. **Reprod. Sci.**, v. 24, n. 8, p. 1164-75, 2017.

ALTHABE, F. et al. The Antenatal Corticosteroids Trial (ACT)'s explanations for neonatal mortality - a secondary analysis. **Reprod. Health.**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2016.

ALVAREZ, J. J., et al. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. **J. Lipid. Res.**, v. 37, p. 299-308, 1996.

AMARAL, M. E. et al. Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. **J. Endocrinol.**, v. 183, n. 3, p. 469-76, 2004.

AMENOMORI, Y.; CHEN, C. L.; MEITES, J. Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. **Endocrinology**, v. 86, n. 3, p. 506-10, 1970.

ANDERSON, G.G. et al. Comparative pulmonary surfactant-inducing effect of three corticosteroids in the near-term rat. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 1, n.139, p. 562-4, 1981.

ANDREWS, R. C.; WALKER, B. R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clin. Science**, v. 96, p. 513-23, 1999.

APPEL, B.; FRIED, S. K. Effects of insulin and dexamethasone on lipoprotein lipase in human adipose tissue. **Am. J. Physiol.**, v. 262, p. E695-9, 1992.

ARGILES J.; HERRERA, E. Appearance of circulating and tissue after oral 14C-tripalmitate administration in the late pregnant rat. **Metabolism**, v. 38, p. 104-8, 1989.

ARGILES, J.; HERRERA, E. Lipids and lipoproteins in maternal and fetus plasma in the rat. **Biol. Neonate**, v. 39, p. 37- 44, 1981.

AUCLAIR, D. et al. Activation of the ubiquitin pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of glucocorticoids. **Am. J. Physiol.**, v. 4, p. C1007-16, 1997.

AUGUSTINE, R. A.; GRATAN, D. R. Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. **Endocrinology**, v. 149, p. 1049-55, 2008.

AVRAMOGLU, R. K.; BASCIANO, H.; ADELI, K. Lipid and lipoprotein ys regulation in insulin resistant states. **Clin. Chim. Acta**, v. 368, p. 1-19, 2006.

BAGDADE, J. D. et al. Glucocorticoids and Triglyceride Transport: Effects on Triglyceride Secretion Rates, Lipoprotein Lipase, and Plasma Lipoproteins in the Rat. **Metabolism**, v. 25, n. 5, 1976.

BALLARD, P. L.; BALLARD, R. A. Scientific basis and therapeutic regimens for use of antenatal glucocorticoids. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 173, p. 254-62, 1995.

BARBOSA, A. M. et al. Fish oil supplementation attenuates changes in plasma lipids caused by dexamethasone treatment in rats. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v. 41, n. 4, p.382-90, 2016.

BARKER, D. J. P. Fetal origins of coronary heart disease. **Br. Med. J.**, v. 311, p. 171-4, 1995.

BATTISTON, F.G., et al. Glucose homeostasis in rats treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide is not worsened by dexamethasone treatment. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 165, p. 170-81, 2017.

BELFRAGE, P., et al. Regulation of adipose-tissue lipolysis by phosphorylation of hormone-sensitive lipase. **Int. J. Obes.**, v. 5, p. 635–41, 1981.

BERGÖ, M.; OLIVECRONA, G.; OLIVECRONA, T. Diurnal rhythms and effects of fasting and refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. E1092–7, 1996.

BODEN, G.; HOELDTKE, R. D. Nerves, fat, and insulin resistance. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, p. 1966–7, 2003.

BOSCH, V.; CAMEJO, G. Serum lipoproteinemia in pregnant and lactating rats. **J Lipid. Res.**, v. 8, p. 38–41, 1967.

BOUMPAS, D.T., et al. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **Ann. Intern. Med.**, v. 119, p. 1198–208, 1993.

BRADY, M. J.; NAIRN, A. C.; SALTIEL, A. R. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 29698–703, 1997.

BRIZZI, P., et al. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 181, n. 2, p. 430–4, 1999.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. **Cell**, v. 89, p. 331–40, 1997.

BROWN, R. W., et al. The ontogeny of 11(-hydroksysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. **Endocrinology**, v. 137, p. 794–7, 1996.

BUCH, I.; HORNNES, P. J.; KÜHL, C. Glucose tolerance in early pregnancy. **Acta Endocrinol (Copenh.)**, v. 112, n. 2, p. 263–6, 1986.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clin. Chem**, v.19, n.5, p.476-482, 1973.

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

CALDEFIE-CHÉZET, F. et al. Dexamethasone treatment induces long-lasting hyperleptinemia and anorexia in old rats. **Metabolism.**, v. 50, n. 9, p. 1054-8, 2001.

