



Sociedade Brasileira de Fisiologia  
SBFis



**Programa de Pós-Graduação Multicêntrico  
em Ciências Fisiológicas**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**CAMILA FRANCIELE DE SOUZA**

**Estudo dos efeitos dos glicocorticoides na homeostase  
energética e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal de ratos  
adultos com obesidade neonatal por supernutrição  
lactacional**

---

Londrina  
2023

CAMILA FRANCCIELE DE SOUZA

**Estudo dos efeitos dos glicocorticoides na homeostase  
energética e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal de ratos  
adultos com obesidade neonatal por supernutrição  
lactacional**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, na Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa

Coorientadora: Prof. Dra. Cássia Thaís B. V. Zaia

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

de Souza, Camila Franciele.

Estudo dos efeitos dos glicocorticoides na homeostase energética e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal de ratos adultos com obesidade neonatal por supernutrição lactacional / Camila Franciele de Souza. - Londrina, 2023.  
135 f. : il.

Orientador: Ernane Torres Uchôa.

Coorientador: Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Redução do tamanho da ninhada - Tese. 2. Glicocorticoide - Tese. 3. Feedback negativo - Tese. 4. Adrenalectomia - Tese. I. Uchôa, Ernane Torres. II. Bussamra Vieira Zaia, Cássia Thaís. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

CDU 612

# CAMILA FRANCIELE DE SOUZA

Estudo dos efeitos dos glicocorticoides na homeostase energética e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal de ratos adultos com obesidade neonatal por supernutrição lactacional

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, na Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

## COMISSÃO EXAMINADORA

---

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Marli C. M. Pinge  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Priscila Casolla  
Universidade Estadual de Londrina -  
UEL

---

Profa. Dra. Lucila L.K. Elias  
Universidade de São Paulo/ Ribeirão  
Preto- USP

Londrina, 13 de fevereiro de 2023.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me amparado sempre, foi uma caminhada longa, e vencemos!

Agradeço ao meu orientador, Prof Dr Ernane, por ser um ser humano tão ímpar! Nem todos os obrigadas seriam suficientes para agradecer todos esses anos de parceria e amizade. Seu carinho, paciência, disponibilidade e confiança em mim foi o que sempre me motivou a continuar, mesmo nos momentos mais difíceis. Eu sempre soube que podia contar com ele e nessa reta final, me faltam palavras pra poder agradecê-lo. Sou muito grata a Deus por ter me abençoado com ele como orientador e ombro amigo. Muito obrigada por tudo. Com certeza, vou levá-lo comigo para toda vida. Obrigada!

À profª Drª Thaïs Zaia, por todo suporte desde o primeiro dia, sempre amável, amiga, preocupada e disponível para tudo! A todo o pessoal do Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo, por sempre estarem dispostos a ajudar e não medir esforços pra conseguirmos alcançar nossos objetivos. Principalmente as meninas: Larissa, Andressa, Gabi, Ana, Rhau e Dani, não tenho palavras para vocês! Vocês são maravilhosas e me fizeram muito mais feliz durante toda essa jornada, dentro e fora do laboratório!

Agradecer imensamente a parceria que realizamos com o Prof. Dr. Fábio Bessa, com a Flaviane e a Ayumi da USP de São Paulo, que prontamente aceitaram a colaborar com esse trabalho, nos proporcionando todo suporte necessário. Muito obrigada, por toda atenção, cuidado e pelo tempo disponibilizado. Ao Prof. Dr. Fábio Goulart do laboratório de análise histopatológica da UEL que sempre se faz presente, colabora e auxilia em nossos projetos! Obrigada!

Aos meus pais e irmã, pois sem eles nada disso seria possível. Obrigada pelo apoio, amor, paciência, e por mesmo às vezes sem entender toda a minha doação nesses anos, estiveram sempre ao meu lado. Aos meu avós e toda minha família, fica aqui meu muito obrigada, por sempre estarem na torcida pelo meu sucesso.

Aos docentes, discentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, agradeço demais por todo auxílio para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo fomento durante o período do doutorado.

“Que a gente nunca perca esse vontade de recomeçar, de dar a volta  
por cima do mundo e por dentro da gente.”

Bibiana Benites

SOUZA, C. F. **Estudo dos efeitos dos glicocorticoides na homeostase energética e eixo hipotálamo-hipófise-adrenal de ratos adultos com obesidade neonatal por supernutrição lactacional**. 135p. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas, Londrina, 2023.

### RESUMO

A supernutrição na lactação é um agente programador do metabolismo energético. A redução do tamanho da ninhada nos primeiros dias de vida resulta no desenvolvimento precoce da obesidade, a obesidade infantil, que persiste até a idade adulta. Além disso, estudos apontam que estes animais também apresentam maiores concentrações de glicocorticoides circulantes. Sabe-se que os roedores obesos são mais sensíveis aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides e menos responsivos ao *feedback* dos glicocorticoides no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Além disso, o metabolismo hepático é prejudicado pela obesidade, sendo o aumento da concentração plasmática dos glicocorticoides apontado como possível mediador para o desenvolvimento da obesidade, uma vez que a adrenalectomia bilateral (ADX) é capaz de reduzir a obesidade em diferentes modelos experimentais. Desse modo, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento prolongado com corticosterona nas respostas metabólicas e no eixo HHA, bem como avaliar os efeitos dos glicocorticoides nas alterações metabólicas, lipogênese hepática e via de sinalização da insulina induzida pela supernutrição na lactação de ratos adultos. Para isso, a partir do dia pós-natal (DPN) 3, os animais foram mantidos em ninhadas normais (NL- 10 filhotes/mãe) ou reduzidas (SL- 3 filhotes/mãe) e os experimentos iniciaram a partir do DPN 60 para ambos os estudos. No estudo 1, do DPN 60 a 88, os ratos adultos NL e SL receberam o tratamento com Corticosterona (15mg/L) (CORT) ou foram tratados apenas com água (Água), compondo os quatro grupos experimentais (NL-Água; NL-CORT; SL-Água e SL-CORT). No estudo 2, no DPN 60, ratos Wistar de ambas as ninhadas foram submetidos à adrenalectomia bilateral (ADX) ou cirurgia fictícia (sham), e metade dos animais ADX recebeu corticosterona (CORT- 25 mg/L) na água de beber.

Os resultados do estudo 1 demonstraram que a obesidade infantil promoveu nos ratos no DPN 88: intolerância à glicose, maior adiposidade e concentração plasmática de triacilgliceróis (TAG), ácidos graxos livres (AGL), colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e corticosterona, além de aumento da expressão de RNAm do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e proopiomelanocortina (POMC) na hipófise, e diminuição da expressão de RNAm do receptor de mineralocorticoide (MR) no PVN. O tratamento com CORT promoveu intolerância à glicose, aumento do peso corporal, ingestão alimentar, colesterol total e LDL plasmáticos nos animais NL, apresentando menores efeitos no grupo SL. No estudo 2 observamos que os animais com obesidade infantil apresentaram maiores concentrações plasmáticas de corticosterona, AGL, colesterol total e colesterol LDL, intolerância a glicose, maior peso e área dos adipócitos do tecido adiposo branco, sem alterações na concentração plasmática de TAG e colesterol HDL. Esses animais também apresentaram maior conteúdo de TAG hepático e expressão da enzima ácido graxo sintase (FASN), porém houve diminuição da expressão de PI3Kp110 no fígado, em comparação aos animais NL. No grupo SL, a ADX diminuiu a concentração plasmática de corticosterona, AGL, TAG e colesterol HDL, atenuou a intolerância à glicose, o peso e área dos adipócitos do tecido adiposo branco, além de reduzir o TAG hepático e a expressão hepática de FASN e IRS2, em comparação aos animais sham. O tratamento com CORT nos animais do grupo SL aumentou a concentração plasmática de TAG e colesterol HDL, bem como o TAG hepático e a expressão hepática de FASN, IRS1 e IRS2, em comparação com animais ADX. Em resumo, a supernutrição lactacional promoveu hiperatividade do eixo HHA e reduziu a responsividade aos efeitos dos glicocorticoides no balanço energético e no *feedback* negativo do eixo HHA em ratos adultos, e a ADX atenuou as alterações plasmáticas e hepáticas induzidas pela obesidade infantil, sendo o tratamento com corticosterona capaz de reverter a maioria dos efeitos induzidos pelo ADX. Logo, os glicocorticoides desempenham importante papel na obesidade induzida pela supernutrição lactacional de ratos adultos, uma vez que tanto a atividade do eixo HHA e sua resposta aos glicocorticoides exógenos está modificada, bem como os glicocorticoides têm efeitos permissivos nas alterações metabólicas observadas nesse modelo de obesidade.

**Palavras-chave:** redução do tamanho da ninhada; receptor de mineralocorticoide; feedback negativo, adrenalectomia, glicocorticoides, triacilgliceróis, obesidade.

SOUZA, C. F. **Study of the effects of glucocorticoids on energy homeostasis and hypothalamus-pituitary-adrenal axis of adult male rats with neonatal obesity by lactation overnutrition.** 135p. Thesis presented to the Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences of Brazilian Society of Physiology at the State University of Londrina as partial requirement to obtain the title of PhD in Physiological Sciences, Londrina, 2023.

### **ABSTRACT**

Lactation overnutrition is a programming agent of energy metabolism. The reduction in litter size in the first days of life results in the early development of obesity, the childhood obesity, which persists into adulthood. In addition, studies indicate that these animals have higher concentrations of circulating glucocorticoids. It is known that obese rodents are more sensitive to the anabolic effects of glucocorticoids and less responsive to glucocorticoid feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and that liver metabolism is impaired by obesity, and increased concentration plasma glucocorticoids are pointed as a possible mediator for the development of obesity, since bilateral adrenalectomy (ADX) can reduce obesity in different experimental models. Thus, this study aimed to evaluate the effects of prolonged treatment with corticosterone on metabolic responses and the HPA axis, as well as to evaluate the effects of glucocorticoids on metabolic changes, liver lipogenesis and the insulin signaling pathway induced by lactation overnutrition of adult male rats. For this, from the postnatal day 3 (PND), animals were reared in small litter (SL - 3 pups/dam) or normal litter (NL - 10 pups/dam) and the experiments were performed from the DPN 60 for both studies. In study 1, from postnatal day (DPN) 60 to 88, NL and SL adult male rats received treatment with Corticosterone (15mg/L) (CORT) or were treated only with water (Water), composing the four experimental groups (NL-Water; NL-CORT; SL-Water and SL-CORT. In study 2, on the DPN 60, male Wistar rats of both litters underwent bilateral adrenalectomy (ADX) or sham surgery (sham), and half of the ADX animals received corticosterone (CORT- 25 mg/L) in the drinking fluid. The results of study 1 showed that childhood obesity promoted in male rats on DPN 88: glucose intolerance, increased adiposity and plasma levels of triglycerides (TG), free fatty acids, total cholesterol and low-density lipoprotein (LDL) and corticosterone, in addition to increased expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and proopiomelanocortin (POMC) in the pituitary

gland, and decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA in the PVN. CORT treatment to NL animals promoted glucose intolerance, increased body weight, food intake, total cholesterol and plasma LDL, with minor effects in the SL group. For study 2, animals with childhood obesity presented enhanced plasma concentrations of corticosterone, free fatty acids, total cholesterol and LDL-cholesterol, glucose intolerance, increased weight and area of white adipose tissues, without changes in plasma TG and HDL-cholesterol. These animals also showed increased content of liver TG and expression of the enzyme fatty acid synthase (FASN), in addition to a decrease in the expression of PI3Kp110 in the liver, compared to the NL animals. In the SL group, ADX decreased plasma concentrations of corticosterone, FFA, TG and HDL-cholesterol, attenuated glucose intolerance, weight and adipocyte area of white adipose tissues, liver TG and liver expression of FASN and IRS2, compared to sham animals. In the SL animals, CORT treatment to ADX animals increased plasma concentrations of TG and HDL-cholesterol, liver TG and expression of FASN, IRS1 and IRS2, in comparison with ADX animals. In summary, lactation overnutrition promoted hyperactivity of the HPA axis and showed responsiveness to the effects of glucocorticoids on energy balance and negative feedback of the HPA axis in adult male rats, and ADX attenuated the plasma and liver alterations induced by childhood obesity, and the treatment with corticosterone was able to reverse most of the effects induced by ADX. Thus, glucocorticoids play an important role in obesity induced by lactational overnutrition in adult male rats, since both the activity of the HPA axis and its response to exogenous glucocorticoids is modified, as well as glucocorticoids have permissive effects on the metabolic changes observed in this model of obesity.

**Key-Words:** litter size reduction, obesity, MR, negative feedback, adrenalectomy, glucocorticoids, triglycerides.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema da síntese de TAG.....21
- Figura 2.** Delineamento do protocolo experimental. NL: ninhada normal; SL: ninhada reduzida; DPN: dia pós natal; ipGTT: teste de tolerância a glicose via intraperitoneal.....33
- Figura 3.** Curva de peso corporal (g) do DPN 3 a 21 (A), curva de peso corporal do DPN 25 a 60 (B), índice de Lee (C) e peso corporal (g) no DPN 60 (D) de ratos de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). O número de animais é mostrado nas barras ou entre parênteses. Os dados foram analisados pelo teste t de Student e ANOVA de medidas repetidas (para curva de peso corporal) e expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05 SL versus NL.....38
- Figura 4.** Ganho de peso corporal do DPN 60 a 88 (g) (A), média da ingestão alimentar diária do DPN 60 a 88 (g/100 g) (B), média da ingestão de fluidos diária do DPN 60 a 88 (g/100 g) (C), pesos do tecido adiposo branco perigonadal (g/100 g) (D) e retroperitoneal (g/100 g) (E) no DPN 88 de ratos de ninhadas normal (NL) e reduzida (SL) tratados com Água ou Corticosterona (CORT: 15 mg/L). O número de animais é mostrado nas barras. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05 Água versus CORT; #p < 0,05 SL versus NL.....39
- Figura 5.** Curva do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT; mg/dL), expressa pela glicemia basal e glicemia após sobrecarga de glicose ip, e área sob a curva (ASC) do ipGTT de 0 a 120 min (mg/dL) no DPN 87 (A), concentrações plasmáticas de triacilgliceróis (mg/dL) (B), ácidos graxos livres ( $\mu$ moles/dL) (C), colesterol total (mg/dL) (D), colesterol HDL (mg/dL) (E) e colesterol LDL (mg /dL) (F) de ratos de ninhada normal (NL) e reduzida (SL), tratados com Água ou

Corticosterona (CORT: 15 mg/L) no DPN 88. O número de animais de cada grupo é mostrado no barras ou entre parênteses. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*p < 0,05 Água versus CORT; #p < 0,05 SL versus NL.....41

**Figura 6.** Expressão relativa do RNAm do receptor de glicocorticoide (GR) e do receptor de mineralocorticoide (MR) no hipocampo (A e B), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (C e D) e da hipófise (E e F), bem como do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no PVN (G) e proopiomelanocortina (POMC) na hipófise (H) de ratos adultos (DPN 88) de ninhada normal (NL) e reduzida (SL) – (Água). O grupo NL foi usado como calibrador para avaliar o efeito do tamanho da ninhada (NL e SL) na expressão do RNAm. O número de animais é mostrado nas barras. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM para o teste t de Student e mediana (1º e 3º intervalos interquartis) para o teste de Mann-Whitney para a expressão do gene MR. #p < 0,05 SL versus NL.....43

**Figura 7.** Fotomicrografias representativas (ampliação de 40 $\times$ ) das glândulas adrenais, coradas com hematoxilina-eosina, dos grupos NL e SL, Água ou Corticosterona (CORT: 15 mg/L) no DPN 88. (A): NL- Água; (B): NL- CORT; (C): SL-Água;(D): SL-CORT; C: Córtex; FZ: zona fasciculada; RZ: zona reticulada; M: Medula. Barra de escala = 100  $\mu$ m. Peso das adrenais (g/100g) (E), concentração plasmática de corticosterona ( $\mu$ g/dL) (F), espessura do córtex adrenal ( $\mu$ m) (G) e zonas fasciculadas + reticuladas ( $\mu$ m) (H), medula adrenal (I) de ratos de ninhada normal (NL) e reduzida (SL) dos grupos Água ou Corticosterona (CORT: 15 mg/L) no DPN 88. O número de animais é mostrado nas barras. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05 Água versus CORT; #p < 0,05 SL versus NL.....45

**Figura 8.** Expressão relativa de RNAm do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (A e B) e proopiomelanocortina (POMC) na hipófise (C e D) de ratos de ninhada normal (NL) e ninhada reduzida (SL), dos grupos Água ou Corticosterona (CORT 15 mg/L) no DPN 88. O respectivo grupo Água foi usado como calibrador para avaliar o efeito do tratamento (Água ou CORT) na expressão do RNAm em cada ninhada (NL e SL). O número de animais de cada grupo é mostrado nas barras. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM para o teste t de Student e mediana (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis) para o teste de Mann-Whitney. \*p < 0,05 Água versus CORT.....46

**Figura 9.** Delineamento do protocolo experimental. NL: ninhada normal; SL: ninhada reduzida; DPN: dia pós natal; ipGTT: teste de tolerância a glicose via intraperitoneal.....59

**Figura 10.** Ganho de peso corporal do DPN 60 a 74 (A), índice de Lee (g <sup>1/3</sup> /cm) (B) em DPN 74, média da ingestão alimentar diária (g/100g) (C) e média da ingestão de fluido diária (mL/100g) do DPN 60 a 74 (D) de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL): sham; ADX; ADX+B. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo teste pós- teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05; #p < 0,05 SL versus NL; B= corticosterona (n = 13).....64

**Figura 11.** Glicose plasmática - ipGTT (mg/dL) (DPN 73) (A), área sobre a curva (ASC) da Glicose plasmática - ipGTT 0-120 min (mg/dL) (DPN 73) (B), concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (AGL) ( $\mu$ moles/dL) (C), triacilgliceróis (mg/dL) (D), colesterol total (mg/dL) (E), colesterol HDL (mg/dL) (F), colesterol LDL (mg/dL) (G) e corticosterona plasmática ( $\mu$ g/dL) (H) de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL) no DPN 74: sham; ADX; ADX+B. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05 versus respectivo

grupo sham; #p < 0,05 SL versus NL; +p < 0.05 versus respectivo grupo ADX+B. B= corticosterona (n = 13).....66

**Figura 12.** Peso do tecido adiposo epididimal (g/100g) (A), peso do tecido adiposo retroperitoneal (g/100g) (B), área dos adipócitos do tecido adiposo epididimal ( $\mu\text{m}^2$ ) (C), área dos adipócitos do tecido adiposo retroperitoneal ( $\mu\text{m}^2$ ) (D), fotomicrografias representativas (ampliação de 100 $\times$ ) do tecido adiposo epididimal (E), e do tecido adiposo retroperitoneal (F) coradas com hematoxilina-eosina, de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL): sham; ADX; ADX+B. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo teste pós- teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05; #p < 0,05 SL versus NL; B= corticosterona (n = 13).....68

**Figura 13.** Expressão hepática do receptor de insulina (IR) (A), substrato do receptor de insulina (IRS) 1(B), substrato do receptor de insulina (IRS) 2 (C), PI3Kp110 (D),  $\text{Ser}^{473}\text{pAKT/AKT}$  (E) e GLUT2 (F) de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL) no DPN 74: sham; ADX; ADX+B. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05; #p < 0,05 SL versus NL; B= corticosterona (n = 13).....70

**Figura 14.** Triglicérides hepáticos (mg/mg de fígado) (A), expressão hepática da enzima ácido graxo sintase (FASN) (B), acetil-CoA carboxilase (p-ACC/ACC) (C), diacilglicerol aciltransferase (DGAT) 2 (D), Apo B100 (E) e 11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase 1 (11 $\beta$ -HSD1) (F) de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL) no DPN 74: sham; ADX; ADX+B. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05; #p < 0,05 SL versus NL; B= corticosterona (n=13) .....72

**Tabela 1.** Anticorpos primários usados no *Western blotting*.....62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 $\beta$ -HSD1	11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 1
11 $\beta$ -HSD2	11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADX	Adrenalectomia
ACC	Acil-CoA Carboxilase
AGL	Ácidos graxos livres
AGPAT	1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
ASC	Área sobre a curva
B	Corticosterona
C	Córtex adrenal
CNA	Comprimento nasoanal
CORT	Corticosterona
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DNL	Lipogênese <i>de novo</i>
DPN	Dia pós natal
EPM	Erro padrão da média
FASN	Enzima ácido graxo sintase
G-3-P	Glicerol 3 fosfato
GR	Receptores de glicocorticoides
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HHA	Hipotálamo Hipofise Adrenal
ipGTT	Teste de tolerância à glicose via intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPA	Ácido lisofosfatídico
M	Medula adrenal
MR	Receptores de mineralocorticoides
NL	Ninhada normal
PA	Ácido fosfatídico
PCR	Reação em cadeia de polimerase

POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
SHAM	Cirurgia fictícia
SL	Ninhada reduzida
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilgliceróis
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VLDL	Lipoproteínas de colesterol de baixa densidade
ZF	Zona fasciculada
ZR	Zona reticulada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
2.1	Objetivos Gerais.....	27
2.2	Objetivos específicos.....	27
<b>3</b>	<b>ESTUDOS</b> .....	28
3.1	Estudo 1. A supernutrição lactacional reduz a responsividade ao tratamento prolongado com corticosterona na homeostase energética e no eixo hipotálamo- hipófise-adrenal em ratos adultos.....	28
3.1.1	INTRODUÇÃO.....	29
3.1.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1.2.1	Animais Experimentais.....	31
3.1.2.2	Protocolo experimental.....	32
3.1.2.3	Avaliação da ingestão alimentar, ingestão de fluido e índice de Lee.....	33
3.1.2.4	Teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipGTT).....	33
3.1.2.5	Eutanásia.....	34
3.1.2.6	Dosagens plasmáticas.....	34
3.1.2.7	Análise histomorfométrica das adrenais.....	35
3.1.2.8	Microdissecção, isolamento do RNA total e PCR em tempo real semi-quantitativa do cérebro e hipófise.....	35
3.1.2.9	Análise estatística.....	36
3.1.3	RESULTADOS.....	37
3.1.4	DISCUSSÃO.....	47
3.2	Estudo 2. Os glicocorticoides contribuem para as alterações metabólicas e hepáticas induzidas pela supernutrição lactacional em ratos adultos.....	52
3.2.1	INTRODUÇÃO.....	53
3.2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
3.2.2.1	Animais Experimentais.....	56
3.2.2.2	Procedimentos cirúrgicos: adrenalectomia ou cirurgia fictícia (sham).....	57
3.2.2.3	Protocolo experimental.....	57

3.2.2.4	Avaliação da Ingestão Alimentar, ingestão de fluido e índice de Lee...	59
3.2.2.5	Teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipGTT).....	59
3.2.2.6	Eutanásia.....	60
3.2.2.7	Dosagens plasmáticas.....	60
3.2.2.8	Análise histomorfométrica do tecido adiposo.....	60
3.2.2.9	Análise do conteúdo de TAG no fígado.....	61
3.2.2.10	Análise da expressão de proteínas do fígado por Western-Blotting...	61
3.2.2.11	Análise estatística.....	62
3.2.3	<b>RESULTADOS</b> .....	63
3.2.4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>4.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>78</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>ANEXOS</b>	
6.1	ANEXO A - Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL.....	108
6.2	ANEXO B – Artigo referente ao Estudo 1: “Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats”. <i>Life Sciences</i> . 2022 Sep 1;304:120721. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120721.....	109
6.3	ANEXO C - Artigo referente à parte do Estudo 2: “Glucocorticoids contribute to metabolic and liver impairments induced by lactation overnutrition in male adult rats” submetido para a revista <i>Frontiers in Phisyology</i> .....	110

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

A obesidade possui características multifatoriais, demonstrando apresentar interação entre os fatores ambientais e genéticos (Friedman, 2003; Keith et al. 2006). Alguns estudos correlacionam o ambiente no qual o indivíduo está inserido, bem como a carga genética, como agentes relevantes para a tendência à obesidade (Frayling et al. 2007). Dessa forma, notamos que o estilo de vida, o ambiente externo, a alimentação e o exercício físico podem tanto influenciar na saúde bem como no risco de doenças na vida adulta (Barker e Osmond 1986; Gluckman e Hanson, 2004; Moura & Passos, 2005; Habbout et al., 2013). Segundo o conceito “Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença” do inglês DOHaD, o período fetal e/ou pós-natal são períodos críticos do desenvolvimento, visto que podem ser modificados por diversos fatores, uma vez que o sistema ainda permanece plástico e sensível às alterações do ambiente, podendo promover repercussões importantes na vida adulta do indivíduo (Barker, 1998; Plagemann, 2006; Jazwiec e Sloboda, 2019).

Analisando os fatores que podem levar a alterações importantes na vida adulta, nos deparamos com a nutrição como elemento chave para o desenvolvimento do processo saúde e/ou doença. Tanto a sub como a superalimentação, seja materna ou pós-natal, são situações que alteram a homeostase energética a longo prazo devido à imaturidade das conexões hipotalâmicas no período neonatal (Plagemann, 2006; McMillen e Robinson., 2005). Em roedores, a nutrição pós-natal pode ser modificada pelo método de manipulação do tamanho da ninhada (Plagemann, 2006). Neste sentido, o método de redução da ninhada tem sido amplamente utilizado como ferramenta para se observar os efeitos da superalimentação precoce a longo prazo (Spencer, 2013). De acordo com dados bem estabelecidos da literatura, os animais provenientes de ninhadas menores que o habitual, com 3 ou 4 filhotes/mãe, em comparação ao controle, com aproximadamente 10 a 12 filhotes/mãe são induzidos à superalimentação pelo aumento da ingestão de leite (Babicky et al., 1973), proporcionando o desenvolvimento precoce da obesidade, a obesidade infantil (Bassett & Craig, 1988), que persiste até a idade adulta. Estudos com animais provenientes de ninhadas reduzidas demonstraram que,

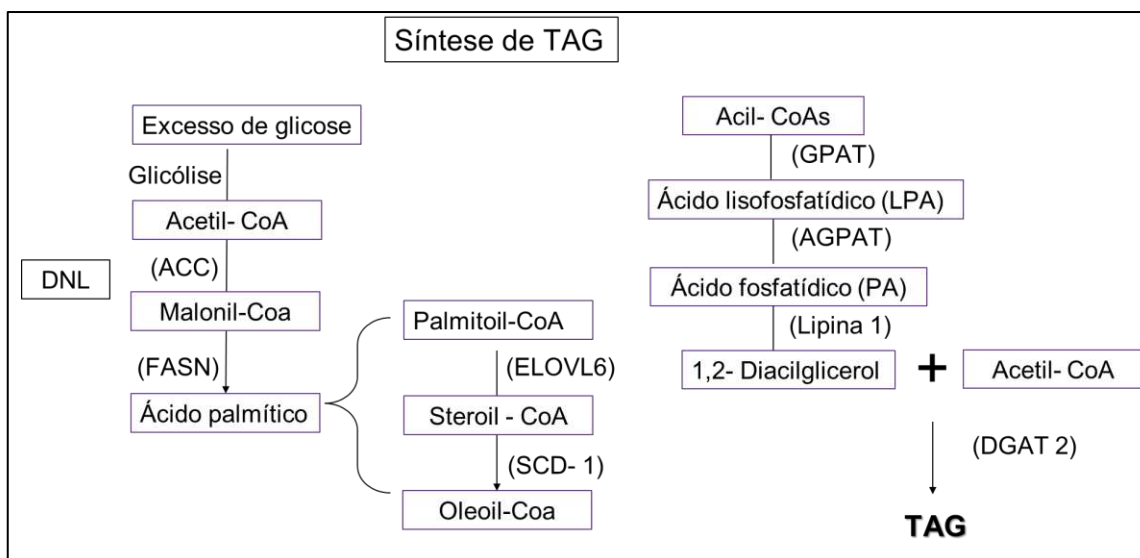
no período pós-desmame, com a introdução de dietas iguais a ambas ninhadas, o fenótipo de sobrepeso ainda permaneceu nos animais de ninhada reduzida quando adultos (McCance, 1962; Plagemann, 2006; Spencer and Tilbrook, 2009), reforçando a hipótese de que a ingestão alimentar durante o período neonatal é um fator relevante para o desenvolvimento da obesidade na idade adulta (Fiorotto et al., 1991). Porém, dados a respeito da hiperfagia ou não nesse modelo animal são contraditórios. Alguns autores relatam que a presença da hiperfagia nesses animais seja devido ao maior tamanho dos animais (Rodrigues et al., 2007; Lopez et al., 2007; Rodrigues et al., 2009) ou por um curto período de tempo (Lopez et al., 2007), enquanto outros não observaram de forma consistente a hiperfagia ou ainda não apresentaram diferenças em relação aos controles (Spencer and Tilbrook, 2009; Xiao e al., 2007). Dessa forma é sugestivo que a manutenção do sobrepeso nos animais com obesidade infantil possa ser devido a alterações no metabolismo, como por exemplo no gasto energético (Stefanidis & Spencer, 2012).

Além de possíveis alterações observadas no gasto energético, animais com obesidade induzida pela redução da ninhada desenvolvem na vida adulta desordens metabólicas, incluindo a obesidade, disfunções hepáticas como a esteatose hepática, resistência à insulina e intolerância à glicose (Ramon-Krauel et al., 2018; Pentinat et al., 2010). Sabe-se que a obesidade é um importante problema de saúde pública, pois com o seu desenvolvimento, outras comorbidades tendem a aparecer e vir a prejudicar ainda mais a saúde do indivíduo. De acordo com a literatura, aproximadamente 90% da população com obesidade, 60% dos pacientes com diabetes tipo 2 e 50% dos que possuem dislipidemia estão propensos a possuir a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Godoy- Matos et al., 2020; Younossi et al., 2021; Ristic-Medic et al., 2021). A DHGNA é caracterizada pelo acúmulo de gordura no parênquima do fígado, maior que 5%, em pessoas que não fazem uso de álcool ou possuem causas secundárias de esteatose hepática (Benedict & Zhang, 2017). Essa doença é marcada pela injúria hepatocelular e inflamação, tendendo a fibrose hepática (Cotter et al., 2020; Hadizadeh et al., 2017). O fígado utiliza ácidos graxos livres (AGL) e glicose como substratos primários, porém o excesso dessas substâncias gera o acúmulo de produtos lipídicos tóxicos, os quais

promovem o aumento do estresse oxidativo e inflamação nos hepatócitos, levando à injúria hepática (Mota et al., 2016; Rosqvist et al., 2019). A fisiopatologia da DHGNA compreende múltiplos fatores genéticos e ambientais. Dessa forma podemos apontar as modificações epigenéticas, polimorfismos específicos, fatores relacionados à dieta e estilo de vida, distúrbios hormonais, resistência à insulina, estresse oxidativo e a obesidade como fatores relevantes para a incidência da DHGNA (Polyzos et al., 2019). Associamos a obesidade com a DHGNA uma vez que, a capacidade de expansão dos adipócitos é limitada, sendo assim o excesso de lipídeos é armazenado em depósitos ectópicos, como o músculo e o fígado, sendo nos hepatócitos principalmente na forma de triacilgliceróis (TAG) (Godoy-Matos et al., 2020).

As fontes de AGL que formam o TAG hepático não são apenas da dieta (cerca de 15%), mas do aumento da lipólise de TAG no tecido adiposo (aproximadamente 60%) e da lipogênese *de novo* (DNL) no fígado (25%), a qual ocorre quando há um excesso de glicose e frutose, advinda de uma dieta repleta de açúcares (Donnelly et al., 2005). A DNL é uma via metabólica que sintetiza ácidos graxos saturados e monoinsaturados a partir do excesso de moléculas de acetil-CoA, proveniente da glicose durante a glicólise, sendo responsável por apenas 5% dos ácidos graxos presentes no fígado e na lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) de humanos magros e saudáveis (Diraison et al., 2003; Faix et al., 1993). Porém, ao observarmos o que acontece na DHGNA, notamos que 25% dos TAG no VLDL são provenientes da DNL (Kohjima et al., 2007; Softic et al., 2018). Mais estudos têm sido realizados em relação às enzimas que catalisam a DNL, como por exemplo a acetil-CoA carboxilase (ACC), responsável pela síntese de malonil-CoA a partir de Acetil-CoA. Segundo alguns autores, a inibição da ACC proporciona importante redução da esteatose hepática em roedores e humanos, juntamente com o aumento dos TAG plasmáticos (Goedeke et al., 2018; Alkhouri et al., 2020). Além da ACC, outra enzima chave para a DNL é a enzima ácido graxo sintase (FASN), responsável por sintetizar palmitato a partir de acetil-CoA e malonil-CoA (Wu et al., 2011; Singh et al., 2023). Assim, a DNL consiste em: converter a glicose em acetil-CoA por meio da glicólise, e o acetil-CoA é então convertido em malonil-CoA pela ACC. A FASN catalisa a formação de ácido palmítico a partir de malonil-CoA e

acetil-CoA. O ácido palmítico, por sua vez, é alongado e dessaturado para gerar ácidos graxos monoinsaturados, os principais constituintes dos TAG. Os acil-CoAs são esterificados por glicerol-3-fosfato (G-3-P) aciltransferase (GPAT) para formar o ácido lisofosfatídico (LPA) e por 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT) para formar ácido fosfatídico (PA). O PA é desfosforilado pela lipina 1 para formar diacilglicerol (DAG), que é esterificado a outra molécula de acil-CoA para formar TAG pela acil-CoA diacilglicerol aciltransferase (DGAT), a qual é especialmente importante para a produção de VLDL (Wurie et al., 2012; Heeren & Scheja, 2021) (Fig. 1).



**Fig.1.** Esquema da síntese de triglicérides. TAG: triglicérides; DNL: lipogênese *de novo*; ACC: acetil-CoA-Carboxilase; FASN: ácido graxo sintase; GPAT: glicerol-3-fosfato aciltransferase; AGPAT: 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase; DGAT2: acil-CoA diacilglicerol aciltransferase 2.

Observou-se que durante estados catabólicos, os AGL liberados pela lipólise são provenientes dos adipócitos do tecido adiposo branco, sendo esses AGL a principal fonte para a síntese de VLDL no fígado (Donnelly et al., 2005). Uma vez que haja uma grande liberação de AGL do tecido adiposo branco, pode ocorrer a esteatose hepática, já que a capacidade da via secretora de VLDL é saturável (Lytle et al., 2019; Jiang et al., 2016). Assim, o quadro de obesidade promove nos adipócitos hipertróficos uma elevada lipólise e o inadequado armazenamento dos AGL, estabelecendo, portanto, a conexão obesidade e DHGNA (Verboven et al., 2018; Yang et al., 2012).

Assim, o fator de risco mais significativa para a DHGNA é a obesidade (Polyzos et al., 2019). Estudos observaram que tanto a supernutrição materna (Zhang et al., 2005; Bruce et al., 2009) como durante a infância (Koletzko & Shamir, 2011; Sayer et al., 2004) podem aumentar o risco do desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades, bem como a DHGNA na vida adulta. Com isso, podemos apontar a DHGNA como uma complicação de difícil manejo, já que não há tratamento efetivo para essa doença, a não ser a proeminente perda de peso (Kawano e Cohen, 2013).

Interessantemente, no modelo de obesidade infantil por programação neonatal, além de alterações metabólicas, os animais adultos de ninhadas reduzidas também apresentam alterações relacionadas ao eixo hipotálamo hipófise adrenal (HHA), como maiores concentrações de glicocorticoides circulantes, bem como aceleração da maturação funcional do eixo HHA, o qual permanece hiperativo durante a idade adulta, quando comparados aos animais controles, porém menos sensível ao *feedback* negativo dos glicocorticoides (Boullu-Ciocca et al., 2005; Hou et al., 2011). Boullu Ciocca et al. (2008) observou que ratos adultos com obesidade infantil apresentavam aumento de corticosterona tanto em condições basais bem como após a indução de estresse (Velkoska et al., 2005). Corroborando esse achado, outros estudos também demonstraram que a taxa de produção total diária de cortisol encontra-se aumentada na obesidade e síndrome metabólica (Stewart et al., 1999; Vicennati et al., 2000). Essa afirmativa vai ao encontro com dados que mostram que o eixo HHA na obesidade se torna hiper-responsivo frente a estímulos (Asensio et al., 2004; Stewart et al., 1999).

O desenvolvimento da obesidade e síndrome metabólica na vida adulta, de acordo com estudos experimentais utilizando modelos animais, está associado com o ambiente nutricional precocemente experimentado por eles (Glavas et al., 2010; Ojha et al., 2013; Patel and Srinivasan, 2011), sendo os glicocorticoides possíveis mediadores da programação permanente, tanto da obesidade quanto da resistência à insulina e outras desordens metabólicas (Lindsay et al., 1996; Lesage et al., 2004; Khulan and Drake, 2012). Dessa forma, o papel da insulina na manutenção da homeostase da glicose e do crescimento e diferenciação celular é essencial e alvo de muitos estudos. A insulina é

secretada pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento das concentrações plasmáticas de glicose e aminoácidos após as refeições. A regulação da homeostase da glicose pela insulina é realizada em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise e por aumentar a captação de glicose nos músculos e tecido adiposo. Além disso, estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos, bem como reduz a lipólise e aumenta a síntese e inibe a degradação proteica (Titchenell et al., 2017). Para isso, a insulina se liga ao seu receptor, o receptor de insulina (IR) na membrana, que é uma tirosina quinase que se autofosforila na superfície interna da célula após a ligação da insulina e, assim, ativa sua atividade tirosina quinase, resultando na fosforilação de proteínas substratos do receptor de insulina (IRS) em resíduos de tirosina, que podem ativar a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). PI3K é um dímero composto por uma subunidade catalítica (p110) e outra regulatória (p85), e as proteínas-alvo de PI3K são a Akt e a proteína quinase C (Lietzke et al., 200; Czech e Corvera, 1999). Estudos sugerem que os glicocorticoides induzem ao aumento da resistência à insulina, sendo esse um fator importante para o prejuízo na tolerância a glicose e para a síndrome metabólica (Van Cauter et al. 1991).

Alguns autores apontam os glicocorticoides como componentes primordiais para a fisiopatologia da obesidade abdominal e suas comorbidades, visto que o excesso de glicocorticoide, aliado ao hiperinsulinismo, propicia o aumento da lipogênese, diminuição da lipólise e estimulação da gliconeogênese hepática (Metges, 2009; Boullu-Cioca et al., 2005). Os glicocorticoides têm muitas funções nos tecidos periféricos, possuindo papéis-chave na gliconeogênese hepática e lipogênese através ativação dos receptores de glicocorticoides (Bamberger, et al. 1996; Friedman, et al. 1993). O cortisol promove o aumento da gliconeogênese hepática, inibe a captação de glicose nos músculos e aumenta a circulação de AGL devido ao aumento da lipólise (Geer et al., 2014).

Os glicocorticoides são secretados pelas glândulas adrenais, órgão final da cascata do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), sendo regulados pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH), produzido pelo núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) e pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), sintetizado e secretado pela hipófise anterior (Herman et al. 1996). O

CRH produzido pelo PVN estimula a transcrição do gene da proopiomelanocortina (POMC) na hipófise anterior, e sua posterior tradução e clivagem para a produção de ACTH, o qual atuará no córtex da glândula adrenal para promover a síntese e liberação dos hormônios esteroides adrenais (Herman et al. 1996; Dallman et al., 1992; Dinneen et al., 1993; Keller-Wood & Dallman, 1984). A cascata de produção dos glicocorticoides é finamente regulada por meio do *feedback* negativo, sendo este mecanismo o responsável pela capacidade dos glicocorticoides em reduzir a síntese e liberação de CRH e ACTH (Diorio et al., 1993; Matthews, 2002; Kapoor et al., 2006).

Reforçando o conceito de que os glicocorticoides medeiam o desenvolvimento da obesidade, estudos observaram que camundongos e ratos obesos apresentavam maior sensibilidade aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides, demonstrando promover o aumento da ingestão alimentar, ganho de peso corporal, depósito de tecido adiposo branco e redução da atividade do tecido adiposo marrom (Tokuyama & Himms-Hagen, 1987, 1989; Freedman et al., 1986). O impacto da ação dos glicocorticoides depende de diversos fatores, dentre eles da expressão de genes que codificam os receptores de glicocorticoides (GR) e de mineralocorticoides (MR). O RNAm para o GR está presente principalmente no hipocampo, hipotálamo e hipófise a partir do dia gestacional 13, ocorrendo aumento próximo à data de nascimento. Já o MR ainda não se encontra presente no hipocampo até o dia gestacional 16-17 (Diaz et al., 1998; Kretz, et al. 2001). O hipocampo é um dos locais extra-hipotalâmicos que controlam a atividade do eixo HHA (Jacobson e Sapolsky, 1991; Feldman e Weidenfeld, 1998). Os GR, membros da superfamília de receptores nucleares, estão amplamente distribuídos no cérebro e nos tecidos periféricos e medeiam os efeitos fisiológicos dos glicocorticoides (Oakley & Cidlowski, 2011). Sabe-se que os MR são altamente ocupados pelos glicocorticoides mesmo em baixas concentrações, e o aumento das concentrações de glicocorticoides recruta os GR (Beaumont et al., 1983; Westlund et al., 1985; Sherman et al., 1985). Assim, é lógico pensar que a corticosterona controle a ocupação do MR e o nível de ACTH durante o ritmo diurno em roedores, e que a ocupação dos GR ocorra no pico do ritmo circadiano nesses animais, uma vez que estes possuem ritmo circadiano do eixo HHA invertido em relação ao de humanos (Dallman et al., 1987, 1989; Reul et al., 1987; Ratka et al., 1989). O acesso aos receptores de

glicocorticoides, GR e MR, é determinado pela presença de isoformas da 11- $\beta$  hidroxisteroide desidrogenase (11- $\beta$ HSD) específicas do tecido que catalisam a inter conversão de cortisol/corticosterona (ativo) e cortisona (inerte). Existem pelo menos duas isoformas: 11 $\beta$ -HSD1, que é uma enzima bidirecional que atua predominantemente como redutase (ativando a cortisona em cortisol); e 11 $\beta$ -HSD2, uma desidrogenase de alta afinidade, cujo principal efeito é inativar os glicocorticoides (Stewart e Krozowski, 1999). A maior expressão de RNAm para GR e da 11 $\beta$ -HSD1 no tecido adiposo branco demonstra maior habilidade da ligação dos glicocorticoides aos seus receptores e dessa forma está associado com o desenvolvimento da obesidade em humanos (Lee et al., 2011). Em roedores, a expressão aumentada de 11 $\beta$ -HSD1 no tecido adiposo branco resultou em obesidade visceral em ratos alimentados com dietas hiper lipídicas (Kershaw et al., 2005), enquanto que a maior expressão da 11 $\beta$ -HSD2 os protegeu da indução de obesidade por dietas ricas em lipídeos (Masuzaki et al., 2001). Além disso, a ação dos glicocorticoides no fígado também pode ser regulada pela 11 $\beta$ -HSD1, de modo que a inibição hepática da atividade da 11 $\beta$ -HSD1 é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina por reduzir a produção hepática de glicose. Além disso, a atividade da 11 $\beta$ -HSD1 no fígado de animais com supernutrição neonatal é controversa, sendo que ela pode estar diminuída (Stewart et al., 1999; Rask et al., 2001), inalterada (Morton et al., 2004) ou aumentada (Drake et al., 2005; Hou et al., 2011).

Uma vez que os glicocorticoides são possíveis mediadores da obesidade e síndrome metabólica, e atuam no processo de lipogênese favorecendo a via da DNL, por atuar em enzimas chaves (Wang et al., 2004; Lee et al., 2011), pode-se sugerir que seu excesso é capaz de favorecer a DHGNA, visto que ela é uma manifestação hepática da síndrome metabólica e um fator de risco para diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e hipertensão (Adams et al., 2009). Os glicocorticoides, como a corticosterona e o cortisol, são hormônios esteroides cuja elevação crônica é frequentemente associada com a síndrome metabólica, obesidade visceral, e diabetes tipo 2 (Nieman et al., 1985; Rizza et al., 1982). Os glicocorticoides podem regular a diferenciação, função e distribuição do tecido adiposo, promovendo quando em excesso, a obesidade visceral associada à inflamação e diversas desordens metabólicas, como observado na síndrome de Cushing (Symonds et al., 2009) ou em ratos tratados com glicocorticoide

exógeno (Rodrigues et al., 2009). Segundo estudos de Solomon e Mayer (1973), a adrenalectomia bilateral (ADX) promove a normalização do ganho de peso corporal e da ingestão alimentar em animais obesos. Esse achado foi corroborado por outros autores que também observaram que a ADX em animais obesos geneticamente modificados, ou obesos devido a lesões hipotalâmicas, preveniu a hiperfagia, diminuiu o ganho de peso corporal, a insulina plasmática e o tecido adiposo branco (Yukimura et al., 1978; King et al., 1983; Freedman et al., 1986), sendo que a reposição crônica de glicocorticoides aos ratos ADX reverte alguns dos efeitos do ADX, como por exemplo a menor concentração plasmática de insulina, glicose e diminuição dos adipócitos (Yukimura et al., 1978; Freedman et al., 1986; Shimomura et al., 1987); a redução do ganho de peso corporal (Naeser, 1973; Stern et al., 1983) e ingestão alimentar (Castonguay et al., 1986). Estudos observaram ainda que a administração de cortisona em diferentes espécies levou ao aumento do perfil lipídico (Adlersberg et al., 1950; Hill et al., 1965; Wang et al., 1955), sendo que a ADX também foi capaz de reverter esse quadro (Dury, 1959; Powers & DiLuzio., 1958).

Assim, está estabelecido que o método de programação neonatal por supernutrição lactacional é um modelo eficaz de desenvolvimento de obesidade, o qual apresenta como característica importante o aumento da concentração de glicocorticoides plasmáticos, alterações no eixo HHA e prejuízos nas suas funções metabólicas e hepáticas. Além disso, sabe-se que os glicocorticoides são apontados como possíveis mediadores para o desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades em diferentes modelos experimentais, de modo que a ADX reverte vários dos efeitos metabólicos em diferentes modelos de obesidade. Portanto, este estudo levantou a hipótese que a obesidade infantil poderia potencializar as respostas metabólicas dos glicocorticoides, bem como alterar seus efeitos no *feedback* negativo do eixo HHA na vida adulta, e que a ADX na vida adulta poderia reverter os efeitos metabólicos observados em animais com obesidade precoce.

Para a investigação desta hipótese, o presente trabalho avaliou os efeitos do tratamento prolongado com corticosterona na homeostase energética e no eixo HHA de machos adultos com obesidade infantil, bem como os efeitos da

ADX sobre parâmetros biométricos, perfil lipídico plasmático, metabolismo lipídico e via de sinalização da insulina no fígado em animais machos adultos com obesidade precoce.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais:**

Avaliar os efeitos do tratamento prolongado com corticosterona e da adrenalectomia na vida adulta nas respostas induzidas pela obesidade infantil na homeostase energética, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, metabolismo lipídico e vias de sinalização da insulina hepáticos.

### **2.2 Objetivos específicos:**

Avaliar os efeitos do tratamento prolongado com corticosterona em ratos de *ninhada normal* (NL) e *reduzida* (SL), nos seguintes parâmetros:

1. Parâmetros biométricos: ingestão alimentar, ingestão de fluido, ganho de peso corporal, peso de tecido adiposo branco visceral, Índice de Lee;
2. Parâmetros metabólicos plasmáticos (AGL, TAG, colesterol total, colesterol HDL e LDL);
3. Tolerância à glicose;
4. Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal: expressão do RNAm de CRH no PVN, POMC na hipófise, GR e MR no PVN, hipófise e hipocampo., análise histomorfométrica das adrenais e corticosterona plasmática.