CAPERUTO, L. C.; et al. Distinct Regulation of IRS Proteins in Adipose Tissue from Obese Aged and Dexamethasone-Treated Rats. **Endocrine**, v. 29, n. 3, p.391-8, 2006.

CARR, B. R. et al. Maternal plasma adrenocorticotropin and cortisol relationships throughout human pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 139, p. 416-22, 1981.

CARRASCOSA, J. M. et al Changes in the kinase activity of the insulin receptor account for an increased insulin sensitivity of mammary gland in late pregnancy. **Endocrinology**, v. 139, p. 520-6, 1998.

CASARETTO, A. et al. Hyperlipidemia after successful renal transplantation. **Lancet**, v. 1, p. 481-84, 1974.

CATALANO, P. M. et al. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, p. 1667-72, 1991.

CATALANO, P. M.; DRAGO, N. M.; AMINI, S.B. Longitudinal changes in pancreatic b-cell function and metabolic clearance rate of insulin in pregnant women with normal and abnormal glucose tolerance. **Diabetes Care**, v. 21, p. 403-8, 1998.

CHAPMAN, A. B. et al. Glucocorticoid regulation of adipocyte differentiation: hormonal triggering of the developmental program and induction of a differentiation-dependent gene. **J. Cell Bid.**, v. 101, p. 1227-235, 1985.

CHIMIN, P., et al. Chronic glucocorticoid treatment enhances lipogenic activity in visceral adipocytes of male Wistar rats. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 211, n. 2, p.409-20. 2014.

CHRYSIS, D; UNDERWOOD, L. E. Regulation of Components of the Ubiquitin System by Insulin-Like Growth Factor I and Growth Hormone in Skeletal Muscle of Rats Made Catabolic with Dexamethasone. **Endocrinology**, v. 140, n. 12, p. 5635-41, 1999.

COLE, T. G.; WILCOX, H. G.; HEIMBERG, M. Effects of adrenalectomy and dexamethasone on hepatic lipid metabolism. **J. Lipid. Res.**, v. 23, p. 81–91, 1982.

COLE, T. J, et al. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. **Genes**, v. 9, p.1608–21, 1995.

CONSTANCIA M. et al. Placenta-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. **Nature**, v. 417, p. 945–948, 2002.

COUSINS, L. Insulin sensitivity in pregnancy. **Diabetes**, v. 2, p. 39-43, 1991.

DANIELSEN, M.; STALLCUP, M. R. Down-regulation of glucocorticoid receptors in mouse lymphoma cell variants. **Mol. Cell Biol.** v. 4, n. 3, p.449–53, 1984.

DARDEVET, D. et al. Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 2113–9, 1995.

DAVIS, G. F. Adverse Effects of Corticosteroids: I I. Systemic. **Clinics in dermatology**, v. 4, n. 1, p.161-9, 1986.

DEMEY-PONSART, E. et al. Serum CBG, free and total cortisol and circadian patterns of adrenal function in normal pregnancy. **J. Steroid. Biochem.**, v. 16. P.165–9, 1982.

DESROYE. G., et al. Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 64, n. 4, p. 704-12, 1987.

DESSENS, A. B.; HAAS, H. S.; KOPPE, J. G. Twenty-year follow-up of antenatal corticosteroid treatment. **Pediatrics**, v. 105, n. 6, p. E77, 2000.

DE WULF, H.; HERS, H. G. The stimulation of glycogen synthesis and of glycogen synthetase in the liver by glucocorticoids. **Eur. J. Biochem.**, v. 2, p. 57–60, 1967.

DEGERMAN, E., et al. Evidence that insulin and isoprenaline activate the cGMP-inhibited low-Km cAMP phosphodiesterase in rat fat cells by phosphorylation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 533–537, 1990.

DOLINSKY, V. W. et al. Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone. **Biochem. J.**, v. 378, p. 967–74, 2004.

Dos SANTOS, C. et al. A. Age- and gender-related changes in glucose homeostasis in glucocorticoid-treated rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 92, n. 10, p. 867-78, 2014.

DOUGLAS, A. J.; JOHNSTONE, L. E.; LENG, G. Neuroendocrine mechanisms of change in food intake during pregnancy: a potential role for brain oxytocin. **Physiol. Behav.**, v. 91, n. 4, p. 352-65, 2007.

EBERLÉ, D. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. **Biochimie**, v. 86, n. 11, p. 839–48, 2004.

EMGARD M., et al. Prenatal glucocorticoid exposure affects learning and vulnerability of cholinergic neurons. **Neurobiol. Aging**, v. 28, p. 112–21, 2007.

ETTINGER, W. H.; HAZZARD, W. R. Prednisone increases very low density lipoprotein and high density lipoprotein in healthy men. **Metabolism**, v. 37, p. 1055-58, 1988.