Avaliar os efeitos da adrenalectomia em ratos de *ninhada normal* (NL) e *reduzida* (SL), nos seguintes parâmetros:

1. Parâmetros biométricos: ingestão alimentar, ingestão de fluido, ganho de peso corporal, peso de tecido adiposo branco visceral, Índice de Lee;
2. Parâmetros metabólicos plasmáticos (corticosterona, AGL, TAG, colesterol total, colesterol HDL e LDL);
3. Análise histomorfométrica de tecido adiposo branco;
4. Tolerância à glicose;
5. Via lipogênica e de sinalização da insulina no fígado.

Esta tese foi dividida em 2 estudos que serão descritos na forma de artigo científico.

**Estudo 1:** A supernutrição lactacional reduz a responsividade ao tratamento prolongado com corticosterona na homeostase energética e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos adultos.

**Estudo 2:** Os glicocorticoides contribuem para as alterações metabólicas e hepáticas induzidas pela supernutrição lactacional em ratos adultos.

### 3. ESTUDOS

#### 3.1 Estudo 1. A supernutrição lactacional reduz a responsividade ao tratamento prolongado com corticosterona na homeostase energética e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos adultos.

Os resultados deste estudo estão publicados no artigo “**Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats**”. *Life Sciences*. 2022 Sep 1;304:120721. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120721, disponível no anexo B.

#### RESUMO

A redução do tamanho da ninhada nos primeiros dias de vida resulta no aumento do peso corporal e adiposidade, além dos animais apresentarem maiores concentrações de glicocorticoides circulantes na vida adulta. Sabe-se que os roedores obesos são mais sensíveis aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides e menos responsivos ao *feedback* dos glicocorticoides no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento prolongado com corticosterona nas respostas metabólicas e no eixo HHA de ratos adultos com obesidade infantil. Para isso, do dia pós-natal (DPN) 60 a 88, ratos adultos de ninhadas normais (NL- 10 filhotes/mãe) e reduzidas (SL- 3 filhotes/mãe) receberam o tratamento com Corticosterona

(15mg/L) (CORT) ou foram tratados apenas com água (Água), compondo os quatro grupos experimentais (NL-Água; NL-CORT; SL-Água e SL-CORT), para avaliação da homeostase energética e do eixo HHA. A supernutrição lactacional promoveu nos ratos no DPN 88: intolerância à glicose e maior adiposidade, triacilgliceróis, ácidos graxos livres, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL) e corticosterona plasmáticos, além de aumento da expressão de RNAm do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e proopiomelanocortina (POMC) na hipófise, e diminuição da expressão de RNAm do receptor de mineralocorticoide no PVN. O tratamento com CORT promoveu intolerância à glicose, aumento do peso corporal, ingestão alimentar, colesterol total e LDL plasmáticos nos animais NL, apresentando poucos efeitos no grupo SL. O tratamento com CORT reduziu a concentração plasmática de corticosterona e a espessura do córtex adrenal no grupo NL, associado ao aumento da expressão de RNAm de CRH no PVN e POMC na hipófise, sem efeitos nos animais SL. Dessa forma, a supernutrição lactacional promoveu hiperatividade do eixo HHA e reduziu a responsividade aos efeitos dos glicocorticoides no balanço energético e no *feedback* negativo do eixo HHA em ratos adultos.

**Palavras-chave:** glicocorticoides; redução do tamanho da ninhada; receptor de mineralocorticoide; feedback negativo.

### 3.1.1 INTRODUÇÃO

O estado nutricional durante o início da vida pode levar a repercussões importantes na vida adulta do indivíduo (Plagemann 2006), conforme bem estabelecido pelo conceito de “Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença”, do termo em inglês *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD).

Sabe-se que a nutrição pós-natal em roedores pode ser aumentada pela redução do tamanho da ninhada (Plagemann 2006), sendo este método amplamente utilizado a fim de observar os efeitos a longo prazo da supernutrição durante a lactação. Este método consiste em alocar os animais em ninhadas menores que o habitual (SL), com 3 ou 4 filhotes/mãe, comparado ao controle, com aproximadamente 10 a 12 filhotes/mãe (Spencer 2013). Assim, a redução

da ninhada induz a supernutrição pelo aumento da ingestão de leite, levando ao desenvolvimento precoce da obesidade, a obesidade infantil, a qual persiste até a idade adulta, demonstrando que a nutrição durante o período de lactação é um fator relevante para o desenvolvimento da obesidade na idade adulta (Fiorotto et al. 1991).

Além das alterações metabólicas, os animais SL apresentam maiores concentrações de glicocorticoides circulantes na vida adulta (Boullu-Ciocca et al. 2005; Hou et al. 2011). Os glicocorticoides são secretados pelas glândulas adrenais, órgão final da cascata do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), sendo regulados pelo hormônio liberador de corticotrofina (CRH), produzido pelo núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) e pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), sintetizado e secretado pela hipófise anterior (Herman et al. 1996). O CRH produzido pelo PVN estimula a transcrição do gene da proopiomelanocortina (POMC) na hipófise anterior, e sua posterior tradução e clivagem para a produção de ACTH, que estimula a produção de glicocorticoides pela glândula adrenal (Herman et al. 1996; Dallman e outros 1992). Por outro lado, os glicocorticoides podem reduzir a síntese e liberação de CRH e ACTH por *feedback* negativo (Herman et al. 1996).

Os glicocorticoides, como o cortisol em humanos e a corticosterona em roedores, promovem seus efeitos interagindo com receptores de mineralocorticoides (MR) e receptores de glicocorticoides (GR), sendo que as concentrações plasmáticas desse hormônio estão aumentadas em diferentes modelos de obesidade (Yukimura e outros 1978; Bruce e outros 1982; Dubuc e Wilden 1986). Além disso, de acordo com a literatura, os roedores obesos possuem maior sensibilidade aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides em relação ao aumento da ingestão alimentar, ganho de peso corporal e depósito de tecido adiposo branco (Tokuyama e Himms-Hagen 1987; Tokuyama e Himms-Hagen 1989; Freedman et al. 1986), enquanto que a obesidade está associada à resistência ao *feedback* negativo dos glicocorticoides no eixo HHA (Ljung et al. 1996; Ljung et al. 2002; Jessop et al. 2001).

Sabe-se que a redução do tamanho da ninhada promove a obesidade precoce que persiste até a vida adulta, proporcionando alterações no eixo HHA (Fiorotto 1991; Boullu-Ciocca et al. 2005; Hou et al. 2011). Ainda, a obesidade está associada à falta de resposta aos efeitos dos glicocorticoides no eixo HHA

e a maiores respostas anabólicas dos glicocorticóides (Tokuyama e Himms-Hagen 1989; Freedman et al. 1986; Jessop et al. 2001). Assim, este estudo hipotetizou que a obesidade induzida pela redução do tamanho da ninhada poderia potencializar as respostas metabólicas dos glicocorticóides e alterar seus efeitos no *feedback* negativo do eixo HHA. Para a investigação desta hipótese, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento prolongado com corticosterona na homeostase energética e no eixo HHA de ratos adultos com obesidade infantil.

### **3.1.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1.2.1 Animais Experimentais.**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (n=72) obtidos por meio da acasalamentos de matrizes (n=27) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Durante o acasalamento, foram mantidas 2 fêmeas com cada macho. Após constatar-se a prenhez, mediante a observação de espermatozoides no esfregaço vaginal juntamente com células características da fase do estro, cada fêmea foi colocada em caixa individual. Após o nascimento, no dia pós-natal 3 (DPN) foram mantidos 3 filhotes, 2 machos e 1 fêmea (ninhada reduzida – SL) ou 10 filhotes, 5 machos e 5 fêmeas (ninhada normal – NL) com cada fêmea (Spencer 2013; Stopa et al., 2021). Os filhotes excedentes foram anestesiados com associação de ketamina (K, 100 mg/kg, 10%, Agener União, Apucarana, Brasil) e cloridrato de xilazina (X, 20 mg/kg, 2%, Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, Brasil) por via intraperitoneal e submetidos à eutanásia por decapitação. Após o desmame, apenas os animais machos foram alojados em grupos de 3 a 4 ratos do mesmo grupo experimental em cada caixa. As fêmeas foram utilizadas em experimentos de outro estudo do nosso grupo publicado recentemente (Stopa et al., 2021).

Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, com ambiente de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $22 \pm 2$  °C) controladas, e água e alimentação à vontade, exceto nas horas de restrição alimentar antes do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) e eutanásia. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo do Departamento de

Ciências Fisiológicas-CCB/UEL a partir das 14h. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação (número CEUA: 3457.2109.11, Of. Circ. CEUA 60/2019).

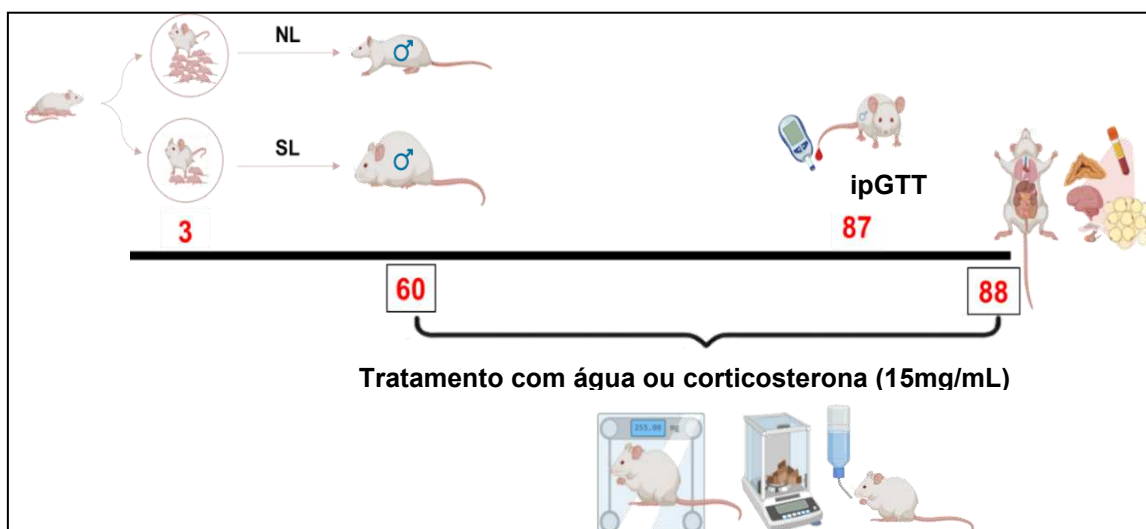
### **3.1.2.2 Protocolo experimental.**

A avaliação do peso dos animais foi realizada nos DPN 7, 10, 14, 17 e 21. O desmame ocorreu no DPN 21. A partir do DPN 25, os animais foram pesados a cada 5 dias e a ingestão alimentar e de fluido também foi avaliada. O protocolo experimental começou a partir do DPN 60. No DPN 60, os ratos foram pesados e foi medido o comprimento nasoanal para determinação do índice de Lee (Bernardis e Patterson 1968). O protocolo experimental ocorreu do DPN 60 ao 88, assim os animais de ambas as ninhadas (NL e SL) receberam água ou água com Corticosterona (Sigma, Saint Louis, USA - CORT: 15 mg/L) como única fonte de líquidos durante os 28 dias de tratamento, compondo os grupos experimentais para cada ninhada (de Souza et al. 2019; Stopa et al. 2019):

- Grupo Água: ratos recebendo água corrente contendo etanol 0,5%, como única fonte de líquido.

- Grupo CORT: ratos recebendo água corrente contendo Corticosterona (15mg/L) diluída em etanol 0,5% como única fonte de líquido.

O ganho de peso corporal, a ingestão alimentar e de fluidos foram avaliados diariamente durante os 28 dias de tratamento. No DPN 87, os animais foram submetidos ao ipGTT e no DPN 88 os ratos foram pesados, e o comprimento nasoanal foi medido novamente para determinação do índice de Lee (Bernardis e Patterson 1968). Após 6 horas de restrição alimentar, os animais não anestesiados foram submetidos à eutanásia por decapitação (Fig. 2).



reduzida; DPN: dia pós natal; ipGTT: teste de tolerância a glicose via intraperitoneal.

### 3.1.2.3 Avaliação da Ingestão Alimentar, Ingestão de fluido e índice de Lee.

O peso corporal dos animais foi aferido diariamente durante todo o período experimental e expresso em gramas. Utilizamos também como análise dos resultados o delta peso dos animais, que corresponde ao (peso final – peso inicial) dos animais durante o protocolo experimental. Os animais receberam ração para roedores (Nuvilab CR1, Nuvital®) diariamente, e as sobras foram retiradas após 24 horas. Da diferença entre a oferta e sobra de alimentos, a quantidade diária de alimento ingerido foi calculada e expressa em g/100g de peso corpóreo. A ingestão de fluidos também foi calculada diariamente avaliando a diferença entre a oferta e sobra de fluidos e expressa em mL/100g de peso corpóreo. O índice de Lee foi avaliado no início e final (DPN 88) de cada experimento, e calculado considerando-se o peso corporal e a medida nasoanal, dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal em grama pelo comprimento nasoanal (CNA) em centímetros e multiplicando-se por mil [ $\sqrt[3]{\text{Peso (g)}/\text{CNA(cm)}}$ ] (Bernardis & Peterson, 1968).

### 3.1.2.4 Teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipGTT).

Às 14h do DPN 87, após restrição alimentar de 6 horas (8h às 14h), foi coletada uma gota de sangue da cauda de cada animal para determinação da glicemia por meio da fita teste do aparelho Accu-Check Advantage II (Roche, Taquara, RJ, Brazil) de determinação de glicose sanguínea. Esta primeira dosagem representou a glicemia basal. Imediatamente após, foi realizada a

administração por via intraperitoneal de glicose 25% na dose de 1,0 g/kg de peso corporal de animal. A partir de então, foram realizadas dosagens de glicose sanguínea pela fita teste nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a sobrecarga de glicose. Transcorridos os 120 minutos, os animais retornaram para suas caixas com alimentação e fluidos a vontade (De Souza et al. 2019; Stopa et al. 2019; Stopa et al. 2021).

#### **3.1.2.5 Eutanásia.**

A eutanásia ocorreu no DPN 88. A fim de evitar alterações bioquímicas e hormonais induzidas pela anestesia (Windeløv et al 2016; Guarino et al. 2013), realizamos a eutanásia por decapitação nos animais não-anestesiados, em restrição alimentar de 6h, conforme aprovado pelo comitê de ética de uso de animais para experimentação (número CEUA: 3457.2109.11, Of. Circ. CEUA 60/2019).

Imediatamente após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados, a 2500 r.p.m. e 4°C, durante 20 minutos para as análises bioquímicas. O sangue foi coletado para análise das concentrações plasmáticas de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e baixa densidade (LDL), triacilgliceróis (TAG), ácidos graxos livres (AGL) e corticosterona. Imediatamente após a decapitação, a cavidade abdominal e o escroto foram abertas, as adrenais e os tecidos adiposos brancos (subdivisões perigonadal e retroperitoneal) foram visualizados e cuidadosamente removidos e pesados. O cérebro e a hipófise também foram removidos e armazenados em freezer a – 80 °C para análise molecular por PCR em tempo real.

#### **3.1.2.6 Dosagens plasmáticas**

Utilizamos a espectrofotometria para a determinação das concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol HDL (kits comerciais, biotecnologia VIDA, MG), colesterol LDL (kits comerciais, Wiener lab., Argentina) e TAG (kits comerciais, Laborclin, PR). A concentração de AGL foi determinada pelo método espectrofotométrico modificado de Falholt et al. (1973). Para determinar a concentração plasmática de corticosterona utilizamos a metodologia modificada de Guillemín et al. (1958) por fluorimetria.

#### **3.1.2.7 Análise histomorfométrica das adrenais**

As adrenais foram fixadas em solução de Bouin (Jand Química, SP, Brasil), por 24 h a 4°C. Após a fixação, foram desidratadas em concentrações graduais de etanol, clareadas em xilol e incluídas em parafina a 62°C. Os cortes de 7 µm obtidos em micrótomo foram corados por hematoxilina e eosina e, em seguida, com o auxílio de um sistema de imagem acoplado ao microscópio (Motic, Xiamen, China), no qual com a objetiva de 4x capturamos as fotomicrografias. Foram realizadas 2 fotomicrografias para cada animal e, em seguida, usando o software Motic Image Plus, analisamos as medidas de cada animal para as seguintes variáveis: espessura (µm) da zona fasciculada (ZF) + zona reticulada (ZR), medula (M) e córtex adrenal (C).

### **3.1.2.8 Microdissecção, isolamento do RNA total e PCR em tempo real semi-quantitativa do cérebro e hipófise.**

Imediatamente após a eutanásia, o cérebro dos animais dos quatro grupos experimentais foi removido da calota craniana e armazenados a -80°C. As microdissecções do PVN e do hipocampo foram obtidas utilizando agulhas de *micropunch* de 1,5 mm, a partir de cortes coronais (1200 µm) em criostato, de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1997) (Paxinos e Watson 2007) seguindo as coordenadas: -1,08 a -2,28 mm do bregma para PVN, e -2,92 a -4,20 mm do bregma para o hipocampo. Até obtermos o isolamento do RNA, as amostras de tecido foram mantidas em microtubo contendo o reagente RNA later (Ambion, Life technologies corporation, Carlsbad, USA) a -80 °C.

Para a hipófise, toda a glândula foi utilizada para a extração de RNA. Após a retirada do cérebro, visualizou-se a hipófise, que foi cuidadosamente retirada da sela túrcica com o auxílio de pinça, coletada em microtubo contendo a solução de RNA later® (Ambion, Life technologies Corporation, Carlsbad, EUA) e armazenada a -80°C até o isolamento do RNA.

A extração do RNA total de cada amostra foi realizada com o reagente TRIzol (Invitrogen®, Life technologies corporation, Carlsbad, USA), conforme protocolo do fabricante. A concentração de RNA em cada amostra foi determinada usando um leitor de microplacas multidetecção (Synergy HT, BioTek), e 500 ng de RNA foi usado para a síntese de cDNA através de um kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA). As reações foram realizadas em um

volume de 12  $\mu\text{L}$  (4  $\mu\text{L}$  de cDNA) utilizando os reagentes TaqMan® (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, USA): Rn01462137\_m1(CRH-PVN), Rn00595020\_m1 (POMC- Hipófise), Rn00561369\_m1 (GR) e Rn00565562\_m1 (MR) (Hipocampo, PVN e hipófise). A reação de PCR foi realizada em duplicata, sendo a água o controle negativo. A beta-actina (Rn01412977\_g1) foi utilizada como gene de referência (controle endógeno), o que ocorreu com cada amostra de cDNA. A determinação das concentrações dos genes transcritos em cada amostra foi obtida pelo método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Para cada amostra, o ciclo limiar (Ct) foi determinado e normalizado com a média do gene de referência ( $\Delta\text{Ct} = \text{C}_{\text{unknown gene}} - \text{C}_{\text{reference gene}}$ ). A variação na expressão de RNAm nas amostras em relação ao grupo controle foi calculada como  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , onde  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{C}_{\text{grupo desconhecido}} - \Delta\text{C}_{\text{grupo calibrador}}$ . Para obter a quantificação relativa, descrita em unidades arbitrárias, foram utilizados calibradores apropriados como grupo controle: (1) grupo NL- Água foi utilizado como calibrador para avaliar o efeito do tamanho da ninhada (NL e SL) na expressão de RNAm; (2) NL-Água e SL-Água foram utilizados como calibrador para avaliar o efeito do tratamento (Água ou CORT) na expressão de RNAm em cada ninhada (NL e SL). Assim, os dados são mostrados como expressão de RNAm em relação ao respectivo grupo calibrador.

### **3.1.2.9 Análise estatística**

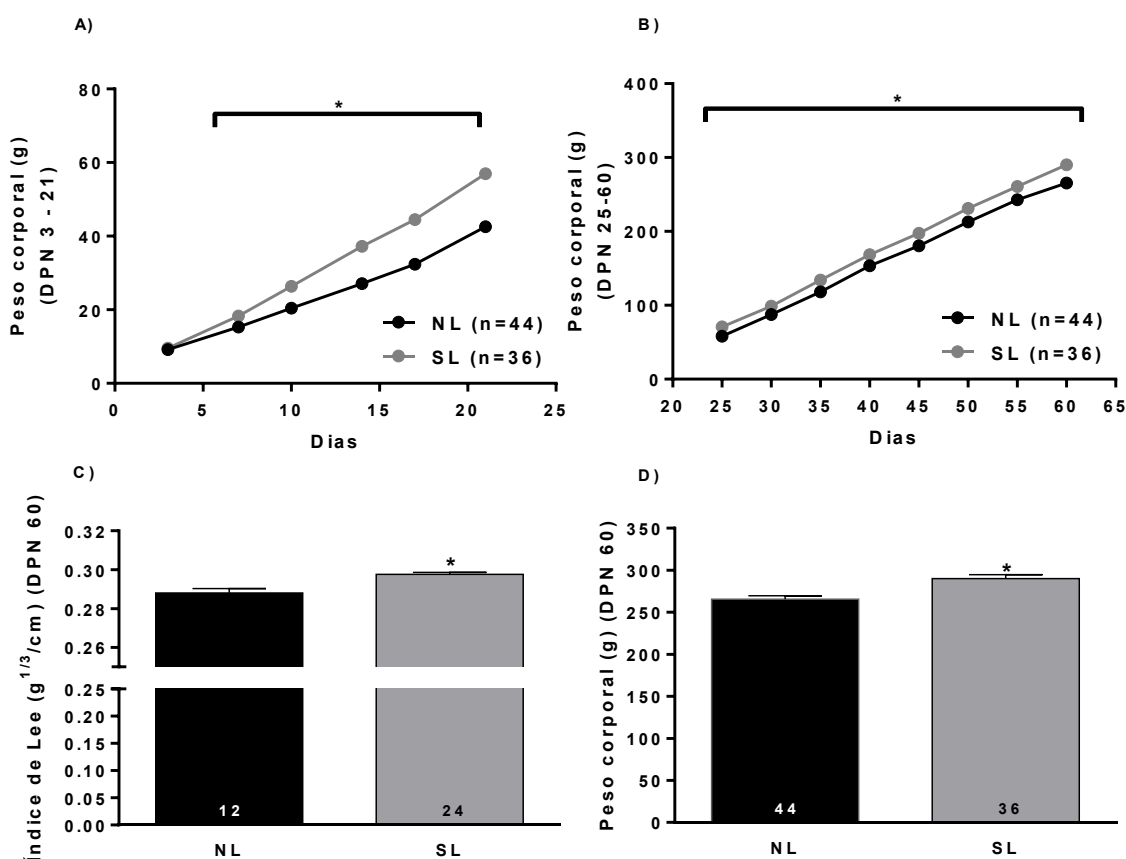
A distribuição normal e a homogeneidade dos dados foram testadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Com exceção das curvas de peso corporal, ipGTT, análise de RNAm e índice de Lee, os resultados foram analisados por Anova de duas vias, seguido do pós-teste de Tukey. Para curvas de peso corporal e ipGTT utilizamos a ANOVA de medidas repetidas, sendo o dia ou o tempo como o fator intra-sujeito e grupos como o fator entre os sujeitos. Para o índice de Lee, peso corporal no DPN 60 e os resultados de RNAm, nos quais as análises comparativas foram realizadas entre dois grupos, utilizamos o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Apenas os dados de expressão do gene MR foram expressos como mediana (1ª e 3ª intervalos interquartis). As diferenças foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ .

### **3.1.3. Resultados**

**Interação da supernutrição lactacional induzida pelo tamanho da ninhada e o tratamento com corticosterona sobre parâmetros ponderais e bioquímicos em ratos adultos:**

Ao utilizarmos a ANOVA de medidas repetidas no parâmetro de peso corporal, observamos que houve interação entre o DPN (3 a 21) e os grupos (NL e SL) no peso corporal [(F5;350=142,6,  $p < 0,0001$ )], com efeitos do DPN [(F5;350=4319,  $p < 0,0001$ )] e grupo [(F1;70=187,0;  $p < 0,0001$ )] (Fig. 3A). Não houve interação entre o DPN (25 a 60) e os grupos (NL e SL) no peso corporal [(F7;490=0,9725,  $p = 0,4505$ )], com efeitos do DPN [(F7;490=3188,  $p < 0,0001$ )] e grupo [(F1;70=20,02;  $p < 0,0001$ )] (Fig. 3B). Assim, notamos que a redução no tamanho da ninhada aumentou o peso corporal a partir do DPN 7 até o DPN 21, e do DPN 25 ao DPN 60 (Fig.3A, B). Os ratos SL demonstraram aumento no peso corporal no DPN 60 em comparação com animais NL (Fig. 3D).

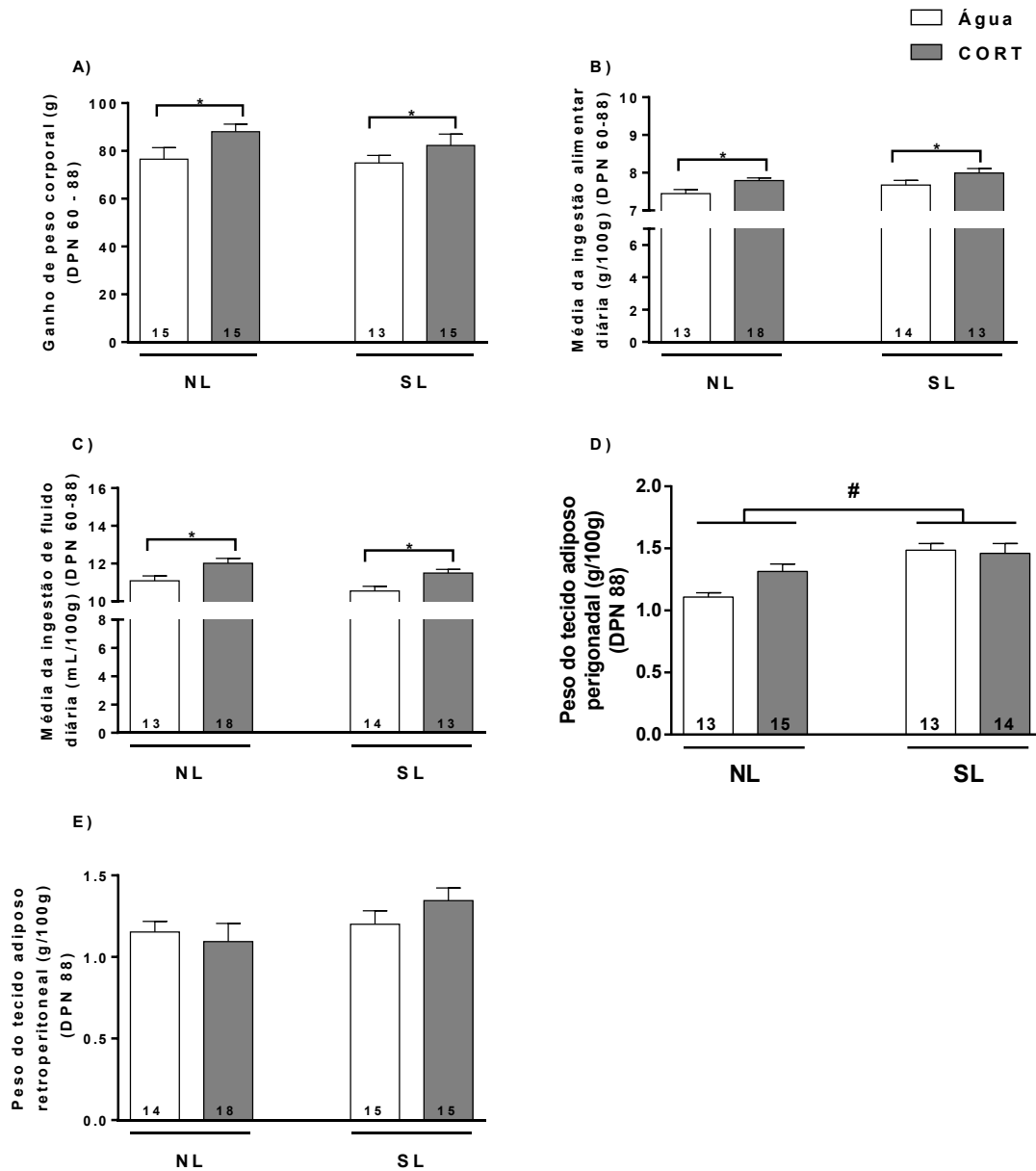
Ainda de acordo com a Fig. 3, observamos que no DPN 60, o índice de Lee foi maior [ $t(34)=4,537$ ,  $p = 0,0001$ ] no grupo SL em comparação ao grupo NL (Fig. 3C).



**Fig. 3.** Curva de peso corporal (g) do DPN 3 a 21 (A), curva de peso corporal do DPN 25 a 60 (B), índice de Lee (C) e peso corporal (g) no DPN 60 (D) de ratos de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). O número de animais é mostrado nas barras ou entre parênteses. Os dados foram analisados pelo teste t de Student e ANOVA de medidas repetidas (para curva de peso corporal) e expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05 SL versus NL.

Na fig. 4 podemos notar que os grupos NL-CORT e SL-CORT demonstraram aumento ( $p < 0,05$ ) no ganho de peso corporal (A), ingestão alimentar (B) e ingestão de fluido (C) em comparação com seus respectivos animais do grupo Água. Não houve interação entre o tratamento (Água e CORT) e o tamanho da ninhada (NL e SL) no ganho de peso corporal [ $F(1; 54)=0,26$ ,  $p=0,61$ ], ingestão alimentar [ $F(1; 50)=0,021$ ,  $p=0,88$ ] e ingestão de fluidos [ $F(1; 56)=0,017$ ,  $p=0,90$ ], sem efeitos do tamanho da ninhada, mas com efeitos do tratamento sobre o ganho de peso corporal [ $F(1; 54)=5,25$ ,  $p=0,026$ ] e ingestão alimentar [ $F(1,50)=9,17$ ,  $p=0,004$ ] (Fig. 4 A, B).

Não houve interação entre tratamento (Água e CORT) e tamanho da ninhada (NL e SL) nos pesos do tecido adiposo branco perigonadal [ $F(1; 51)=3,75$ ,  $p=0,06$ ] e retroperitoneal [ $F(1; 58)=1,27$ ,  $p=0,27$ ], não demonstrando efeitos do tratamento em ambos os depósitos de gordura (Fig. 4C, D). Houve efeito do tamanho da ninhada apenas sobre o peso do depósito perigonadal ( $F(1,51)=19,5$ ,  $p < 0,001$ ). Os animais SL apresentaram maior ( $p < 0,001$ ) peso do tecido adiposo branco perigonadal em relação aos grupos NL-Água e NL-CORT.

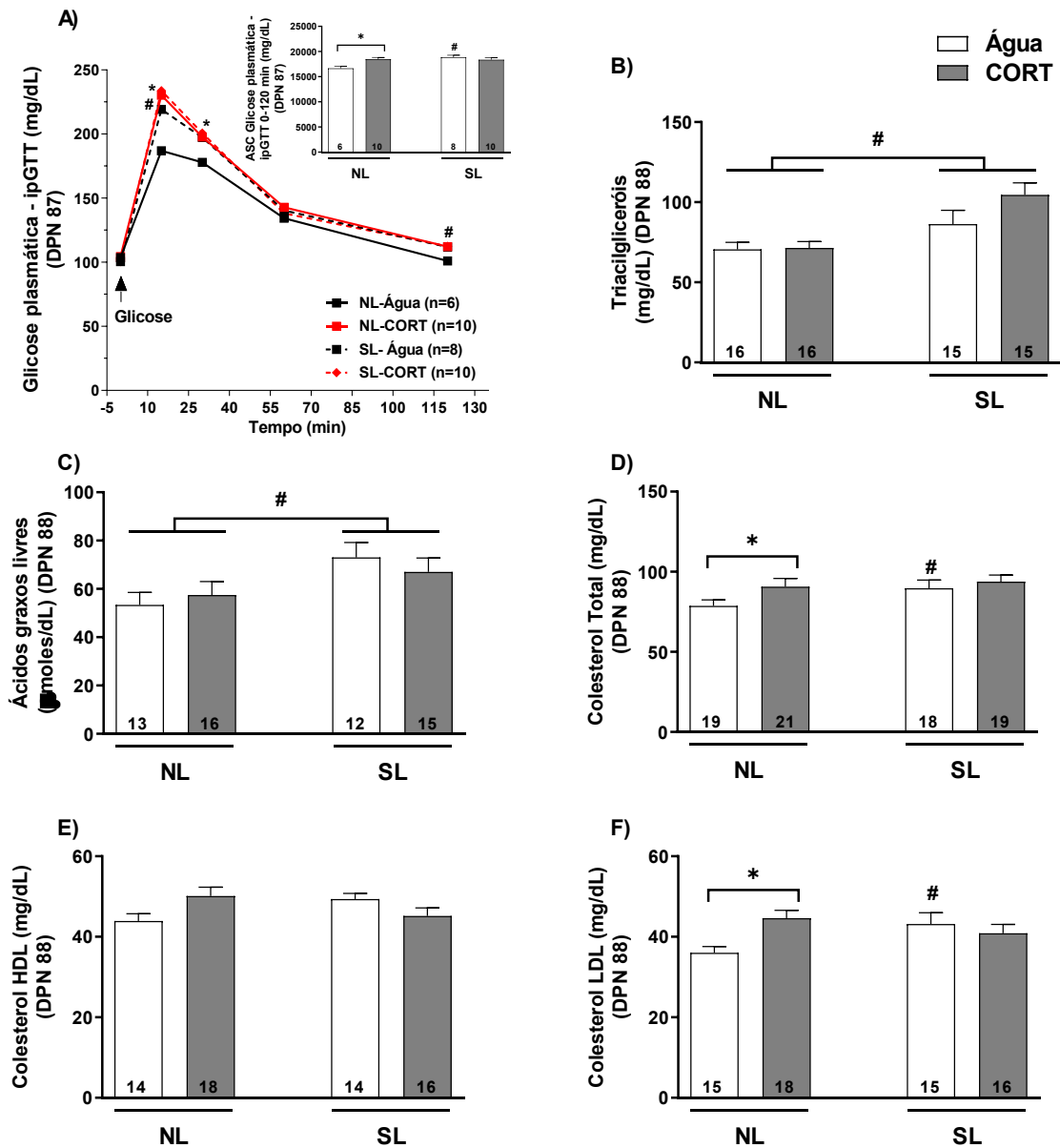


**Fig. 4.** Ganho de peso corporal do DPN 60 a 88 (g) (A), média da ingestão alimentar diária do DPN 60 a 88 (g/100 g) (B), média da ingestão de fluidos diária do DPN 60 a 88 (g/100 g) (C) pesos do tecido adiposo branco perigonadal (g/100 g) (D) e retroperitoneal (g/100 g) (E) no DPN 88 de ratos de ninhadas normal (NL) e reduzida (SL) tratados com Água ou Corticosterona (CORT: 15 mg/L). O número de animais é mostrado nas barras. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  Água versus CORT; # $p < 0,05$  SL versus NL.

O grupo SL-Água apresentou maior glicemia nos tempos 15 ( $p=0,041$ ) e 120 min ( $p=0,035$ ) após sobrecarga intraperitoneal de glicose em comparação com o grupo NL-Água. O grupo NL-CORT exibiu maior glicemia nos tempos 15

( $p=0,013$ ) e 30 min ( $p=0,045$ ) após a sobrecarga de glicose em comparação com o grupo NL-Água. Toda a resposta do ipGTT foi integrada na área sob a curva GTT (ASC), que mostrou que houve interação entre o tratamento (Água e CORT) e o tamanho da ninhada (NL e SL) [ $F(1; 30)=7,9, p=0,009$ ]. A redução do tamanho da ninhada promoveu aumento ( $p<0,05$ ) da ASC do ipGTT no grupo SL-Água em comparação com os animais NL-Água. Os animais NL-CORT apresentaram maior ( $p<0,05$ ) ASC do ipGTT em comparação com o grupo NL-Água (Fig. 5A).

Não houve interação entre o tratamento (Água e CORT) e o tamanho da ninhada (NL e SL) nas concentrações plasmáticas dos TAG [ $F(1; 58)=1,9, p=0,17$ ] e AGL [ $F(1; 40)=2,03, p=0,16$ ], não apresentando efeitos do tratamento, mas com efeitos do tamanho da ninhada nos TAG [ $F(1; 58)=15,02, p<0,001$ ] e AGL [ $F(1; 40)=5,3, p=0,027$ ]. SL-Água e SL-CORT apresentaram aumento ( $p<0,05$ ) das concentrações plasmáticas de TAG e AGL em comparação com seus respectivos grupos NL (Fig. 5B, C). Houve interação entre o tratamento (Água e CORT) e o tamanho da ninhada (NL e SL) nas concentrações plasmáticas de colesterol total [ $F(1; 61)=4,59, p=0,036$ ], LDL [ $F(1; 60)=6,3, p=0,015$ ] e HDL [ $F(1; 57)=6,06, p=0,017$ ]. Observamos maiores concentrações de colesterol total e LDL nos animais NL-CORT em comparação aos animais NL-Água, sendo que a redução do tamanho da ninhada aumentou as concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL no grupo Água, sem diferença no colesterol HDL (Fig. 5D, E, F).



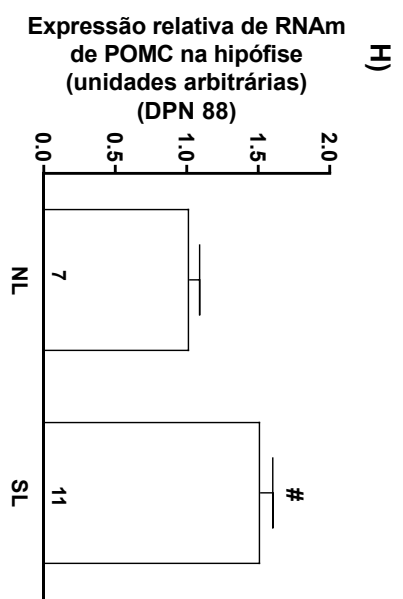
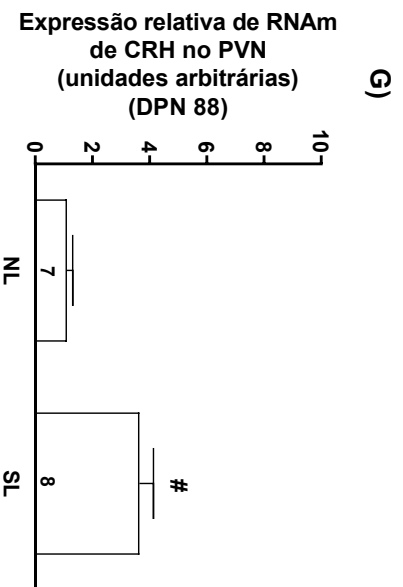
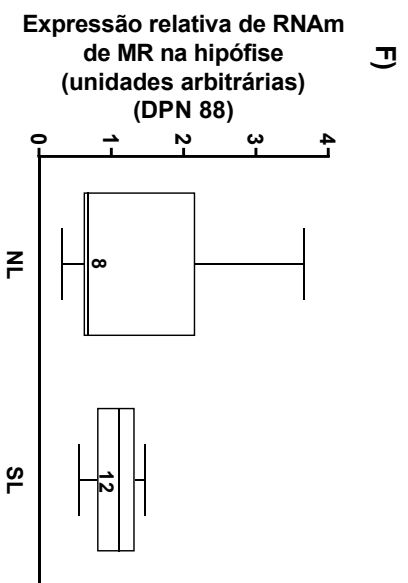
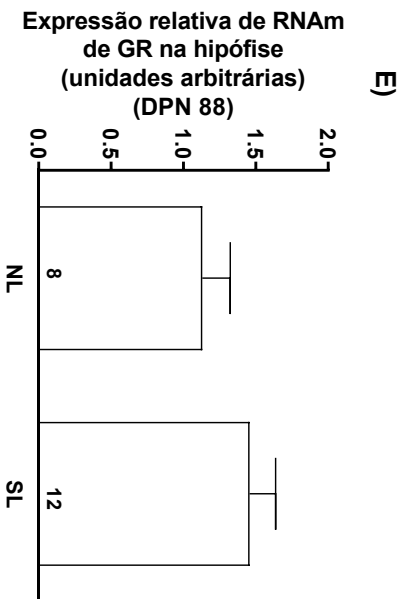
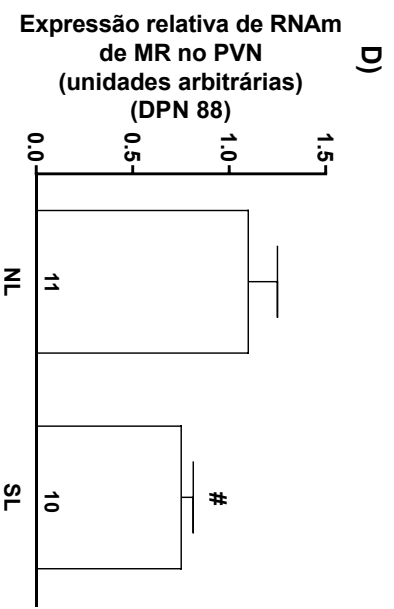
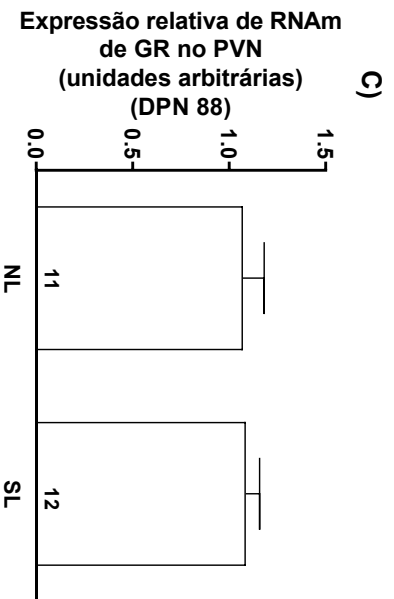
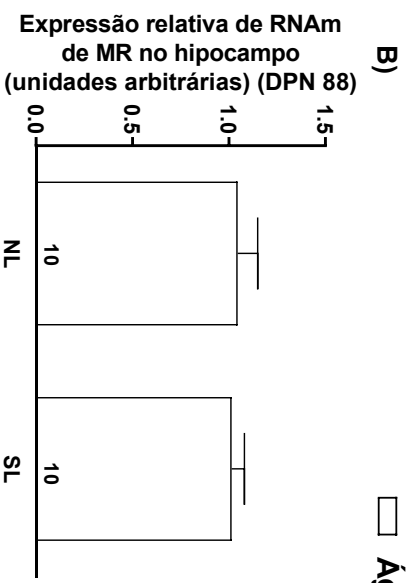
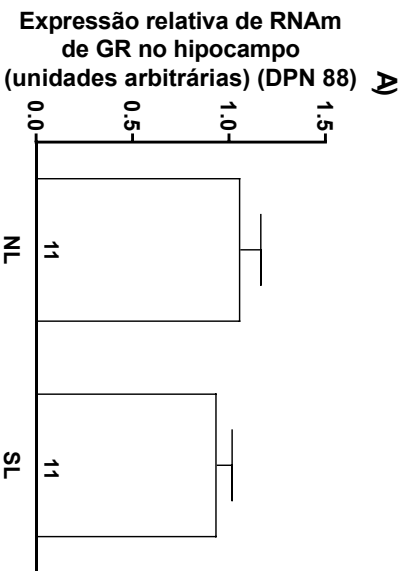
**Fig. 5.** Curva do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT; mg/dL), expressa pela glicemia basal e glicemia após sobrecarga de glicose ip, e área sob a curva (ASC) do ipGTT de 0 a 120 min (mg/dL) (A), concentrações plasmáticas de triacilgliceróis (mg/dL) (B), ácidos graxos livres (µmoles/dL) (C), colesterol total (mg/dL) (D), colesterol HDL (mg/dL) (E) e colesterol LDL (mg /dL) (F) de ratos de ninhada normal (NL) e reduzida (SL), tratados com Água ou Corticosterona (CORT: 15 mg/L) no DPN 88. O número de animais de cada grupo é mostrado nas barras ou entre parênteses. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos como média ± EPM. \*\*p < 0,05 Água versus CORT; #p < 0,05 SL versus NL.

***Efeito da redução do tamanho da ninhada no eixo HHA: expressão de CRH no PVN, POMC na hipófise, expressão do RNAm de GR e MR no hipocampo, PVN e hipófise:***

A expressão gênica relativa dos RNAm de GR e MR não diferiu no hipocampo e na hipófise entre os grupos NL-Água e SL-Água no DPN 88 (Fig. 6A, B, E, F). No PVN, não observamos diferença no RNAm de GR (mostrado na Fig. 6C). A expressão relativa do RNAm de MR no PVN foi menor [t (19) =2,11, p=0,048] nos animais SL do que no grupo NL (mostrado na Fig. 6D).

A avaliação do efeito do tamanho da ninhada (NL e SL) na expressão de RNAm de CRH e POMC nos animais do grupos Água mostrou que a redução do tamanho da ninhada aumentou a expressão relativa do RNAm de CRH [t(13)=4,57, p=0,0005] e POMC [t( 16)=3,95, p=0,0011] no PVN e hipófise, respectivamente (Fig. 6G, H).

□ Água



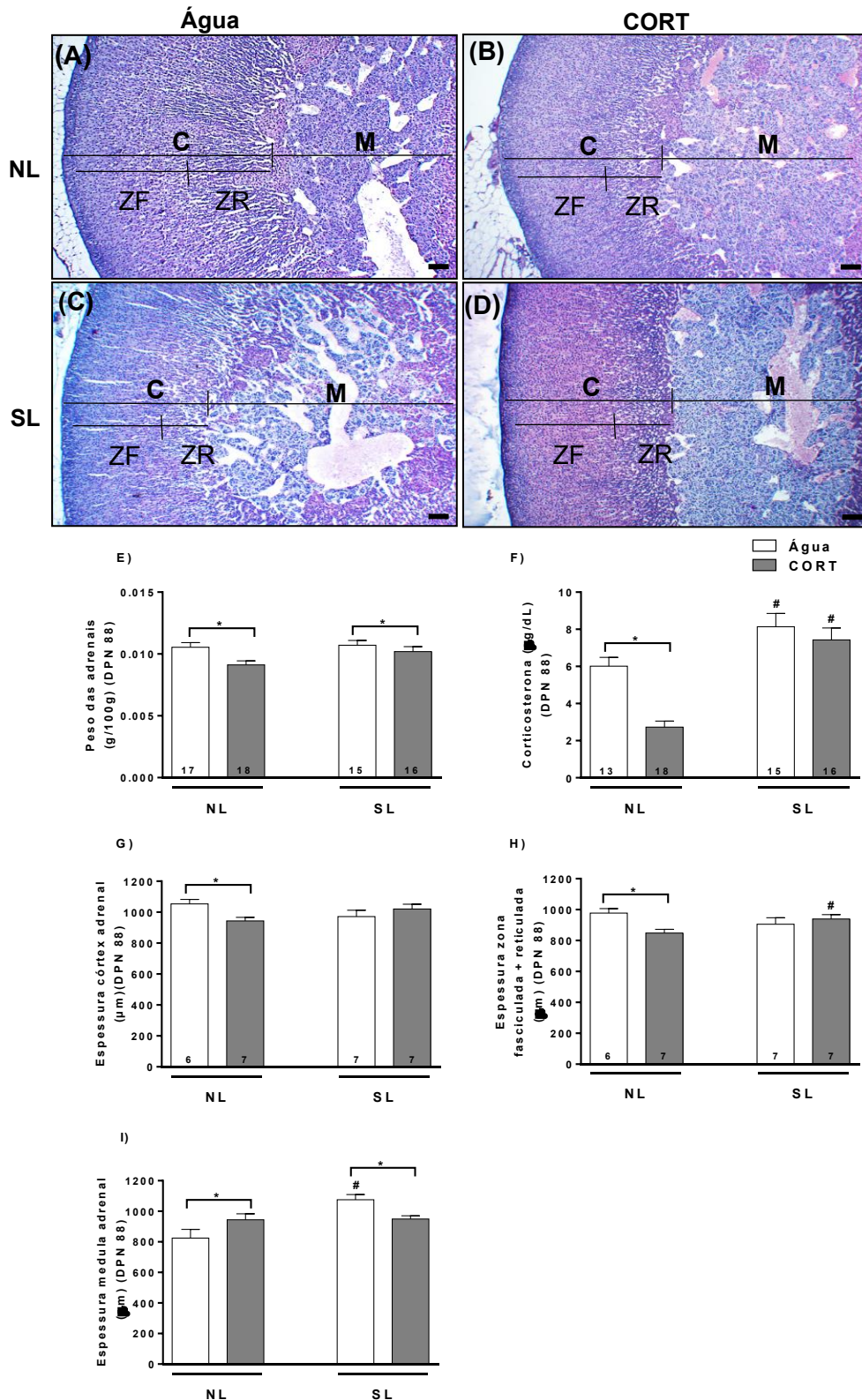
**Fig. 6.** Expressão relativa do RNAm do receptor de glicocorticoide (GR) e do receptor de mineralocorticoide (MR) no hipocampo (A e B), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (C e D) e da hipófise (E e F), bem como do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no PVN (G) e proopiomelanocortina (POMC) na hipófise (H) de ratos adultos (DPN 88) de ninhada normal (NL) e reduzida (SL) – (Água). O grupo NL foi usado como calibrador para avaliar o efeito do tamanho da ninhada (NL e SL) na expressão do RNAm. O número de animais é mostrado nas barras. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM para o teste t de Student e mediana (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis) para o teste de Mann-Whitney para a expressão do gene MR. #p < 0,05 SL versus NL.