ETTINGER, W. H.; KLINEFELTER, H. F.; KWITEROVITCH, P. O. Effect of short-term, low-dose corticosteroids on plasma lipoprotein lipids. **Atherosclerosis**, v. 63, p. 167-72, 1987.

EXTON, J. H. et al. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in

liver and of lipolysis in adipose tissue, **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 3579–88, 1972.

FIELD, T. et al Prenatal cortisol, prematurity and low birthweight. **Infant. Behav. Dev.**, v. 29, p. 268–75, 2006.

FIELD, T., et al. Prenatal maternal cortisol, fetal activity and growth. **Int. J. Neurosci.**, v. 115, p. 423–9, 2005.

FISHER, J. E. et al. Gestational diabetes mellitus in women receiving beta-adrenergics and corticosteroids for threatened preterm delivery. **Obstet. Gynecol.**, v. 90, n. 6, p.880-3, 1997.

FISHER, P. M., et al .The effect of pregnancy on intravenous glucose tolerance. **J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.**,v. 81, n. 4, p. 285-90, 1974.

FORETZ, M. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 12737–42, 1999.

FRAYN, K. N. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. **Diabetologia**, v. 45, p.1201–10, 2002.

FREDRIKSON, G. et al. Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties, **J. Biol. Chem.**, v. 256, 6311-20, 1981.

FRENCH, N. P. et al. Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 190, n. 3, p. 588- 95, 2004.

FRIED, S. K. et al. Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 2191-8, 1993.

FUNDER, J. W. Glucocorticoid receptors. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 43, n. 5, p.389-94, 1992.

GAILLARD, D., et al. Control of terminal differentiation of adipose precursor cells by glucocorticoids. **J. Lipid Res.**, v. 32, p. 569–79, 1991.

GATHERCOLE, L. L. et al. Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. **PLoS One**, v. 6, p. 26223, 2011.

GINSBERG, H. N. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. **Diabetes Care**, v.14, n. 9, p.839-55, 1991.

GIORGINO, F.; LAVIOLA, L.; ERIKSSON, J. W. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. **Acta Physiol. Scand.**, v. 183, n. 13–30, 2005.

GIRARD, J. et al. Glucose homeostasis in pregnancy and lactation. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 15, n. 6, p. 1028-30, 1987.

GOMES, P.R. et al. Long-term disruption of maternal glucose homeostasis induced by prenatal glucocorticoid treatment correlates with miR-29 upregulation. **Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.**, v. 306, n. 1, p. E109-20, 2014

GONÇALVES-NETO, L. M. et al. Disruption of glucose tolerance caused by glucocorticoid excess in rats is partially prevented, but not attenuated, by arjunolic acid. **Indian. J. Exp. Biol.**, v. 52, n. 10, p. 972-82, 2014.

GUR, C. et al. A. Pregnancy outcome after first trimester exposure to corticosteroids: a prospective controlled study. **Reprod. Toxicol**, v. 18, n. 1, p 93- 101, 2004.

HAUNER, H. et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 1663-70, 1989.

HAUNER, H.; SCHMID, P.; PFEIFFER, E. F. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells, **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 64, p. 832–5., 1987.

HERRERA, E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v. 19, n. 1, p. 43-55, 2002.

HERRERA, E. et al. Carbohydrate-lipid interactions during gestation and their control by insulin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 11, p. 2499-519, 1994a.

HERRERA E. et al. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. **Diabetes**, v. 40, n. 2, p. 83-88, 1991.

HERRERA, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 54, p. 47-51, 2000.

HERRERA, E. et al.: Metabolic interactions during pregnancy in preparation for lactation. **Dairy Products in Human Health and Nutrition**, p. 189-97, 1994b

HERRERA, E. Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 158, p. 1575–83, 1988.

HERRERA, E.; BONET, B.; LASUNCIOÂN, M. A. Maternal-fetal transfer of lipid metabolites. **Fetal and Neonatal Physiology**, v. 2, p. 447-58, 1998.

HERRERA, E.; MUNILLA, M. A. Maternal lipid metabolism and its implications for fetal growth. **In: Placental Function and Fetal Nutrition**, p 169-82.,1997.

HERRERA, E.; ORTEGA-SENOVILLA, H. Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy—are these the cause of the problem? **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 24, p. 515–25, 2010.

HILLGARTNER, F. B.; SALATI, L. M.; GOODRIDGE, A. G. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. **Physiol. Rev.**, v. 75, n. 1, p. 47–76, 1995.

HOLMES, M.C. et al. The mother or the fetus? 11betahydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. **J. Neurosci.**, v. 26, n.14, p. 3840-4, 2006.