***Interação da supernutrição na lactação induzida pelo tamanho da ninhada e o tratamento com corticosterona no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos adultos:***

Não houve interação entre o tratamento (Água e CORT) e o tamanho da ninhada (NL e SL) sobre o peso das adrenais [F(1; 62)=1,48, p=0,23], sem efeitos do tamanho da ninhada, mas com efeitos de tratamento [F(1; 62)=6,7, p=0,012], na qual o tratamento com corticosterona diminuiu (p<0,05) o peso das adrenais em ambas as ninhadas, em comparação com animais do grupo Água (Fig. 7E). Houve interação entre o tratamento (Água e CORT) e o tamanho da ninhada (NL e SL) nas concentrações plasmáticas de corticosterona [F(1; 58)=5,34, p=0,024]. A redução do tamanho da ninhada induziu maiores (p<0,05) concentrações plasmáticas de corticosterona em ambos os tratamentos em comparação com seus respectivos animais NL. Observamos uma redução (p<0,05) na concentração plasmática de corticosterona nos animais NL- CORT em relação ao grupo NL-Água (Fig. 7F).

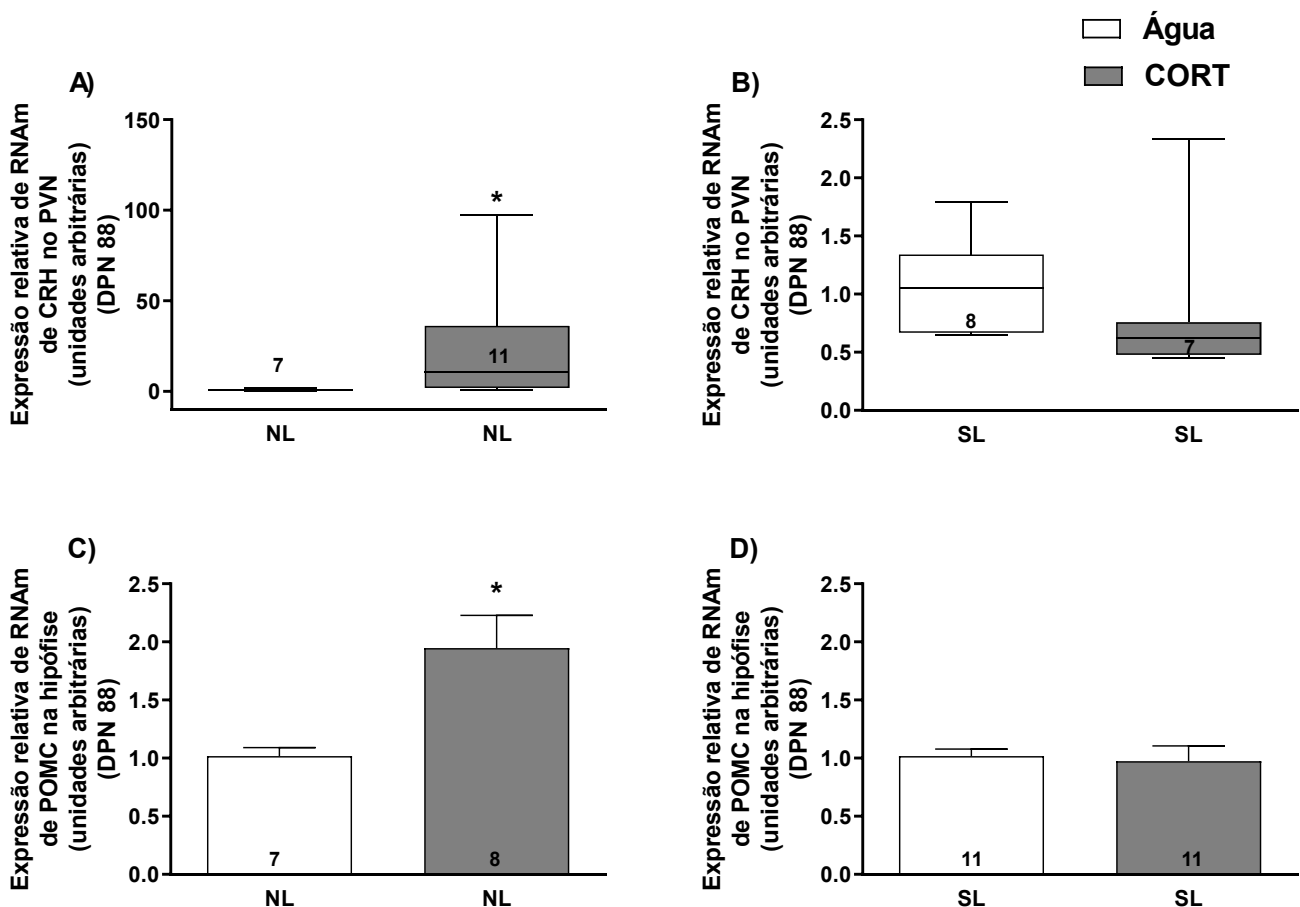
Ao realizarmos a ANOVA de duas vias, notamos que houve interação entre o tratamento (Água e CORT) e o tamanho da ninhada (NL e SL) na espessura do córtex adrenal [F(1; 23)=6,2, p=0,021], zonas fasciculadas + reticuladas [F(1; 23)=6,6, p=0,017] e medula adrenal [F(1; 23)=10,3, p=0,004]. Os animais NL-CORT demonstraram uma diminuição (p<0,05) no córtex adrenal em comparação com os animais do grupo Água, e não observamos nenhuma diferença no grupo SL (mostrado na Fig. 7G). Além disso, o grupo NL-CORT apresentou uma redução (p<0,05) nas zonas fasciculadas + reticuladas em

comparação com os grupos NL-Água e SL-CORT (mostrado na Fig. 7H). Houve aumento da medula adrenal no grupo NL-CORT e diminuição no grupo SL-CORT em comparação com os respectivos grupos água. A redução do tamanho da ninhada promoveu aumento da medula adrenal nos animais SL-Água (mostrado na Fig. 7I). Fotomicrografias representativas das glândulas adrenais dos grupos NL e SL, Água ou CORT, são mostradas na Fig. 7 A-D.



**Fig. 7.** Fotomicrografias representativas (ampliação de 40×) das glândulas adrenais, coradas com hematoxilina-eosina, dos grupos NL e SL, Água ou Corticosterona (CORT: 15 mg/L) no DPN 88. (A): NL- Água; (B): NL- CORT; (C): SL-Água;(D): SL-CORT; C: Córtex; FZ: zona fasciculada; RZ: zona reticulada; M: Medula. Barra de escala = 100 µm. Peso das adrenais (g/100g) (E), concentração plasmática de corticosterona (µg/dL) (F), espessura do córtex adrenal (µm) (G) e zonas fasciculadas + reticuladas (µm) (H), medula adrenal (µm) (I) de ratos de ninhada normal (NL) e reduzida (SL) dos grupos Água ou Corticosterona (CORT: 15 mg/L) no DPN 88. O número de animais é mostrado nas barras. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos como média ± EPM. \*p < 0,05 Água versus CORT; #p < 0,05 SL versus NL.

A análise do efeito do tratamento (Água ou Corticosterona) na expressão do mRNA em cada ninhada (NL e SL) demonstrou que, no grupo NL, o tratamento com corticosterona induziu maior expressão do RNAm de CRH (U=11, p=0,0114) e POMC [t(13)=3,01, p=0,01] (Fig. 8A, C), sem efeitos nos animais SL (Fig. 8B, D).



**Fig. 8.** Expressão relativa de RNAm do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (A e B) e proopiomelanocortina (POMC) na hipófise (C e D) de ratos de ninhada normal (NL) e ninhada reduzida (SL), dos grupos Água ou Corticosterona (CORT 15 mg/L) no DPN 88. O respectivo grupo Água foi usado como calibrador para avaliar o efeito do tratamento (Água ou CORT) na expressão do RNAm em cada ninhada (NL e SL). O número de animais de cada grupo é mostrado nas barras. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM para o teste t de Student e mediana (1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis) para o teste de Mann-Whitney. \*p < 0,05 Água versus CORT.

### 3.1.4. Discussão

O objetivo desse estudo foi avaliar o eixo HHA em animais com obesidade induzida pela supernutrição lactacional e a responsividade desses animais ao tratamento prolongado com corticosterona nas respostas metabólicas e eixo HHA. De fato, observamos que os animais com obesidade infantil apresentaram hiperatividade do eixo HHA, prejuízo nas respostas metabólicas bem como no *feedback* negativo do glicocorticoide exógeno no eixo HHA.

Segundo estudos relacionados ao tema DOHaD, as perturbações durante os períodos de desenvolvimento pré e perinatal podem predispor à obesidade na vida adulta (Barker, 1998). A partir dessa perspectiva, observamos que houve aumento do interesse em pesquisas na fase de lactação, visto que ela mimetiza o último trimestre da gestação humana (Boullu-Ciocca et al., 2005), aliado ao fato de que a maturação neuroendócrina em roedores ocorre principalmente no período pós-natal, sendo assim esta fase apropriada para se estudar os efeitos de manipulações ambientais ou farmacológicas nos sistemas neuroendócrinos (Spencer 2013). Neste contexto, o método de redução do tamanho da ninhada é um modelo adequado para estudar as consequências da supernutrição durante o período lactacional, proporcionando aos animais o desenvolvimento precoce da obesidade, a qual persiste até a idade adulta (Plagemann 2006; Spencer 2013). No presente estudo pudemos corroborar com a afirmativa anterior, uma vez que observamos maior peso corporal da lactação até a idade adulta, e maior índice de Lee dos animais com obesidade infantil no DPN 60. Além disso, notamos aumento do tecido adiposo perigonadal, da concentração plasmática de TAG, AGL, colesterol total e LDL juntamente com intolerância à glicose nos

animais SL-Água no DPN 88, reforçando a narrativa de que a obesidade precoce induz alterações relacionadas à obesidade na idade adulta.

A supernutrição durante a lactação promove hiperinsulinemia, resistência periférica à insulina, observada pelo comprometimento da via de sinalização da insulina no fígado e músculo esquelético (Conceição et al. 2013, Liu et al. 2013). De fato, ratos SL adultos também apresentam resistência hipotalâmica à leptina (Walker et al. 2004), evidenciada pela maior expressão de SOCS3 e menor atividade de STAT3 (Rodrigues et al. 2011). Nesse contexto, foi observado o desequilíbrio do sistema nervoso autônomo em ratos SL adultos, como mostrado pela maior atividade do nervo vago nesses animais, sugerindo que essa disfunção autonômica poderia explicar indiretamente o aumento da adiposidade em ratos SL, via ação da insulina na lipogênese (Almeida et al., 2013, Rinaldi e outros 2014). Além disso, os ratos provenientes deste modelo apresentaram maior concentração de AGL, o que poderia causar resistência à insulina e maior concentração de glicose plasmática (Bei et al. 2015).

Considerando que diferentes estudos mostraram que os animais obesos são mais responsivos aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides (Tokuyama e Himms-Hagen 1987; Tokuyama e Himms-Hagen 1989; Freedman et al. 1986; de Souza et al. 2019), e que a obesidade está associada à diminuição da resposta do *feedback* negativo no eixo HHA (Jessop et al. 2001), ratos adultos NL e SL receberam tratamento prolongado com concentrações anabólicas de corticosterona (Stopa et al. 2019), a fim de se testar sua capacidade de resposta na homeostase energética e eixo HHA.

Como esperado, o tratamento prolongado com corticosterona induziu aos efeitos anabólicos bem estabelecidos dos glicocorticoides no grupo NL, evidenciado pelo aumento do ganho de peso corporal, ingestão alimentar, concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL e intolerância à glicose, conforme já descrito na literatura (Stopa et al. 2019; Campbell et al. 2011). Apesar dos animais SL estarem acima do peso e apresentarem alterações relacionadas à obesidade, eles não foram mais susceptíveis aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides do que os animais controles. De fato, o tratamento prolongado com corticosterona em ratos SL induziu apenas pequenas alterações na homeostase energética, especificamente em parâmetros que não foram alterados pela própria redução do tamanho da

ninhada, como ganho de peso corporal e ingestão alimentar. A falta de efeitos adicionais do tratamento prolongado com corticosterona pode ser atribuída ao aumento da expressão de enzimas inativadoras de glicocorticoides, 5 $\alpha$  redutase e 5 $\beta$  redutase, no fígado e tecido adiposo de animais SL (Hou et al. 2011). Ao contrário da hipótese inicial deste trabalho, os dados indicam que as alterações metabólicas induzidas pelo modelo de obesidade de supernutrição na lactação não são potencializadas pelo tratamento com glicocorticoide, como em outros modelos animais de obesidade (Tokuyama e Himms-Hagen 1987; Tokuyama e Himms-Hagen 1989; Freedman et al. 1986; de Souza et al. 2019). De fato, a diferença entre o presente trabalho e a literatura pode estar ligada ao fato de que o modelo de obesidade que induzimos promove obesidade moderada desde a infância até a idade adulta, enquanto que estudos anteriores utilizaram modelos de obesidade por modificação genética, que levaram à obesidade grave nos animais. Por outro lado, Torrezan e colaboradores (2019) observaram que respostas metabólicas induzidas por dexametasona não foram notadas em animais com obesidade induzida por L-glutamato monossódico (MSG). Assim, é plausível sugerir que a obesidade induzida pela supernutrição na lactação prejudica os efeitos dos glicocorticoides no balanço energético, e essa resposta pode ser atribuída ao fato de que tanto a obesidade quanto o glicocorticoide causam intolerância à glicose e alterações nos lipídeos circulantes, não permitindo dessa forma que os glicocorticoides promovam efeitos adicionais nestas vias nos animais SL.

Além das alterações metabólicas, outra resposta marcante relacionada à obesidade dos animais SL adultos do presente trabalho foi o aumento da atividade do eixo HHA, evidenciado pela maior expressão de CRH no PVN e POMC na hipófise, bem como aumento da concentração plasmática de corticosterona. Nesse contexto, ratos adultos de ninhada reduzida apresentaram maiores concentrações de corticosterona tanto na condição basal quanto após o estresse (Boullu-Ciocca et al. 2008), sendo a supernutrição pós-natal associada à maturação acelerada do eixo HHA e a hiperatividade do eixo HHA na idade adulta (Boullu-Ciocca et al. 2005).

Sabe-se que os glicocorticoides exercem seu *feedback* negativo clássico agindo sobre os receptores GR e MR, localizados na hipófise, hipotálamo e hipocampo (Aronsson et al. 1988; de Kloet et al. 1998; Nishi 2004). Está bem

descrito que os MR são importantes para a homeostase da corticosterona basal devido à sua alta ocupação mesmo em baixas concentrações, e os GR respondem principalmente quando há maiores concentrações de corticosterona (Reul et al. 1987). Assim, a hiperatividade do eixo HHA dos animais adultos com supernutrição lactacional pode estar associada à diminuição da sensibilidade ao *feedback* negativo dos glicocorticoides no eixo HHA (Aréchiga-Ceballos et al. 2014), pelo menos em parte devido à expressão reduzida de RNAm de MR no PVN, como observado no presente estudo. Além disso, a ausência de diferenças na expressão de GR e MR na hipófise e hipocampo entre animais NL e SL, bem como de GR no PVN, sugere que o MR no PVN desempenha um papel importante na regulação do eixo HHA em animais SL. Esses dados são apoiados por descobertas anteriores de que o MR contribui para a regulação da atividade do eixo HHA pelos glicocorticoides (Spencer et al. 1998; Jacobson e Sapolsky 1991).

A redução do córtex adrenal e das zonas fasciculadas+reticuladas, associadas a menores concentrações plasmáticas de corticosterona no grupo NL tratado com CORT confirma a atrofia das glândulas adrenais, devido ao tratamento com corticosterona exógena. De fato, a atrofia adrenal induzida pelo tratamento com glicocorticoide exógeno é classicamente relacionada com a menor estimulação do ACTH na adrenal (Itoh e Hirota 1976; Gill 1976) e/ou por ações negativas diretas dos glicocorticoides exógenos nas glândulas adrenais. Assim, uma ação supressora direta dos glicocorticoides pode ser sugerida, visto que diferentes glicocorticoides suprimiram a esteroidogênese induzida por ACTH em células isoladas de ratos (Carsia e Malamed 1983). Esses dados sugerem que essa resposta é um mecanismo geral de autorregulação das células adrenocorticais, que pode ser importante para o ajuste fino da esteroidogênese a qual opera além do controle clássico exercido pela hipófise anterior (Carsia e Malamed 1979). Sabendo-se disso, mecanisticamente, o tratamento com corticosterona exógena parece induzir a atrofia do córtex adrenal e da zona fasciculada e, conseqüentemente, está relacionada com a menor concentração de corticosterona nos animais NL, principalmente por ações negativas diretas nas glândulas adrenais, ao invés da clássica menor estimulação de ACTH na adrenal, uma vez que houve aumento da expressão de CRH e POMC nesses animais. Assim, a interrupção da produção de corticosterona endógena pelos

animais do grupo NL-CORT foi responsável pela maior expressão dos transcritos de CRH e POMC nesses animais, devido à falta de *feedback* negativo do glicocorticoide endógeno.

A glândula adrenal, especificamente a medula, também é responsável pela produção de catecolaminas. Nesse contexto, a análise histológica das glândulas adrenais de ratos SL na idade adulta apresentando maior espessura medular em comparação com animais NL está de acordo com dados anteriores da literatura, uma vez que a superalimentação neonatal promove hipertrofia adrenal (Boullu-Ciocca et al., 2005), e induz aumento da expressão de L-aminoácido descarboxilase aromática (DOPA) e tirosina hidroxilase (TH), enzimas-chave para a síntese de catecolaminas (Conceição et al., 2013). Além disso, o aumento da espessura da medula induzida pela CORT em animais NL pode estar relacionado ao fato de que, na presença de glicocorticoides, a enzima PNMT (Feniletanolamina N-metiltransferase), que converte norepinefrina em epinefrina, é ativada, indicando que eles são os principais estimuladores da expressão dessa enzima (Wurtman, 1966).

Um achado importante deste trabalho foi que o aumento da medula, a atrofia do córtex adrenal e zonas fasciculadas + reticuladas, a redução das concentrações plasmáticas de corticosterona e, conseqüentemente, a transcrição de CRH e POMC no PVN e hipófise não foram observadas após o tratamento exógeno com CORT nos animais adultos com obesidade infantil. Esses dados indicam que a obesidade induzida por supernutrição na lactação pode causar interrupção do *feedback* negativo dos glicocorticoides exógenos no eixo HHA (Sominsky et al 2017), o que pode ser, pelo menos parcialmente, devido a uma menor capacidade de resposta da autorregulação adrenocortical pela corticosterona em ratos adultos com obesidade infantil. De fato, humanos obesos têm menor capacidade de resposta à supressão do eixo HHA por glicocorticoides exógenos e/ou a resistência ao *feedback* dos glicocorticoides é frequentemente associada à obesidade (Ljung et al. 1996; Ljung et al. 2002; Jessop et al. 2001). Além de estudos com humanos, Torrezan et al. (2019) demonstraram que ratos com obesidade induzida por MSG apresentaram menor sensibilidade ao CRH ou aos glicocorticoides no eixo HHA e, sugerem que essa falta de efeitos na obesidade pode ser resultado da insensibilidade ao *feedback*

ou da alteração em seu limiar; no entanto, os mecanismos subjacentes a esses efeitos ainda precisam ser elucidados.

Em resumo, este estudo foi pioneiro em demonstrar que ratos adultos com obesidade induzida por supernutrição lactacional exibem hiperatividade do eixo HHA, associada à menor expressão de MR no PVN, bem como não são responsivos aos efeitos dos glicocorticoides no balanço energético e *feedback* negativo clássico do HHA.

### **3.2. Estudo 2. Os glicocorticoides contribuem para as alterações metabólicas e hepáticas induzidas pela supernutrição lactacional em ratos adultos.**

Parte dos resultados deste estudo foram submetidos no artigo "**Glucocorticoids contribute to metabolic and liver impairments induced by lactation overnutrition in male adult rats**" para a revista *Frontiers in Physiology*, disponível no anexo C.

#### **RESUMO**

A supernutrição na lactação é um agente programador do metabolismo energético, e sabe-se ainda que a redução do tamanho da ninhada promove o desenvolvimento da obesidade infantil, que persiste até a idade adulta. O metabolismo hepático é prejudicado pela obesidade, e o aumento da concentração plasmática dos glicocorticoides tem sido apontado como possível mediador para o desenvolvimento da obesidade, uma vez que a adrenalectomia bilateral (ADX) é capaz de reduzir a obesidade em diferentes modelos experimentais. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos glicocorticoides nas alterações metabólicas, lipogênese hepática e na via da insulina induzida pela supernutrição na lactação. Para isso, no 3º dia pós-natal (DPN), 3 filhotes (ninhada pequena - SL) ou 10 filhotes (ninhada normal - NL) foram mantidos com cada fêmea. No DPN 60, ratos Wistar foram submetidos à ADX ou cirurgia fictícia (sham), e metade dos animais ADX recebeu corticosterona (CORT- 25 mg/L) no fluido de ingestão. No DPN 73, os animais foram submetidos ao teste de tolerância à glicose e, no DPN 74, foram

submetidos à eutanásia por decapitação para coleta de sangue, remoção e armazenamento do fígado. Os animais SL apresentaram maiores concentrações plasmáticas de corticosterona, ácidos graxos livres (AGL), colesterol total e colesterol LDL, intolerância a glicose, maior peso e área dos adipócitos do tecido adiposo branco, sem alterações nos triacilgliceróis (TAG) e colesterol HDL. O grupo SL também apresentou maior conteúdo de TAG hepático e expressão da enzima ácido graxo sintase (FASN), porém observamos diminuição da expressão de PI3Kp110 no fígado, em comparação aos animais NL. No grupo SL, a ADX diminuiu a concentração plasmática de corticosterona, AGL, TAG e colesterol HDL, atenuou a intolerância a glicose, o peso e área dos adipócitos do tecido adiposo branco, além de reduzir o TAG hepático e a expressão hepática de FASN e IRS2, em comparação com os animais sham. O tratamento com CORT nos animais ADX do grupo SL aumentou a concentração plasmática de TAG e colesterol HDL, bem como o TAG hepático e a expressão hepática de FASN, IRS1 e IRS2, em comparação com animais ADX. Em resumo, a ADX atenuou as alterações plasmáticas e hepáticas observadas após nos animais adultos com obesidade infantil, e o tratamento com corticosterona foi capaz de reverter a maioria dos efeitos induzidos pelo ADX. Assim, o aumento da concentração plasmática de glicocorticoides desempenha um papel fundamental nas alterações hepáticas e plasmáticas induzidas pela supernutrição lactacional em ratos.