HYTTEN, F. E.; LEITCH, I. The physiology of human pregnancy. **Blackwell Science**, v. 2, 1971.

JENSEN, M. D.; NIELSEN, S. Insulin dose response analysis of free fatty acid kinetics, **Metabolism**, v. 56, p. 68-76, 2007.

JIMENEZ, D. M. et al. Longitudinal study of plasma lipids and lipoprotein cholesterol in normal pregnancy and puerperium. **Gynecol Obstet Invest**, v. 25, n. 3, p. 158-64, 1988.

KARIMIAN, P. N.; ADELI, K. Insulin silences apolipoprotein B mRNA translation by inducing intracellular traffic into cytoplasmic RNA granules. **Biochemistry**, v. 50, p. 6942-50, 2011.

KARLSSON, S. et al. Beta cell adaptation to dexamethasone-induced insulin resistance in rats involves increased glucose responsiveness but not glucose effectiveness. **Pâncreas**. v. 22, n. 2, p. 148-56, 2001.

KING, J. C. Energy metabolism during pregnancy: influence of maternal energy status. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 59, n. 2, p. 439S-45S, 1994.

KIRWAN, J. P. et al. TNF-a is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. **Diabetes**, v. 51, p. 2207-13, 2002.

KITRAKI, E.; KITTAS, C.; STYLIANOPOULOU, F. Glucocorticoid receptor gene expression during rat embryogenesis. An in situ hybridization study. **Differentiatio**, v. 62, p. 21-31, 1997.

KNOPP, R. H. et al. Lipoprotein metabolism in pregnancy, fat transport to the fetus, and the effects of diabetes. **Bioi. Neonate**, v. 50, p. 297-317, 1986.

KNOPP, R. H. et al. Metabolic adjustments in normal and diabetic pregnancy. **Clin Obstet Gynecol**, v. 24, n. 1, p. 21-49, 1981.

KORACH-ANDRE, M. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 288, p.106-16, 2005.

KUO, T. et al. Genome-wide analysis of glucocorticoid receptor-binding sites in myotubes identifies gene networks modulating insulin signaling. **PNAS**, v. 109, n. 28, p. 11160-5, 2012.

LAIN, K. Y.; CATALANO, P. M. Metabolic changes in pregnancy. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v. 50, n. 4, p. 938-48, 2007.

LALOUX, M.; STALMANS, W.; HERS, H. G. On the mechanism by which glucocorticoids cause the activation of glycogen synthase in mouse and rat livers. **Eur. J. Biochem.**, v. 136, p. 175–81, 1983.

LANGDOWN, M. L.; SUGDEN, M. C. Enhanced placental GLUT1 and GLUT3 expression in dexamethasone-induced fetal growth retardation. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 185, n. 1-2, p. 109-17, 2001.

LARGE, V. et al. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes and Metabolism*, v. 30, p. 294–309, 2004.

LAUDET, V. et al. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. **EMBO. J.**, v. 11, p.1003-13, 1992.

LE LAY, S. et al. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1C target. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 35625–34, 2002.

LEE, J. J.; SMITH, P. J.; FRIED, S. K. Mechanisms of decreased lipoprotein lipase activity in adipocytes of starved rats depend on duration of starvation. **J. Nutr.**, v. 128, n. 6 p. 940–6, 1998.

LEE, M. J. et al. Pathways regulated by glucocorticoids in omental and subcutaneous human adipose tissues: a microarray study, **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab**, v. 300, p. E571–80, 2011.

LETURQUE A. et al. In vivo insulin resistance during pregnancy in the rat. **Diabetologia**, v. 19, n. 6, p. 521-8, 1980.

- LIGGINS, G. C.; HOWIE, R. N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. **Pediatrics**, v. 50, n. 4, p. 515-25, 1972.
- LIN, M. C.; GORDON, D.; WETTERAU, J. R. Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) regulation in HepG2 cells: insulin negatively regulates MTP gene expression. **J. Lipid Res.**, v. 36, p. 1073-81, 1995.
- LINDSAY, J. R.; NIEMAN, L. K. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy challenges in disease detection and treatment. **Endocr. Rev.**, v. 6, p. 775-99, 2005.
- LO, S. et al. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.**, v. 28, p. 234-6, 1970.
- LOPEZ, J. M. et al. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 6, n. 3, p.1049-53, 1996.
- LÓPEZ-LUNA, P. et al. Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. **Life Sci.**, v. 39, p. 1389-93, 1986.
- LOPEZ-LUNA, P. et al. Effect of starvation on lipoprotein lipase activity in different tissues during gestation in the rat. **Biochim. Biophys. Acta Lipids Lipid Metab.**, v. 1215, p. 275-9, 1994.
- LÓPEZ-LUNA, P.; MAIER, I.; HERRERA, E. Carcass and tissue fat content in the pregnant rat. **Biol. Neonate**, v. 60, n. 1, p. 29-38, 1991.
- LU, S. et al. Regulation of MTP expression in developing swine. **J. Lipid Res.**, v. 43, p. 1303-11, 2002.
- MACFARLANE, D. P.; FORBES, S.; WALKER, B. R. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. **J Endocrinol.**, v. 197, n. 2, p.189-204, 2008.
- MALKOSKI, S. P.; DORIN, R. I., Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. **Mol. Endocrinol.**, v. 13, p. 1629-44, 1999.

MARTIN, S.S. et al. Comparison of a novel method vs the Friedewald equation for estimating low-density lipoprotein cholesterol levels from the standard lipid profile. **JAMA**, v. 20, n.310, p.2061-8, 2013.

MARTIN-HIDALGO, A. et al. Lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activity and mRNA in rat adipose tissue during pregnancy. **Am. J. Physiol.**, v. 266, p. E930-5, 1994.

MASTORAKOS, G.; ILIAS, I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 997, p. 136-49, 2003.

MATSUMOTO, M. et al. Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. **Cell Metab.**, v. 6, p. 208-16, 2007.

MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-19, 1985.

MCDONOUGH, A. K.; CURTIS, J. R.; SAAG, K. G. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. **Curr. Opin. Rheumatol.**, v. 20, p. 131-7, 2008.

MCGLADDERY, S. H.; FROHLICH, J. J. Lipoprotein lipase and apoE polymorphisms: relationship to hypertriglyceridemia during pregnancy. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 1905-12, 2001.

MEEH, R. C.; SCHRAUWEN, P.; HESSELINK, M. K. Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease, **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 297, p. 913-24, 2009.

MILLAR, J. S. et al. Determining hepatic triglyceride production in mice: comparison of poloxamer 407 with Triton WR-1339. **J. Lipid Res.**, v. 46, n. 9, p. 2023-8, 2005.

MILLS, J. L. et al. Physiological reduction in fasting plasma glucose concentration in the first trimester of normal pregnancy: the diabetes in early pregnancy study. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 47, n. 1140-4, 1998.

MINSHULL, M.; STRONG, C. R. The stimulation of lipogenesis in white adipose tissue from fed rats by corticosterone, **Int. J. Biochem.**, v. 17, p. 529–32, 1985.

MITEVSKA, E.; KOSTADINOVA-PETROVA, I.; KOSTOVSKA, N. Changes of Spleen in Wistar Rats Exposed to Therapeutic Doses of Dexamethasone and Medroxyprogesterone Acetate Evaluated by Stereological Parameters. **Pril. (Makedon Akad. Nauk. Umet. Odd Med. Nauki.**, v. 36, n. 3, p. 13-25, 2015.

MONTES. A. et al. Physiologic and supraphysiologic increases in lipoprotein lipids and apoproteins in late pregnancy and postpartum. Possible markers for the diagnosis of "prelipemia". **Arteriosclerosis**, v. 4, n. 4, p. 407-17, 1984.

MOTTA, K. et al. JNK and IKK $\beta$  phosphorylation is reduced by glucocorticoids in adipose tissue from insulin-resistant rats. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 145, p. 1-12, 2014.

MUNILLA, M. A.; HERRERA, E. A cholesterol-rich diet causes a greater hypercholesterolemic response in pregnant than in nonpregnant rats and does not modify fetal lipoprotein profile. **J. Nutr.** v. 127, p. 2239- 45, 1997.

MUÑOZ, C.; LÓPEZ-LUNA, P.; HERRERA, E. Glucose and insulin tolerance tests in the rat on different days of gestation. **Biol. Neonate.**, v. 68, n. 4, p. 282-91, 1995.

MURPHY, V. E. et al. Metabolism of synthetic steroids by the human placenta. **Placenta**, v. 28, n. 1, p. 39-46, 2007.

MURPHY, V. E.; CLIFTON, V.L. Alterations in human placental 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 with gestational age and labour. **Placenta**, v. 24, p.739-44, 2003.

NAIR, A. B.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **J. Basic Clin. Pharm.**, v. 7, n. 2, p. 27-31, 2016.

NAKAE, J. et al. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. **J. Clin. Invest.**, v.108, p. 1359–67, 2001.

NEWBERN, D.; FREEMARK, M. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. **Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.**, v. 18, n. 6, p.409-16, 2011.

NIEMAN, L. K., CHANCO TURNER, M. L. Addison's disease. **Clin. Dermatol.**, v. 24, p. 276-80, 2006.

NOVELLI, M. et al. Insufficient adaptive capability of pancreatic endocrine function in dexamethasone-treated ageing rats. **J. Endocrinol.**, v. 162, n. 3, p.425-32, 1999.