**Palavras-chave:** adrenalectomia, corticosterona, redução do tamanho da ninhada, triacilgliceróis, obesidade.

### 3.2.1. INTRODUÇÃO

O ambiente nutricional e/ou hormonal durante o período fetal e/ou pós-natal desempenha um importante papel modulador na vida do indivíduo. Sabe-se que o desenvolvimento de vários órgãos ainda não está completo no nascimento, sendo o período de lactação fundamental para ocorrer sua formação completa (Ellsworth et al., 2018). Assim, esta janela pode ser considerada como um momento vulnerável para a prole, uma vez que os sistemas ainda são plásticos e sensíveis as mudanças no ambiente, resultando em efeitos na vida adulta, conforme bem estabelecido pelo conceito “Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença”, do termo em inglês *Developmental*

## *Origins of Health and Disease (DOHaD).*

A ingestão alimentar no período neonatal é um fator relevante para o desenvolvimento da obesidade na vida adulta (Fiorotto et al., 1991). Nesse contexto, o método de redução do tamanho da ninhada em roedores é uma ferramenta importante para observar os efeitos a longo prazo da supernutrição na lactação, conforme demonstrado pela primeira vez por Kennedy em 1957 (Plagemann, 2006). Este método consiste em alocar os filhotes em ninhadas menores (SL), com 3 filhotes/mãe em relação ao controle com aproximadamente 10 filhotes/mãe. Dessa forma, os animais provenientes de ninhadas SL desenvolvem a obesidade precocemente a qual persiste até a idade adulta (Plagemann 2006; Spencer 2013).

A obesidade é uma importante questão de saúde pública, e dentre as comorbidades relacionadas ao quadro de obesidade tem-se a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma importante preocupação pois ainda não apresenta tratamentos eficazes, a não ser a perda de peso (Kawano e Cohen, 2013). DHGNA é o termo utilizado para abordarmos a histopatologia hepática que inclui desde uma esteatose simples a esteato-hepatite não alcoólica (Cohen et al., 2011; Starley et al., 2010). Em condições fisiológicas, encontra-se uma reduzida concentração hepática de triacilgliceróis (TAG), já que o fígado não atua como depósito de armazenamento de lipídeos. Porém, esse cenário se altera em situações de excesso de carboidratos, pois então o fígado passa a produzir ácidos graxos via lipogênese *de novo* (DNL) e a exportar os TAG pela lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL). O acúmulo de TAG nos hepatócitos é o sinal patognomônico para a DHGNA, a qual se caracteriza pelo desequilíbrio entre a entrada de lipídeos, a partir da absorção de ácidos graxos e da DNL, e a saída de lipídeos como VLDL (Donnelly et al., 2005; Doerge et al., 2006; Bradburry et al., 2006; Nestel et al., 1962; Cohen et al., 2011). O desenvolvimento da DHGNA está relacionado com o comprometimento do metabolismo lipídico hepático dos animais provenientes de programação fetal e neonatal (Oben et al., 2010).

A obesidade está associada à fisiopatologia da DHGNA, uma vez que a capacidade de expansão do tecido adiposo, a fim de armazenar lipídeos é limitada, requerendo que o excesso de TAG seja armazenado nos hepatócitos.

As fontes de TAG no fígado são provenientes do aumento da lipólise (aproximadamente 60%) e da DNL no fígado (25%) (Donnelly et al., 2005). Nesse contexto, a DNL consiste na síntese de ácidos graxos não esterificados a partir da glicose. Para isso, a glicose é convertida em acetil-CoA por meio da glicólise, e o acetil-CoA é então convertido em malonil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACC). A enzima ácido graxo sintase (FASN) é responsável por catalisar a formação de ácido palmítico a partir de malonil-CoA e acetil-CoA. O ácido palmítico é então alongado e dessaturado para gerar ácidos graxos monoinsaturados, que são os principais constituintes dos ácidos graxos dos TAG. Acil-CoAs são esterificados por glicerol-3-fosfato (G-3-P) aciltransferase (GPAT) para formar o ácido lisofosfatídico (LPA) e por 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferase (AGPAT) para formar o ácido fosfatídico (PA). O PA é desfosforilado pela lipina 1 para formar diacilglicerol (DAG), que é esterificado a outra molécula de acil-CoA para formar triacilglicerol pela acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase (DGAT), que parece ser especialmente importante para a produção de VLDL (Wurie et al., 2012; Heeren e Scheja, 2021). Outra molécula importante na DNL é a Apolipoproteína B100 (Apo B100), sintetizada pelos hepatócitos e possui como característica única a capacidade de interagir com espécies lipídicas (fosfolípidos, colesterol, TAG e ésteres de colesterol), utilizadas para a formação de VLDL (Rutledge et al., 2009).

Animais com obesidade durante a infância podem apresentar disfunções metabólicas hepáticas como DHGNA (Oben et al., 2010), aumento de AGL circulantes, hiperinsulinemia, comprometimento da via de sinalização da insulina no fígado e músculo esquelético, além da maior concentração de glicocorticoides circulantes (Hou et al., 2011), uma vez que o sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) desses animais amadurece mais rapidamente (Spencer & Tilbrook, 2009; Boullu-ciocca et al., 2005). Dentro do metabolismo lipídico, os glicocorticoides atuam na síntese e oxidação de ácidos graxos, na esterificação de ácidos graxos em TAG e fosfolípidos e no transporte lipídeos lipoproteicos para fora do fígado (Klausner e Heimberg, 1957). Além disso, de acordo com a literatura, os glicocorticoides têm um papel importante na homeostase energética, capazes de aumentar o apetite e o peso corporal em humanos e roedores (Tataranni et al., 1996; Zakrzewska et al., 1999), sendo que o seu excesso pode contribuir para a adiposidade central, como observado na

síndrome de Cushing (Rebuffé-Scrive et al., 1988). Diferentes modelos de obesidade apresentam maiores concentrações plasmáticas de glicocorticoides e, inversamente, a remoção bilateral das glândulas adrenais, adrenalectomia (ADX), é capaz de atenuar ou prevenir o desenvolvimento da obesidade (Bruce et al., 1982; Yukimura et al., 1978 ; Dubuc & Wilden, 1986; Romsos, D. R., 1991).

Assim, sabe-se que: 1) os glicocorticoides são apontados como possíveis mediadores para o desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades em diferentes modelos experimentais; 2) o método de redução do tamanho da ninhada é um modelo que leva à obesidade e suas comorbidades; 3) animais com obesidade devido à redução da ninhada apresentam disfunções hepáticas, metabólicas e aumento de glicocorticoides circulantes; 4) a ADX reverte vários efeitos metabólicos em modelos de obesidade. Portanto, este estudo levantou a hipótese de que os glicocorticoides contribuem para a dislipidemia e disfunções hepáticas metabólicas em ratos adultos induzidos pela supernutrição neonatal. Para a investigação desta hipótese, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ADX sobre parâmetros biométricos, perfil lipídico plasmático, metabolismo lipídico e via de sinalização da insulina no fígado em animais machos adultos provenientes de ninhadas reduzidas.

### **3.2.2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.2.2.1 Animais Experimentais**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (n=77) obtidos por meio dos acasalamentos de matrizes (n=27) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A prenhez foi constatada mediante a observação de espermatozoides no esfregaço vaginal juntamente com células características da fase do estro. Após o nascimento, o ajuste do tamanho da ninhada ocorreu no dia pós-natal 3 (DPN), e assim foram mantidos 3 filhotes, 2 machos e 1 fêmea (ninhada reduzida – SL) ou 10 filhotes, 5 machos e 5 fêmeas (ninhada normal – NL) com cada fêmea (Stopa et al., 2021). Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação. Após o desmame, apenas os animais machos foram alojados em grupos de 3 a 4 ratos do mesmo grupo experimental em cada caixa. As fêmeas foram utilizadas em experimentos de outro estudo do nosso grupo (Stopa et al., 2021).

Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, com ambiente de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura ( $22 \pm 2$  °C) controladas, e água e alimentação à vontade, exceto nas horas de restrição alimentar antes do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) e eutanásia. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo do Departamento de Ciências Fisiológicas-CCB/UEL. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação (número CEUA: 3457.2109.11, Of. Circ. CEUA 60/2019).

### **3.2.2.2 Procedimentos cirúrgicos: adrenalectomia ou cirurgia fictícia (sham).**

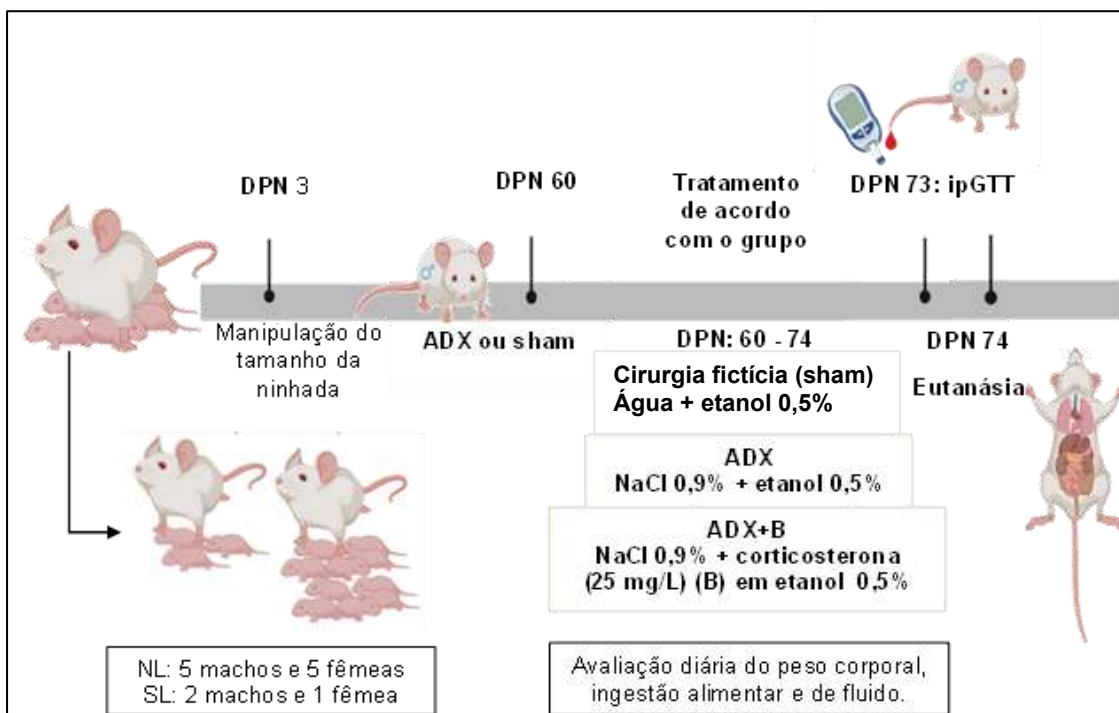
Os ratos foram submetidas à cirurgia de ADX bilateral ou cirurgia *sham*. Os animais, em ambas as cirurgias, foram anestesiados com a associação de ketamina (K, 100 mg/kg, Agener União) e xilazina (X, 20 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, Brazil, 2%), por via intraperitoneal (ip). Foi realizada a tricotomia da região dorsal e realizada a incisão, tendo como ponto de referência o ângulo entre a última costela e a coluna vertebral. Depois de identificados os músculos paravertebrais, estes foram seccionados, bilateralmente, permitindo a identificação dos órgãos abdominais. Nos animais ADX, com o auxílio de uma pinça, o tecido adiposo perirrenal foi exteriorizado e a glândula adrenal seccionada. Para os animais da cirurgia fictícia (sham), foram realizados os mesmos procedimentos anteriores, no entanto, não ocorreu a remoção das glândulas adrenais. Imediatamente após, as incisões foram suturadas e higienizadas com álcool 70%. Após a sutura, os animais receberam tratamento profilático com analgésico paracetamol (200 mg/mL, i.p.; dose de 200 mg/kg de peso corpóreo) e antibiótico (Pentabiótico Veterinário, Fort Dodge; 1.200.000 UI de Penicilinas: 0,1 mL/100 g peso corporal ou 24.000 UI/ 100 g peso corporal, im), sendo recolocados nas caixas contendo fluidos (de acordo com o grupo experimental) e alimentação à vontade, onde permaneceram até o dia do experimento.

### **3.2.2.3 Protocolo experimental**

A avaliação do peso dos animais foi realizada nos DPN 3, 7, 10, 14, 17 e 21 (Stopa et al., 2021). O desmame ocorreu no DPN 21. A partir do DPN 25, os animais foram pesados a cada 5 dias e a ingestão alimentar também foi avaliada. O protocolo experimental começou a partir do DPN 60. Após 60 dias do nascimento, os animais de cada ninhada (NL e SL) foram submetidos à cirurgia de adrenalectomia bilateral (ADX) ou cirurgia fictícia (sham), e foram mantidos em caixas coletivas constituindo os seguintes grupos experimentais para cada ninhada:

- Grupo de cirurgia fictícia (sham): ratos mantidos com acesso livre à água contendo etanol 0,5%, como única fonte de líquido;
- Grupo ADX: ratos adrenalectomizados bilateralmente (ADX) e mantidos com acesso à solução de NaCl 0,9% contendo etanol 0,5%, como única fonte de líquido;
- Grupo ADX+B: ratos adrenalectomizados bilateralmente (ADX) e mantidos com acesso à solução de NaCl 0,9%, contendo corticosterona (25 mg/L) diluída em etanol 0,5% (B).

Após as cirurgias, os animais foram mantidos com acesso à solução água corrente contendo etanol 0,5%, ou NaCl 0,9% contendo etanol 0,5%, ou NaCl 0,9% contendo corticosterona (25mg/L) (Uchoa et al., 2009 a,b , 2010, 2012) diluída em etanol 0,5% durante 14 dias, de acordo com o grupo experimental, como descrito anteriormente. Todos os animais foram diariamente pesados e a quantidade de alimento e fluido ingerido também foi avaliada diariamente, pelo período de 14 dias. No DPN 73, os animais foram mantidos em restrição alimentar, das 08h às 14h, para a realização do ipGTT. No DPN 74, os animais foram pesados e a distância nasoanal foi avaliada para a realização do índice de Lee (Bernardis e Patterson, 1968), e foram mantidos em restrição alimentar, das 08h às 14h, para a realização da eutanásia por decapitação nos animais não anestesiados, às 14h. Após a eutanásia, o sangue foi coletado para avaliação das concentrações plasmáticas de corticosterona, ácidos graxos livres (AGL), TAG, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e baixa densidade (LDL). O tecido adiposo retroperitoneal e epididimal foram retirados, pesados e armazenados para análise histomorfométrica, bem como retiramos e armazenamos o lobo esquerdo do fígado para análises do conteúdo de TAG e proteínas por *Western blotting* (Fig. 9).



**Fig.9.** Delineamento do protocolo experimental. NL: ninhada normal; SL: ninhada reduzida; DPN: dia pós natal; ipGTT: teste de tolerância a glicose via intraperitoneal.

### 3.2.2.4 Avaliação da ingestão alimentar, ingestão de fluido e índice de Lee.

Avaliamos durante todo o período experimental o peso corporal (expresso em gramas), ingestão alimentar (g/100g) e ingestão de fluidos (mL/100g) dos animais. Os animais receberam ração para roedores (Nuvilab CR1, Nuvital®) diariamente. Para a avaliação da ingestão alimentar e de fluidos, utilizamos a diferença entre a oferta e a sobra de alimentos/fluidos, para calcularmos a quantidade diária de alimento/fluido. O índice de Lee foi avaliado no final de cada experimento, e calculado considerando-se o peso corporal e o comprimento nasoanal (CNA), dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal em grama pelo CNA em centímetros e multiplicando-se por mil [ $\sqrt[3]{\text{Peso (g)}/\text{CNA (cm)}}$ ] (Bernardis & Peterson, 1968).

### 3.2.2.5 Teste de tolerância a glicose intraperitoneal (ipGTT).

Após restrição alimentar das 8-14h, às 14h do DPN 73, foi coletada uma gota de sangue da cauda de cada animal para a determinação da glicemia basal, por meio da fita teste de determinação de glicose sanguínea do aparelho Accu-Check Advantage II (Roche, Taquara, RJ, Brazil). Imediatamente após, foi realizada a administração por via intraperitoneal de glicose 25% na dose de 1,0

g/kg de peso corporal de animal. A partir de então, foram realizadas dosagens de glicose sanguínea pela fita teste nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose. Após os 120 minutos, os animais retornaram para suas caixas com alimentação e fluidos à vontade (De Souza et al. 2019; Stopa et al. 2019; Stopa et al. 2021).

### **3.2.2.6 Eutanásia**

A fim de evitarmos alterações bioquímicas e hormonais induzidas pela anestesia (Windeløv et al 2016; Guarino et al. 2013), realizamos a eutanásia por decapitação nos animais não- anestesiados, após 6 horas de restrição alimentar, conforme aprovado pelo Comitê de ética de uso de animal para experimentação (número CEUA: 3457.2109.11, Of. Circ. CEUA 60/2019). Imediatamente após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados, a 2500 rpm. e 4°C, durante 20 minutos para as análises bioquímicas. Analisamos as concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol LDL e HDL, TAG, AGL e corticosterona. Imediatamente após a decapitação, a cavidade abdominal e o escroto foram abertas, os tecidos adiposos brancos (subdivisões epididimal e retroperitoneal) foram visualizados e cuidadosamente removidos e pesados, bem como retiramos e armazenamos o fígado a -80°C.

### **3.2.2.7 Dosagens plasmáticas**

A determinação das concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol HDL (kits comerciais, biotecnologia VIDA, MG), colesterol LDL (kits comerciais, Wiener lab., Argentina), TAG (kits comerciais, Laborclin, PR) e AGL (Falholt et al. 1973) foi realizada utilizando o método de espectrofotometria. Para determinar a concentração plasmática de corticosterona utilizamos a metodologia modificada de Guillemin et al. (1958) por fluorimetria (de Souza et al. 2019; Stopa et al. 2019; Stopa et al. 2021).

### **3.2.2.8 Análise histomorfométrica do tecido adiposo.**

As amostras de tecido adiposo foram fixadas em formaldeído 4% em solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4, por 48 h a 4° C. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em concentrações graduadas de etanol,

clareados em xilol e incluídos em parafina a 62°C. Os cortes de 12 mm obtidos em micrótomo foram corados por hematoxilina e eosina e, em seguida, capturados com o auxílio de um sistema de imagem acoplado a um microscópio (Motic, Xiamen, China), onde foram analisados 3 campos de cada animal, utilizando o software image J para a determinação da área dos adipócitos (Parlee et al., 2014).

### **3.2.2.9 Análise do conteúdo de TAG no fígado.**

Para a determinação do conteúdo de triglicérides no fígado, a extração dos lipídeos foi realizada com a mistura clorofórmio-etanol, seguindo o método de Folch (Folch et al., 1957), e a determinação do conteúdo de TAG no extrato lipídico foi por meio de ensaio enzimático (kit comercial, Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil) e expressos em miligramas de triglicérides por 100 miligramas de fígado.

### **3.2.2.10 Análise da expressão de proteínas do fígado por Western-Blotting.**

As amostras do fígado foram homogeneizadas em tampão de extração (NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, EDTA 10 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 5 mM, NaF 10 mM, Triton X-100 1%, Glicerol 10%, Tris 20 mM, PMSF 2 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2.5 mM, coquetel inibidor de protease (cOmplete™) com pH 7) e então foram centrifugadas (12.000 r.p.m., 0 °C, 40 min) sendo o sobrenadante separado em alíquotas e utilizado para a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Utilizamos em todas as análises quantidades iguais (35µg) de proteínas totais e as aplicamos em gel de poliacrilamida 8%, e posteriormente foram submetidas à eletroforese (60 V) e a eletro-transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (2 horas - 80 V). A membrana de nitrocelulose foi corada com ponceau-S, para detecção reversível das bandas de proteínas após a transferência. Em seguida, a membrana foi lavada com PBST 0,1% (tampão salina fosfato com 0,1% de Tween-20), submetida ao bloqueio com BSA livre de gorduras à 4% diluída em PBST 0,1% por 1 h para impedir ligações inespecíficas entre a membrana e os anticorpos, e por fim, incubada com os anticorpos primários diluídos em BSA 4% em PBST 0,1%, como indicados na Tabela 1, *overnight* a 4° C.

Posteriormente, a membrana foi lavada com PBST 0,1% (4x por 5 min) e incubada com o respectivo anticorpo secundário (IgG de coelho, Jackson ImmunoResearch, nº 111-035-003; IgG de camundongo, Jackson ImmunoResearch, nº 115-035-003; IgG de cabra, Jackson ImmunoResearch, nº 305-035-003; 1 :5000 em PBST a 0,1%; temperatura ambiente) conjugado com peroxidase (1:5000 em PBST 0,1%) por 75 min à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas com PBST 0,1% (4x por 5 min) e submetidas à reação de quimioluminescência (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, #1705061), para detecção dos blots. Os blots foram visualizados em fotodocumentador (GenBox, Syngene®) e analisados usando o programa Image J (National Institutes of Health, USA). A densidade dos blots foi normalizada pela proteína constitutiva vinculina.

**Tabela 1.** Anticorpos primários usados no Western blotting.

<b>Proteína alvo</b>	<b>Nº Catálogo</b>	<b>Diluição</b>
Vinculina	sc-73614	1:500
Receptor de insulina fosforilado (p-IR)	GTX25681	1:1000
Receptor de insulina (IR)	#30255	1:1000
Substrato do receptor de insulina 1 (IRS1)	sc-559	1:1000
Substrato do receptor de insulina 2 (IRS2)	sc-1555	1:500
Fosfatidilinositol-3-quinase p110 $\alpha$ (p <sup>110<math>\alpha</math></sup> PI3K)	#4255	1:1000
Proteína quinase B (AKT)	sc-8312	1:1000
Proteína quinase B fosforilada (Ser <sup>473</sup> p-AKT)	sc-7985	1:1000
Transportador de glicose tipo 2 (GLUT2)	sc-9117	1:500
Ácido graxo sintase (FASN)	ab22759	1:1000
Diacilglicerol aciltransferase 2 (DGAT2)	sc-66859	1:1000
Apolipoproteína B100 (APOB100)	MABS2046	1:1000
11 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1)	sc-20175	1:1000

### 3.2.2.11. Análise estatística.

A distribuição normal e a homogeneidade dos dados foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente, e os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do pós- teste de Tukey. Os dados

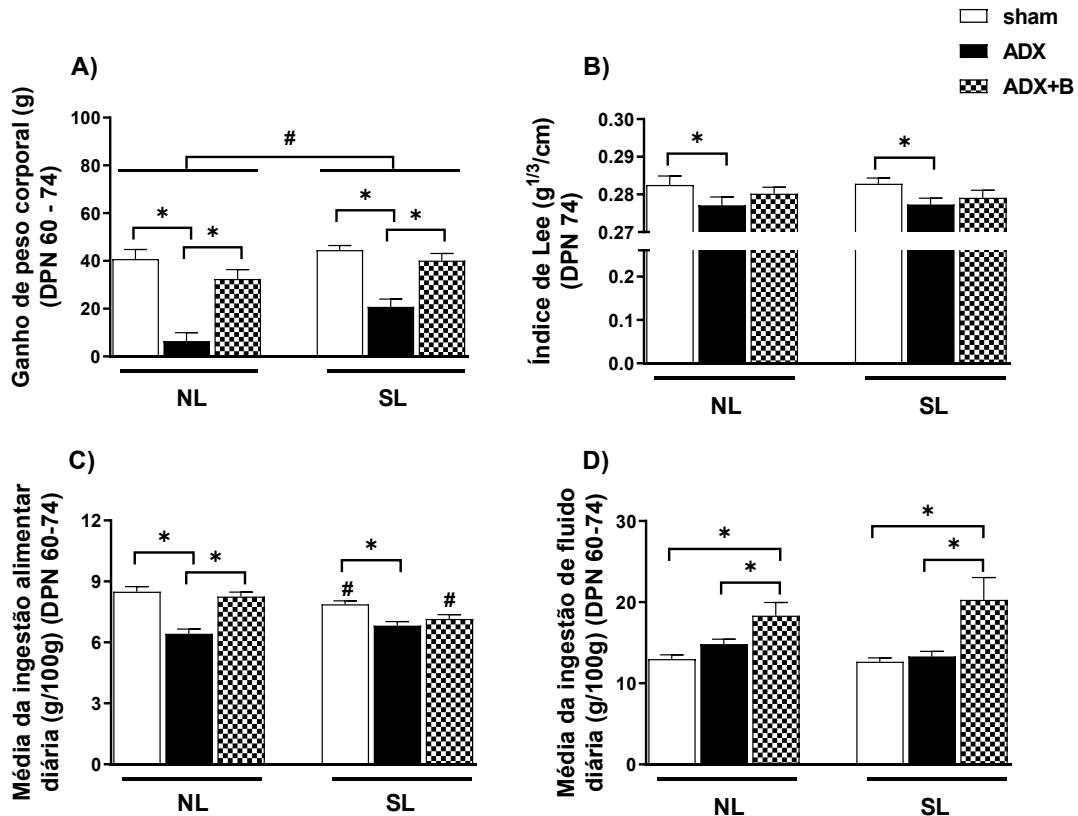
foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ .

### 3.2.3. RESULTADOS

#### ***A adrenalectomia atenua as alterações nos parâmetros ponderais e bioquímicos induzidas pela supernutrição durante a lactação pelo método de redução tamanho da ninhada em ratos:***

Observamos que não houve interação entre os grupos e o tamanho da ninhada (NL e SL) sobre o ganho de peso corporal [ $F(2; 65)=1,18, p=0,31$ ], com efeito do tamanho da ninhada (NL e SL) [ $F(1; 65 )=9,11, p=0,004$ ] e grupos (sham, ADX e ADX+B) [ $F(2; 65)=37,5, p < 0,001$ ]. Os animais SL demonstraram aumento no ganho de peso corporal em comparação com os grupos NL. Os animais ADX apresentaram redução do ganho de peso corporal em comparação com o grupo sham e o tratamento com corticosterona aumentou o ganho de peso corporal, em comparação com o grupo ADX em ambas as ninhadas (Fig. 10.A). Não houve interação entre os grupos e o tamanho da ninhada no índice de Lee [ $F(2; 68)= 0,09, p=0,914$ ], sem efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1; 68)=0,015, p=0,903$ ] e com efeitos dos grupos [ $F(2; 68)=4,11, p=0,021$ ]. Os grupos ADX em ambas as ninhadas demonstraram diminuição no índice de Lee em comparação com seus respectivos animais sham (Fig. 10.B).

Houve interação entre os grupos e tamanho da ninhada na ingestão de alimentar [ $F(2; 68)=5,88, p=0,004$ ]. A ingestão alimentar dos animais SL dos grupos sham e ADX+B foi menor do que seus respectivos grupos NL. Os grupos ADX, em ambas as ninhadas, mostraram redução na ingestão de alimentar, em comparação com animais sham, e o tratamento com corticosterona reverteu os efeitos da ADX nos animais NL (Fig. 10.C). Não houve interação entre grupos e tamanho da ninhada na ingestão de fluidos [ $F(2; 68)=1,31, p=0,28$ ], sem efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1,68)=2,05, p=0,16$ ], mas efeitos dos grupos [ $F(2; 68)=15,33, p < 0,001$ ]. Os grupos ADX + B em ambas as ninhadas apresentaram maior ingestão de fluidos em comparação com os grupos sham e ADX (Fig. 10.D).



**Fig. 10.** Ganho de peso corporal do DPN 60 a 74 (A), índice de Lee ( $\text{g}^{1/3}/\text{cm}$ ) (B) em DPN 74, média da ingestão alimentar diária ( $\text{g}/100\text{g}$ ) (C) e média da ingestão de fluido diária ( $\text{mL}/100\text{g}$ ) do DPN 60 a 74 (D) de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL): sham; ADX; ADX+B. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo teste pós-teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$  SL versus NL; B= corticosterona ( $n = 13$ ).

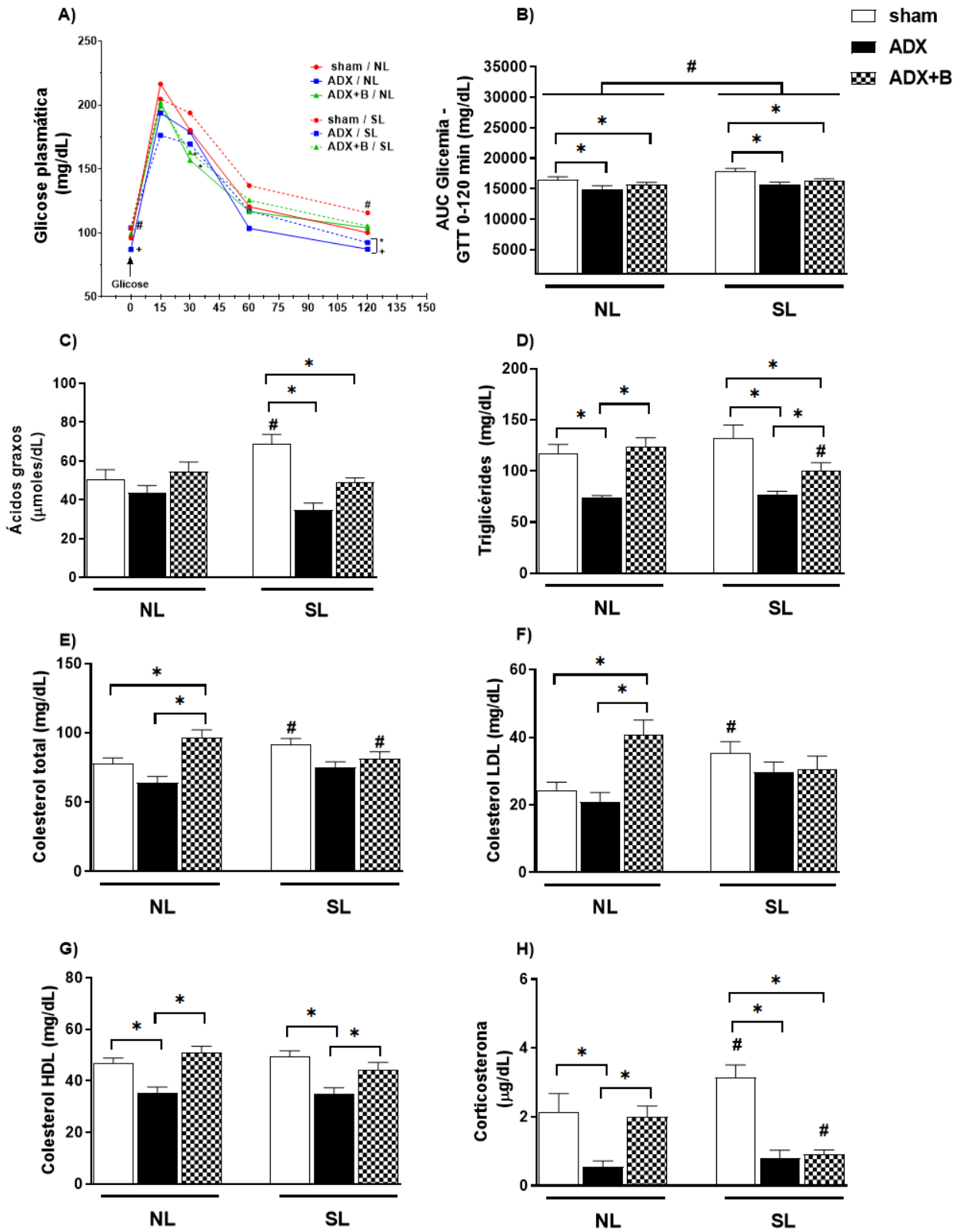
Os grupos SL-ADX e SL-sham apresentaram aumento na glicemia basal ( $p=0,01$ ) e em 120 min ( $p=0,02$ ), respectivamente, após sobrecarga de glicose via intraperitoneal, em comparação com seus respectivos grupos NL. Aos 30 min após a sobrecarga de glicose, observamos que o tratamento com corticosterona promoveu aumento da glicemia, em ambas as ninhadas (NL:  $p=0,044$  / SL:  $p=0,013$ ) em comparação com o seu respectivo grupo sham, e em 120 min (NL:  $p=0,02$  / SL:  $p=0,03$ ) em comparação com o grupo ADX. Observou-se que o grupo ADX de ambas as ninhadas apresentou menor glicemia aos 120 min em comparação com seus respectivos grupos sham (NL:  $p=0,03$  / SL:  $p=0,0001$ ) (Fig. 11.A). Toda resposta da curva do ipGTT foi integrada na área sob a curva

(ASC) do ipGTT (Fig. 11.B), demonstrando não haver interação entre grupos e tamanho da ninhada [F(2; 60)=0,62, p=0,54], mas com efeitos do grupo [F(2; 60)=9,59, p<0,001] e tamanho da ninhada [F(1; 60)=4,40, p=0,04]. A redução do tamanho da ninhada promoveu aumento (p<0,05) da ASC do ipGTT em todos os grupos SL em comparação aos animais NL. Em ambas as ninhadas, a ADX reduziu a glicose plasmática em comparação com animais sham, sendo que o tratamento com corticosterona não alterou essa resposta.

Houve interação entre os grupos e o tamanho da ninhada nas concentrações plasmáticas de AGL [F(2; 57)=5,59, p=0,006] e TAG [F(2; 59)=3,29, p=0,044]. Em animais sham, a redução do tamanho da ninhada induziu aumento nas concentrações plasmáticas de AGL, e a ADX reduziu esta resposta, porém sem efeitos tratamento com corticosterona. A ADX reduziu as concentrações plasmáticas de TAG e o tratamento com corticosterona reverteu essa resposta em ambas as ninhadas, mas as concentrações plasmáticas de foram menores nos animais ADX+B da SL do que nos grupos ADX-SL e ADX+B-NL (Fig. 11 C e D).

Observamos interação entre grupos e tamanho da ninhada (NL e SL) nas concentrações plasmáticas de colesterol total [F(2; 56)=5,54, p=0,006] e LDL [F(2; 58)=5,52, p=0,006], sem interação no colesterol HDL [F(1; 61)=2,22, p=0,117]. A redução do tamanho da ninhada promoveu maiores concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL no grupo sham em comparação aos animais NL-sham. No grupo NL, o tratamento com corticosterona em animais ADX induziu maiores concentrações de colesterol total e LDL em comparação aos animais sham e ADX (Fig. 11 E e F). As concentrações plasmáticas de colesterol HDL apresentaram efeitos do grupo [F(2; 61)=19,72, p<0,001], sem efeitos do tamanho da ninhada [F(1; 61)=0,7, p<0,407]. A ADX reduziu (p<0,001) as concentrações plasmáticas de HDL, em comparação com o grupo sham, e o tratamento com corticosterona reverteu (p<0,001) esse efeito em ambas as ninhadas (Fig. 11 G). Houve interação entre o grupo e o tamanho da ninhada nas concentrações plasmáticas de corticosterona [F (2; 47) =5,16, p=0,009]. A redução do tamanho da ninhada induziu maiores (p<0,05) concentrações plasmáticas de corticosterona em animais sham em comparação com seus respectivos animais NL. A adrenalectomia reduziu (p<0,05) a concentração plasmática de corticosterona em ambas as ninhadas e o tratamento com

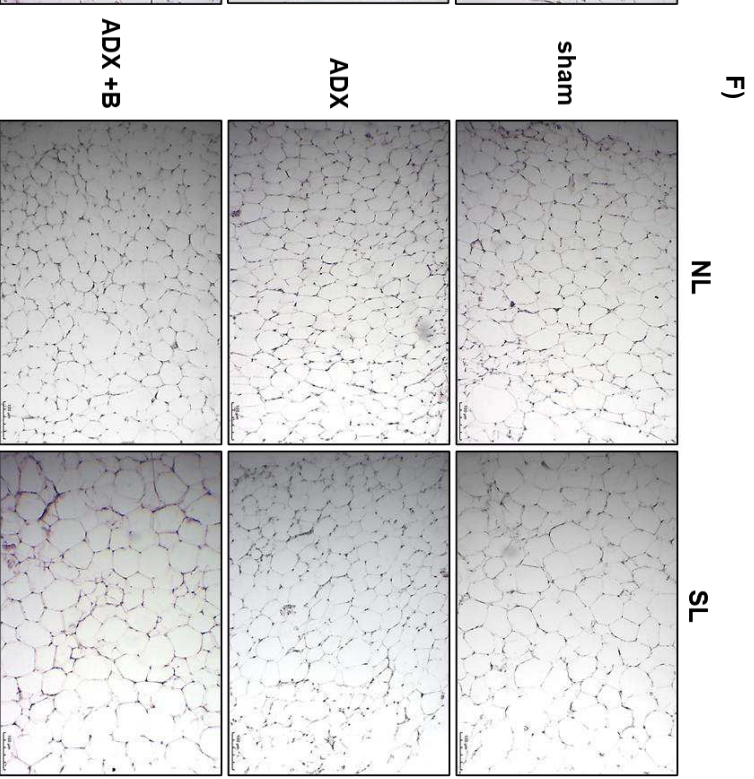
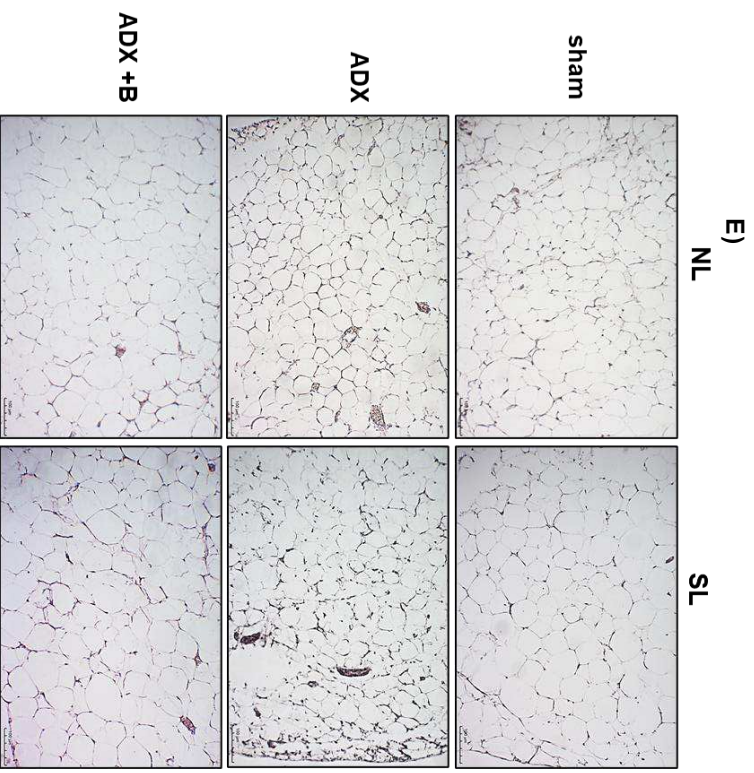
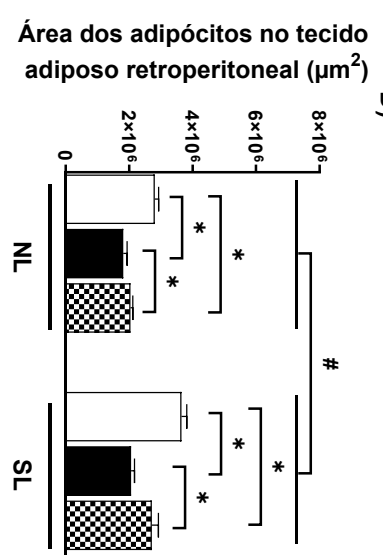
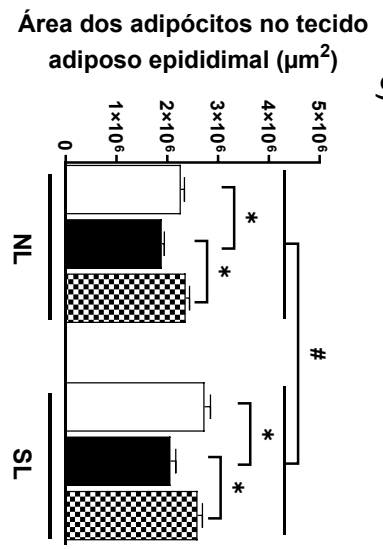
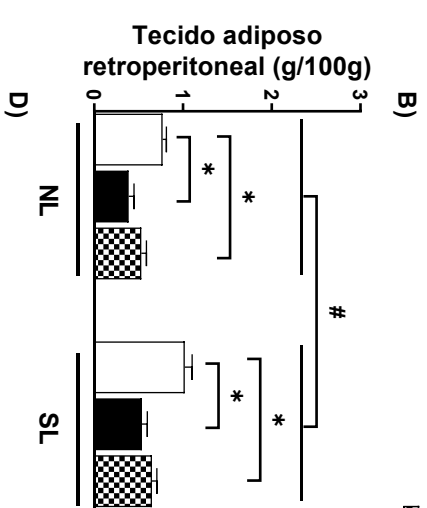
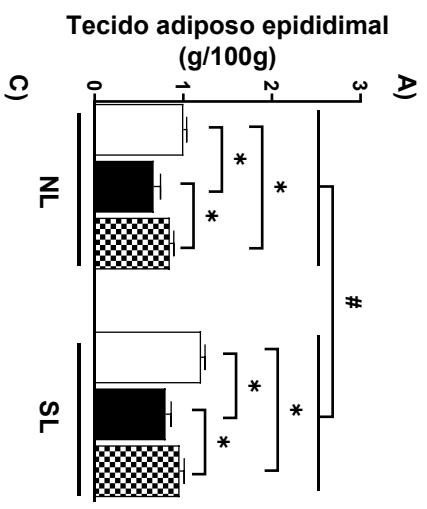
corticosterona aumentou a concentração plasmática de corticosterona nos animais NL, não apresentando efeitos nos animais SL (Fig. 11 H).



**Fig. 11.** Glicose plasmática - ipGTT (mg/dL) (DPN 73) (A), ASC Glicose plasmática - ipGTT 0-120 min (mg/dL) (DPN 73) (B), concentrações plasmáticas de AGL ( $\mu$ moles/dL) (C), triacilgliceróis (mg/dL) (D), colesterol total (mg/dL) (E), colesterol HDL (mg/dL) (F), colesterol LDL (mg/dL) (G) e corticosterona plasmática ( $\mu$ g/dL) (H) de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL) no DPN 74: sham; ADX; ADX+B. Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo pós-teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05 versus respectivo grupo sham; #p < 0,05 SL NL; +p < 0.05 versus respectivo grupo ADX+B. B= corticosterona (n = 13).

Não houve interação entre grupos e tamanho da ninhada (NL e SL) no peso do tecido adiposo branco (TAB) epididimal [F(2; 66)=0,39, p=0,68] e retroperitoneal [F(2; 67)=0,67, p=0,52], com efeito do tamanho da ninhada [epididimal: (F(1,66)=11,46, p=0,001); retroperitoneal (F(1,67)=12,21, p<0,001)] e grupos [epididimal: (F(2,66)=23,60, p<0,001); retroperitoneal (F(2,67)=27,31, p<0,001)] em ambos os depósitos de TAB. (Fig. 12 A e B). Os animais SL apresentaram aumento (p<0,001) no peso de ambos depósitos de TAB em comparação com seus respectivos grupos NL. A ADX reduziu o peso de ambos TAB tanto em animais NL quanto SL. No TAB epididimal, o tratamento com corticosterona aumentou a área de adipócitos desse tecido adiposo em comparação com os animais ADX de ambas ninhadas, sem efeitos no TAB retroperitoneal. Não observamos interação entre a ninhada e o grupo na área dos adipócitos do TAB epididimal (F(2,39)=1,55, p=0,23) e do TAB retroperitoneal (F(2,37)=2,01, p=0,15), com efeitos do tamanho da ninhada no tecido adiposo epididimal (F(1,39)=16,31, p<0,001) e retroperitoneal (F(1,37)=25,80, p<0,001) e dos grupos no tecido adiposo epididimal (F(2,39)=22,30, p<0,001) e retroperitoneal (F(2,39)=44,56, p<0,001). A redução do tamanho da ninhada promoveu aumento na área dos adipócitos do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal em relação aos seus respectivos animais NL. A ADX reduziu a área dos adipócitos de ambos tecidos adiposos tanto nos animais NL quanto SL. Em ambas ninhadas, o tratamento com corticosterona aumentou a área de adipócitos dos dois depósitos de TAB em comparação com os animais ADX (Fig.12 C e D).

□ sham  
 ■ ADX  
 ▨ ADX+B



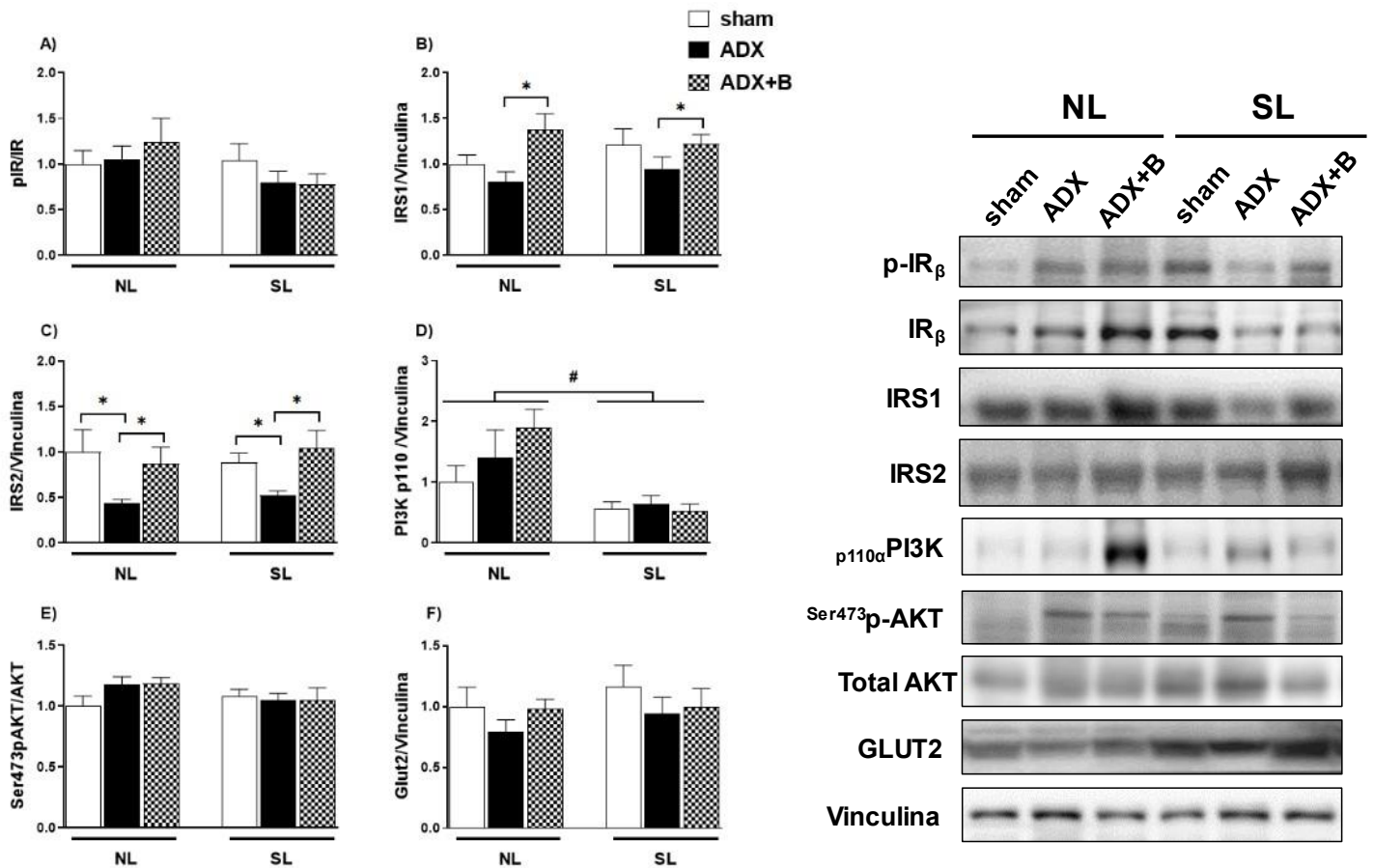
**Fig. 12.** Peso do tecido adiposo epididimal (g/100g) (A), peso do tecido adiposo retroperitoneal (g/100g) (B), área dos adipócitos do tecido adiposo epididimal ( $\mu\text{m}^2$ ) (C), área dos adipócitos do tecido adiposo retroperitoneal ( $\mu\text{m}^2$ ) (D), fotomicrografias representativas (ampliação de 100 $\times$ ) do tecido adiposo epididimal (E), e do tecido adiposo retroperitoneal (F) coradas com hematoxilina-eosina, de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL): sham; ADX; ADX+B. Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ . Os dados foram analisados por Anova de duas vias, seguido pelo teste pós- teste de Tukey e expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ ; # $p < 0,05$  SL versus NL; B= corticosterona (n = 13).