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

NYIRENDA, M. J. et al. Glucocorticoid exposure in late gestational permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and cause glucose intolerance in adult offspring. **J. Clin. Invest.**, v. 101, n. 10, p. 2174-81, 1998.

OAKES, N. D. et al. Tesaglitazar, a dual PPAR $\{\alpha\}/\{\gamma\}$  agonist, ameliorates glucose and lipid intolerance in obese Zucker rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 289, n. 4, p. R938-46, 2005.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 3177– 84, 2011.

OLOFSSON, S. O.; STILLEMARCK-BILLTON, P.; ASP, L. Intracellular assembly of VLDL: two major steps in separate cell compartments. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 10, p. 338-45, 2000.

OTTOSSON, M. et al. The effects of cortisol on the regulation of lipoprotein lipase activity in human adipose tissue. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 79, p. 820-5, 1994.

OTWAY, S.; ROBINSON, D. S. The significance of changes in tissue clearing-factor lipase activity in relation to the lipaemia of pregnancy. **Biochem. J.**, v. 106, n. 3, p. 677-82, 1968.

PANTOJA, C.; HUFF, J. T.; YAMAMOTO, K. R. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. **Mol. Biol. Cell**, v. 19, p. 4032-41, 2008.

PASIEKA, A. M.; RAFACHO, A. Impact of Glucocorticoid Excess on Glucose Tolerance: Clinical and Preclinical Evidence. **Metabolites**, v. 6, p. E24, 2016.

PATSOURIS, D. et al. Glucocorticoids and thiazolidinediones interfere with adipocyte-mediated macrophage chemotaxis and recruitment. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 31223-35, 2009.

PECKETT, A. J., WRIGHT, D. C., RIDDELL, M. C. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism**, v. 60, p. 1500-10, 2011.

PICARD, F. et al. Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. **Diabetes**, v. 48, p. 452-9, 1999.

POTTER, J. M.; NESTEL, P. J. The hyperlipidemia of pregnancy in normal and complicated pregnancies. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 133, n. 2, p. 165-70, 1979.

PRINTEN, J.A.; BRADY, M. J.; SALTIEL, A. R. PTG, a protein phosphatase 1-binding protein with a role in glycogen metabolism. **Science**, v. 275, p. 1475-8, 1997.

PUGAZHENTHI, S.; KHANDELWAL, R. L. Regulation of glycogen synthase activation in isolated hepatocytes. **Mol. Cell Biochem.**, v. 149, n. 150, p. 95-101, 1995.

PUNNONEN, R. The relationship between serum oestradiol levels and serum triglyceride, cholesterol and phospholipid levels in normal human pregnancy. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, v. 84, n. 11, p. 838-45, 1977.

RAFACHO, A.; et al. Functional Alterations in Endocrine Pancreas of Rats With Different Degrees of Dexamethasone-Induced Insulin Resistance. **PANCREAS**, v. 36, n. 3, p. 284-93, 2008b.

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

RAFACHO, A. et al. Increased pancreatic islet mass is accompanied by activation of the insulin receptor substrate-2/serine-threonine kinase pathway and augmented cyclin D2 protein levels in insulin-resistant rats. **Int. J. Exp. Path.**, v. 89, p. 264-275, 2008a.

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

RAMIREZ, I.; LLOBERA, M.; HERRERA, E. Circulating triacylglycerols, lipoproteins, and tissue lipoprotein lipase activities in rat mothers and offspring during the perinatal period: effect of postmaturity. **Metabolism**, v. 32, p. 333-41, 1983.

RAMOS, P. et al. Insulin-induced upregulation of lipoprotein lipase messenger ribonucleic acid and activity in mammary gland. **Endocrinology**, v. 140, p.1089-93, 1999.

RAMOS, P. HERRERA, E. Comparative responsiveness to prolonged hyperinsulinemia between adipose-tissue and mammary-gland lipoprotein lipase activities in pregnant rats. **Early Pregnancy: Biol. Med.**, v. 2, p. 29-35. 1996.

RANG, H. P. et al. Rang & Dale. Farmacologia. Tradução de Tatiana Ferreira Robaina et al. 7 ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2011. 768 p., il.

RAVELLI, A. C. et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **Lancet**, v. 351, p.173-7, 1998.

RAY, P. D.; FOSTER, D. O.; LARDY, H. A. Mode of action of glucocorticoids. I. Stimulation of gluconeogenesis independent of

synthesis de novo of enzymes. **J. Biol. Chem.**, v. 239, p. 3396–400, 1964

REINISCH JM. et al. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. **Science**, v. 202, p. 436–8, 1978.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 1711-23, 2005.

ROBINSON, D. S. The clearing factor lipase and its action in the transport of fatty acids between the blood and tissues. **Adv. Lipid. Res.**, v. 1, p. 133-82, 1963.

RYAN, E. A.; ENNS, L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 67, p. 341–7, 1988.

RYLATT, D. B. et al. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Amino acid sequence at the sites phosphorylated by glycogen synthase kinase-3, and extension of the N-terminal sequence containing the site phosphorylated by phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, v.107, p.529–37, 1980.

SAMRA, J. S. et al. Effects of physiological hypercortisolemia on the regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 626–31, 1998.

SANDMAN, C.A.; DAVIS, E.P. Gestational stress influences cognition and behavior. **Future Neurol.**, v. 5, p. 675-90, 2010.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol. Ther.**, v. 96, n. 1, p. 23-43, 2002.

SCHMID, W. et al Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 53, p. 33–5, 1995.

SCHWEIGER, M. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 40236-41, 2006.

SECKL, J. R. et al. Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 59, p. 359-93, 2004.

SHAMS, M. et al. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. **Hum. Reprod.**, v. 13, n. 4, p. 799- 804, 1998.

SHIBLI-RAHHAL, A., VAN BEEK, M., SCHLECHTE, J. A. Cushing's syndrome. **Clin. Dermatol**, v.24, p.260-265, 2006.

SINGH R.R., CUFFE J.S., MORITZ K.M. Short- and long-term effects of exposure to natural and synthetic glucocorticoids during development. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 39, p.979-89, 2012.

SIVAN, E. et al. Effect of insulin on fat metabolism during and after normal pregnancy. **Diabetes**, v. 48, n. 4, p. 834-8, 1999.

SLAVIN, B. G.; ONG, J. M.; KERN, P. A. Hormonal regulation of hormonesensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. **J. Lipid. Res.**, v. 35, p. 1535-41, 1994.

SMITH, I. D.; SHEARMAN, R. P. Fetal plasma steroids in relation to parturition. I. The effect of gestational age upon umbilical plasma corticosteroid levels following vaginal delivery. **J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.**, v. 81, p. 1, p. 11-15, 1974.

SMITH, R. et al. Patterns of plasma corticotropin-releasing hormone, progesterone, estradiol, and estriol change and the onset of human labor. **J. Clin. Endocr. Metab.**, v. 94, p. 2066-74, 2009.

SOMM, E. et al. Early metabolic defects in dexamethasone-exposed and undernourished intrauterine growth restricted rats. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50131, 2012.

SORIA, A. et al. A sucrose-rich diet affects triglyceride metabolism differently in pregnant and nonpregnant rats and has negative effects on fetal growth. **J. Nutr.**, v. 126, p. 2481-6, 1996.

SPOONER, P. M.; GARRISON, M. M.; SCOW, R. O. Regulation of mammary and adipose tissue lipoprotein lipase and blood triacylglycerol in rats during late pregnancy.

Effect of prostaglandins. **J. Clin. Invest.**, v. 60, n. 3, p. 702-8, 1977.

STAELS, B. et al. Variable effects of different corticosteroids on plasma lipids, apolipoproteins, and hepatic apolipoprotein mRNA levels in rats.

**Arterioscler. Thromb.**, v. 11, p. 760–9, 1991.

STALMANS, W.; LALOUX, M. Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism. **Monogr. Endocrinol.**, v. 12, p. 517–33 1979.

STERN, M. P. et al. Adrenocortical steroid f rheumatic diseases. Effects on lipid metabolism. **Arch Intern Med.**, v. 132, p. 97-101, 1972.

STRADER, A. D.; BUNTIN, J. D. Changes in agouti-related peptide during the ring dove breeding cycle in relation to prolactin and parental hyperphagia. **J. Neuroendocrinol.**, v. 15, p. 1046-53, 2003.

STRAKOVSKY, R. S. et al. In utero growth restriction and catch-up adipogenesis after developmental di (2-thylhexyl) phthalate exposure cause glucose intolerance in adult male rats following a high-fat dietary challenge. **J. Nutr. Biochem.**, v. 26, p. 1208-20. 2015.

STRALFORS, P.; BELFRAGE, P. Phosphorylation of hormonesensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 15146–52, 1983.

STRAWFORD, A. et al. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with  $^2\text{H}_2\text{O}$ . **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 286, p. E577–88, 2004.

SUGDEN, M.C. et al. Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 145, n. 4, p. 529-39, 2001.

SUL, H. S.; WANG, D. Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial

glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 18, p. 331–51, 1998.

TANGALAKIS, K. et al. Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. **Exp. Physiol.**, v.77, p. 709–17, 1992.

THOMPSON, B. R.; LOBO, S.; BERNLOHR, D. A. Fatty acid flux in adipocytes: the in's and out's of fat cell lipid trafficking. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 318, p. 24-33, 2010.

TOMLINSON, J. W. et al. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissuespecific regulator of glucocorticoid response. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 5, p. 831–66, 2004.

TRINH, K.Y. et al. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 47, p. 31615-20, 1998.

TRUJILLO, M. L. et al. Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. **Endocrinology**, v. 152, p. 1355–65, 2011.

UNO, H. et al. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. **Horm. Behav.**, v. 28, p.336–348, 1994.

VAN RAALTE, D. H. et al.. Angiopoietin-like protein 4 is differentially regulated by glucocorticoids and insulin in vitro and in vivo in healthy humans. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**, v. 120, n. 10, p. 598–603, 2012.

VANDERBILT, J. N. et al. Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity. **Mol. Endocrinol.**, v. 1. n. 1, p.68–74, 1987.

VANSTAPEL, F.; DOPERE, F.; STALMANS, W. The role of glycogen synthase phosphatase in the glucocorticoid- induced deposition of glycogen in foetal rat liver. **Biochem. J.**, v. 192, p. 607–12, 1980.

VEGIOPOULOS, A., HERZIG, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 275, p. 43–61, 2007.

VERGÈS B. Abnormal hepatic apolipoprotein B metabolism in type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 211, p. 353-60, 2010.

VERGÈS, B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. **Diabetes Metab.**, v. 31, p. 429–39, 2005.

VERGÈS, B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? **Diabetologia**, v. 58, p. 886–99, 2015.

VILLAR, J., et al. Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 167, n. 5, p. 1344-52, 1992.

WALKER, B. R.; ANDREW, R. Tissue production of cortisol by 11 $\beta$ hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1083, p. 165-84, 2006.

WANG, Y. et al. The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue, **J. Nutr.**, v. 134, p. 1032–38, 2004.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p.125-63, 2002.

WEINSTOCK, M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 32, p.1073–86, 2008.

WIEDERER, O.; LOFFLER, G. Hormonal regulation of the differentiation of rat adipocyte precursor cells in primary culture. **J Lipid Res.**, v. 28, p. 649-58, 1987.

WHITE, P. C, MUNE, T.; AGARWAL, A. K. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 1, p.135–156, 1997.

WING, S. S. et al. Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. **Biochem. J.**, v. 307, p. 639–45, 1995.

WILLIAMS, B. H.; BERDANIER, C. D. Effects of diet composition and adrenalectomy on the lipogenic responses of rats to starvation-refeeding. **J. Nutr.**, v. 112, n. 3, p. 534–41, 1982.

WILLIAMS, D. Pregnancy: a stress test for life. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.**, v. 15, p. 465-71, 2003.

XU, J. et al. Direct effect of glucocorticoids on lipolysis in adipocytes, *Mol. Endocrinol.*, v. 23, n. 8, p. 1161–70, 2009.

XU, Z. X.; ROONEY, S. A. Glucocorticoids increase fatty-acid synthase mRNA stability in fetal rat lung. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 5, p. L860-4, 1997.

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

YOSHINO J. et al. Diurnal variation in insulin sensitivity of glucosemetabolism is associated with diurnal variations in whole-body and cellular fatty acid metabolism in metabolically normal women. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, p. E1666–70, 2014.

ZIMMERMANN, R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. **Science**, v. 306, p. 1383-6, 2004.

ZINDER et al. Effect of prolactin on lipoprotein lipase in mammary glands and adipose tissue of rats. **Am. J. Physiol.**, v. 226, n. 3, p. 742-8, 1974.



## ANEXO

## Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo  
PP00782

Título  
MÉTODOLOGIAS UTILIZADAS NO LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO DE DOENÇAS CRÔNICAS – LIDeC / ABORDAGENS ENDÓCRINAS E METABÓLICAS  
Data de Entrada  
07/05/2012

Resultado:  
Aprovado  
Data/Prazo  
01/06/2012

## Considerações

Ofício nº 47/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Alex Rafacho, Departamento de Ciências Fisiológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

Os procedimentos elencados no parecer final estão credenciados para uso no seu laboratório pelo período de quatro anos. Qualquer alteração destes, ou inclusão de novos, deverão ser apreciados pela CEUA-UFSC novamente.

Este credenciamento é válido para a utilização das espécies animais: quinhentos camundongos (*Mus musculus*) e quinhentos ratos (*Rattus Norvegicus*).

Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

Por ocasião do término deste período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estes procedimentos aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)  
Data 05/09/2016

Data 05/06/2012

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE

[Abrir Solicitação](#)

[Criar Relatório](#)