***Efeitos da adrenalectomia e tratamento com corticosterona na via de sinalização da insulina hepática de ratos adultos com supernutrição na lactação:***

Não houve interação entre os grupos e o tamanho da ninhada na expressão de pIR/IR [ $F(2; 50)=1,08, p=0,35$ ], sem efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;50)=2,56, p=0,12$ ] e grupos [ $F(2; 50)=0,18, p=0,84$ ] (Fig. 13 A). Também não foi observada interação entre os grupos e o tamanho da ninhada em IRS1/Vinculina [ $F(2;50)=1,00, p=0,37$ ], sem efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;50)=0,32, p=0,57$ ] e com efeitos de grupos [ $F(2;50)=4,67, p=0,014$ ] (Fig. 13 B). O tratamento com corticosterona nos animais ADX promoveu maior expressão de IRS1 no fígado de ambas as ninhadas. Não observamos interação entre os grupos e o tamanho da ninhada em IRS2/Vinculina [ $F(2;50)=0,13, p=0,88$ ], sem efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;50)=2,55, p=0,12$ ] e com efeitos dos grupos [ $F(2;50)=12,59, p < 0,001$ ]. Os animais ADX de ambas as ninhadas apresentaram diminuição na expressão de IRS2, em comparação com os animais sham, e o tratamento com corticosterona reverteu esta resposta (Fig. 13 C).

Não ocorreu interação entre os grupos e o tamanho da ninhada em PI3K/Vinculina [ $F(2;47)=1,72, p=0,19$ ], com efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;47)=15,76, p < 0,001$ ] e sem efeito dos grupos [ $F(2;47)=0,88, p=0,42$ ] (Fig. 13 D). A redução do tamanho da ninhada promoveu diminuição na expressão de PI3K/Vinculina em comparação com os respectivos animais NL. Não houve interação entre os grupos e o tamanho da ninhada na expressão de

Ser<sup>473</sup>pAKT/AKT [F(2; 50)=1,41, p=0,25], sem efeitos do tamanho da ninhada [F(1;50)=1,71, p=0,20] e grupos [F(2 ; 50)=1,21, p=0,31] (Fig.13 E). Não observou-se interação entre os grupos e tamanho da ninhada na expressão de Glut 2/Vinculina [F(2;49)=0,19, p=0,83], sem efeitos do tamanho da ninhada [F(1;49)=0,99, p=0,33] e grupos [F(2;49)=1,19, p=0,31] (Fig.13 F).



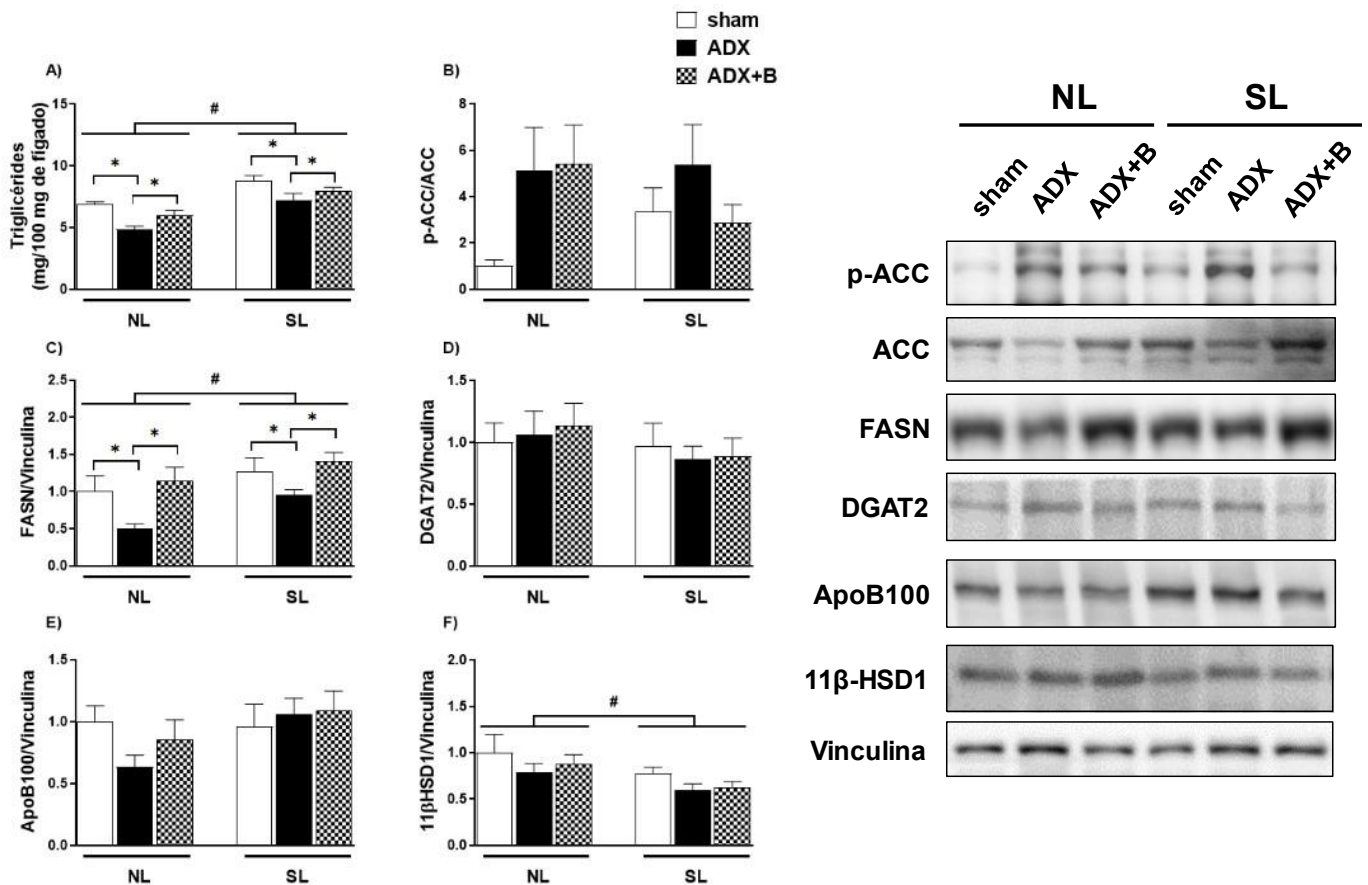
**Fig. 13.** Expressão hepática do receptor de insulina (IR) (A), substrato do receptor de insulina (IRS) 1(B), substrato do receptor de insulina (IRS) 2 (C), PI3Kp110 (D), Ser<sup>473</sup>pAKT/AKT (E) e GLUT2 (F) de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL) no DPN 74: sham; ADX; ADX+B. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05; #p < 0,05 SL versus NL; B= corticosterona (n = 13).

***Efeitos da adrenalectomia e tratamento com glicocorticoide no metabolismo lipídico do fígado de ratos adultos com supernutrição na lactação:***

Não houve interação entre os grupos e o tamanho da ninhada em relação ao conteúdo de triacilgliceróis hepáticos [ $F(2;52)=0,27$ ,  $p=0,76$ ], com efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;52)=48,73$ ,  $p<0,001$ ] e grupos [ $F(2;52)=12,73$ ,  $p<0,001$ ]. Os animais SL apresentaram maior ( $p<0,05$ ) teor de TAG hepáticos do que os animais NL. A ADX promoveu redução ( $p<0,05$ ) no TAG hepáticos e o tratamento com corticosterona reverteu essa resposta em ambas as ninhadas (Fig. 14 A).

Notamos que não houve interação entre os grupos e o tamanho da ninhada na expressão de p-ACC/ACC [ $F(2;45)=1,60$ ,  $p=0,21$ ], sem efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;45)=0,0003$ ,  $p=0,99$ ] e com efeitos de grupos [ $F(2;45)=2,49$ ,  $p=0,21$ ] (Fig. 14 B). Não foi observada interação entre os grupos e o tamanho da ninhada na expressão de FASN/Vinculina [ $F(2;47)=0,24$ ,  $p=0,79$ ], com efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;47)=7,01$ ,  $p=0,011$ ] e grupos [ $F(2;47)=6,82$ ,  $p=0,003$ ]. A redução do tamanho da ninhada promoveu aumento na expressão de FASN/Vinculina em comparação com animais NL. A adrenalectomia promoveu redução na expressão de FASN/Vinculina e o tratamento com corticosterona foi capaz de reverter essa resposta em ambas as ninhadas (Fig. 14 C).

Não houve interação entre os grupos e o tamanho da ninhada na expressão de DGAT2/Vinculina [ $F(2;50)=0,06$ ,  $p=0,94$ ], sem efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;50)=1,92$ ,  $p=0,17$ ] e grupos [ $F(2;50)=0,06$ ,  $p=0,94$ ] (Fig. 14 D). Também não ocorreu interação entre os grupos e tamanho da ninhada em APOB100/Vinculina [ $F(2;50)=1,22$ ,  $p=0,30$ ], sem efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;50)=2,96$ ,  $p=0,092$ ] e grupos [ $F(2;50)=0,53$ ,  $p=0,59$ ] (Fig. 14 E). Em relação à 11 $\beta$ -HSD1, não observamos interação entre os grupos e tamanho da ninhada [ $F(2;50)=0,05$ ,  $p=0,95$ ], com efeitos do tamanho da ninhada [ $F(1;50)=6,27$ ,  $p=0,02$ ] e sem efeitos de grupos [ $F(2;50)=1,64$ ,  $p=0,20$ ] (Fig. 6 A). Todos os animais SL apresentaram diminuição da expressão de 11 $\beta$ -HSD1, em comparação com os respectivos animais NL (Fig. 14 F).



**Fig. 14.** Triglicérides hepáticos (mg/mg de fígado) (A), expressão hepática da enzima ácido graxo sintase (FASN) (B), acetil-CoA carboxilase (p-ACC/ACC) (C), diacilglicerol aciltransferase (DGAT) 2 (D), Apo B100 (E) e 11β-hidroxiesteroide desidrogenase 1 (11β-HSD1) (F) de ratos de ninhadas normais (NL) e reduzidas (SL) no DPN 74: sham; ADX; ADX+B. Os dados são expressos como média ± EPM. \*p < 0,05; #p < 0,05 SL versus NL; B= corticosterona (n = 13).

### 3.2.4. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar a contribuição dos glicocorticoides nas funções metabólicas e lipídicas do fígado em ratos Wistar adultos com supernutrição lactacional. Para isso, utilizamos como ferramentas para atingirmos nossos objetivos, a avaliação dos efeitos da ADX e do tratamento com corticosterona nesses animais. Este estudo é pioneiro em demonstrar que a ADX atenuou as alterações plasmáticas e hepáticas observadas após a supernutrição na lactação, e o tratamento com corticosterona foi capaz de reverter a maioria dos efeitos induzidos pela ADX, indicando que os glicocorticoides circulantes contribuem para o prejuízo nas funções hepáticas e alterações bioquímicas induzidas pela obesidade durante a infância em ratos

adultos.

Existem diferentes modelos que podem ser utilizados a fim de se alcançar a obesidade em roedores, dentre as opções, o método de redução do tamanho da ninhada tem ganhado bastante destaque para a observação das consequências da superalimentação neonatal precoce (Plagemann et al., 1999a; Plagemann et al., 1999b). Nesse modelo, ocorre uma diminuição da competição pelo leite materno durante o período de amamentação, aliado ao fato de que vários autores afirmam que a composição do leite materno é modificada também, apresentando assim maior concentração de lipídeos e principalmente aumento de TAG (Cunha et al., 2009 ; Moreira et al., 2009; Sefcikova et al., 2011).

Segundo vários autores, o método de redução do tamanho da ninhada programa o excesso de peso na idade adulta (Rodrigues et al., 2009; Rodrigues et al., 2011; Ferretti et al., 2011; Plagemann et al., 1992; Boullu-Ciocca et al., 2005 ; Conceição et a., 2011). O aumento do ganho de peso corporal, bem como alteração do perfil lipídico em animais SL vão ao encontro a dados da literatura que apontam que animais advindos de ninhadas reduzidas apresentam alterações relacionadas à obesidade que persistem até a idade adulta, como o maior ganho de peso corporal, acompanhado da maior concentração de AGL (Bei et al. 2015) e colesterol total (Hahn, 1984; Enes-Marques et al., 2020), sem alterações nos triglicérides plasmáticos (Conceição et al. 2013, Rodrigues et al., 2007).

Estudos observaram que após o desmame de ratos e camundongos de ninhadas reduzidas houve o aumento no tecido adiposo branco visceral, acompanhado do aumento na superfície do adipócito (Boullu-Ciocca et al., 2005; 2008; Hou et al., 2011). O tecido adiposo subcutâneo desses animais também aumenta durante a adolescência, porém na vida adulta o mesmo não ocorre, indicando que o maior peso corporal e peso do tecido adiposo são devidos principalmente ao aumento da massa de tecido adiposo visceral (Wiedmer et al., 2002), corroborando com nossos achados de aumento do tecido adiposo branco epididimal e retroperitoneal nos animais SL. O maior teor de tecido adiposo branco visceral no desmame e posteriormente foi associado a maiores quantidades da enzima FASN, enzima que catalisa a síntese *de novo* ácidos graxos (DNL) e as atividades lipogênicas no tecido adiposo retroperitoneal (Balonan & Sheng, 2000). Curiosamente, além da dislipidemia, animais adultos

com obesidade induzida durante a lactação do presente estudo também apresentavam aumento do conteúdo hepático de TAG, acompanhado do aumento da DNL, evidenciado pela maior expressão de FASN no fígado, estando de acordo com estudos anteriores (Ribas-Aulinas et al., 2021; Yang et al., 2018; Duff e Snell, 1982). Sabe-se que a obesidade está associada à DHGNA, uma vez que a capacidade de expansão dos adipócitos é limitada, de modo que o excesso de lipídeos é armazenado em tecidos ectópicos, como o músculo e o fígado, sendo nos hepatócitos principalmente na forma de TAG (Godoy-Matos et al., 2020). De fato, o aumento do conteúdo hepático de TAG, da concentração plasmática de TAG e AGL, podem ser atribuídos ao aumento da expressão da FASN no fígado dos animais SL, podendo então ser responsável pelo aumento da síntese de ácidos graxos e, conseqüentemente, da via da DNL nesses animais com obesidade.

Além do maior ganho de peso corporal, do depósito de TAB, demonstrado pelo aumento do peso do TAB e da área dos seus adipócitos e comprometimento do perfil lipídico, os animais SL também apresentaram maior concentração de glicocorticoides circulantes, conforme já demonstrado anteriormente (Souza et al. 2022; Hou et al., 2011). Sabe-se que animais com obesidade em diferentes modelos experimentais têm maiores concentrações de glicocorticoides circulantes (Mantha et al., 1999; Tokuyama e Himms-Hagen, 1989; Freedman et al. 1986), e que a remoção deles por meio da ADX é capaz de atenuar ou prevenir o desenvolvimento da obesidade (Romsos, 1991; Tokuyama e Himms-Hagen 1989; Freedman et al. 1986), apontando os glicocorticoides como possíveis mediadores da obesidade nesses modelos experimentais. Nesse sentido, o papel dos glicocorticoides como importante modulador do balanço energético na obesidade induzida pela superalimentação neonatal também foi demonstrado no presente trabalho, pois observamos que a ADX foi capaz de reduzir o ganho de peso corporal, a ingestão alimentar, bem como a adiposidade, evidenciada pela redução do peso do TAB e da área dos adipócitos, além de induzir uma melhora no perfil lipídico, com redução de AGL, TAG, colesterol total e LDL, reduzir o conteúdo de TAG, bem como a expressão de FASN no fígado dos animais SL, e o tratamento com corticosterona restaurou a maioria dessas alterações induzidas pela ADX.

A redução do ganho de peso corporal, do depósito de TAB e do perfil

lipídico plasmático de animais adultos com obesidade neonatal, devido à ADX, está de acordo com atenuação ou mesmo reversão nos parâmetros metabólicos observados em outros modelos de obesidade promovidos pela ADX (Alarrayed et al, 1992; Yilmaz et al., 2002; Kibenge e Chan, 2001; Mantha et al., 1999). Além disso, a diminuição do conteúdo de TAG e da expressão da FASN no fígado induzida pela ADX pode ser explicada pelos efeitos estimulatórios bem estabelecidos dos glicocorticoides, tanto no acúmulo de lipídeos e TAG no fígado (Suzuki e Mizugashira, 1979) quanto na expressão de enzimas-chave da DNL no fígado, como a FASN (Wang et al., 2004; Lee et al., 2011). Assim, é sugestivo que a maior concentração de glicocorticoides circulantes nos animais SL pode ter efeitos permissivos na expressão de FASN e, conseqüentemente, na DNL e acúmulo de TAG no fígado, uma vez que a ADX foi capaz de atenuar esses parâmetros no presente trabalho, e que os glicocorticoides são conhecidos por induzir a expressão da FASN e promover o aumento da DNL (Wang et al., 2004; Lee et al., 2011), bem como acúmulo do conteúdo de TAG no fígado (Suzuki e Mizugashira, 1979). Além disso, estudos *in vitro* mostraram que tanto o acúmulo de lipídeos quanto o conteúdo de TAG nas células HepG2 foram significativamente aumentados pelo tratamento com glicocorticoides por meio do aumento de DNL (Yang et al., 2018). Assim, a falta de efeitos da redução do tamanho da ninhada e da adrenalectomia em outras moléculas envolvidas no metabolismo lipídico hepático indica que provavelmente a FASN é a molécula chave que medeia a regulação positiva induzida pelos glicocorticoides na DNL e no acúmulo de TAG no fígado em ratos adultos com obesidade infantil.

A partir dos dados do ipGTT e da ASG do ipGTT, observamos que os animais SL apresentam intolerância à glicose na idade adulta. Apesar da insulina plasmática não ter sido medida, sabe-se que animais oriundos de ninhadas reduzidas apresentam maiores concentrações plasmáticas de insulina (Conceição et al. 2013, Liu et al. 2013, Hou et al., 2011), e que a insulina regula o metabolismo da glicose nos hepatócitos, estimulando a glicólise e a síntese de glicogênio e inibindo a gliconeogênese (Titchenell et al., 2017). Além disso, atua no metabolismo lipídico, estimulando DNL principalmente pela regulação positiva do fator de transcrição da proteína de ligação do elemento regulador de esterol (SREBP)-1c para expressão de ACC e FAS (Csaki e Reue., 2010; Horton tal., 2002), importantes para a síntese de ácidos graxos e biossíntese de lipídeos.

Para isso, a insulina se liga ao seu receptor, o receptor de insulina (IR) na membrana, um receptor com atividade tirosina quinase que se autofosforila na superfície interna da célula após a ligação da insulina e, assim, ativa sua atividade tirosina quinase, resultando na fosforilação de proteínas substratos do receptor de insulina (IRS) em resíduos de tirosina, que podem ativar a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). PI3K é um dímero composto por uma subunidade catalítica (p110) e outra regulatória (p85), e as proteínas-alvo de PI3K são a AKT e a proteína quinase C (Barker et al., 1992; Lietzke et al., 200; Czech e Corvera, 1999). Nesse contexto, a redução da expressão de PI3K no fígado de animais adultos com supernutrição neonatal observada no presente trabalho está de acordo com o comprometimento da via hepática da PI3K em animais com superalimentação neonatal durante a idade adulta, como demonstrado em estudos anteriores (Huang et al., 2021; Conceição et al., 2013). Apesar das outras moléculas desta via terem se mantido inalteradas no presente estudo, estes dados sugerem uma interrupção parcial da via de sinalização da insulina no fígado de ratos adultos com supernutrição neonatal.

Está bem estabelecido que o GLUT2 no fígado é responsável pelo influxo de glicose no período pós-prandial e pelo efluxo de glicose nos períodos pós-absortivos e de jejum (Chadt et al., 2020). Além da via de sinalização da insulina, a ausência de alterações na expressão de GLUT 2 no fígado, seja pela redução do tamanho da ninhada ou pela adrenalectomia, também aponta que o aumento da DNL observado nos animais SL não está relacionado à utilização de glicose induzida pela insulina no fígado, uma vez que a via PI3K-AKT neste tecido não está aumentada em animais com obesidade infantil. Por outro lado, a diminuição da expressão de IRS2 no fígado após ADX poderia justificar, pelo menos em parte, a redução da expressão de FASN e do conteúdo de TAG no fígado, uma vez que o IRS2 no fígado tem sido apontado como importante mediador da síntese de lipídeos e da DNL no fígado (Eckstein et al., 2017).

Sabe-se que a 11 $\beta$ -HSD1 está presente no retículo endoplasmático e é amplamente expressa no fígado e no tecido adiposo, sendo responsável por amplificar a ação local dos glicocorticoides, convertendo a cortisona inativa em cortisol ativo (corticosterona) (Bujalska, et al., 1997; Jamieson, et al., 1995; Masuzaki, et al., 2001). A maioria dos modelos animais de obesidade mostra que a expressão e/ou atividade hepática de 11 $\beta$ -HSD1 permanece inalterada (Morton

et al., 2004) ou reduzida (Drake et al., 2005). Apesar de Yang et al (2018) terem relatado que a redução do tamanho da ninhada induzida pela superalimentação pós-natal leva ao aumento da expressão do RNAm de 11 $\beta$ -HSD1 no fígado de ratos adultos, os dados deste trabalho indicam o oposto, uma vez que observamos que a expressão hepática da enzima 11 $\beta$ -HSD1 é regulada negativamente pela supernutrição neonatal. Conseqüentemente, é provável que o acúmulo hepático de lipídeos, levando a um risco aumentado de DHGNA durante a idade adulta em animais com supernutrição na lactação, possa ser atribuído ao aumento de glicocorticoides circulantes, ao invés da superexposição aos glicocorticoides por meio da regulação positiva da 11 $\beta$ -HSD1 no fígado. Essa redução na 11 $\beta$ -HSD1 hepática pode ser responsável pelo comprometimento parcial da via de sinalização da insulina no fígado no presente estudo, uma vez que a superexpressão de 11 $\beta$ -HSD1 no fígado de camundongos resulta em resistência à insulina (Masuzaki et al., 2001; Peterson et al., 2004).

Em resumo, as disfunções metabólicas e hepáticas em ratos adultos com supernutrição neonatal foram atenuadas pela ADX, e o tratamento com corticosterona restaurou a maioria das respostas promovidas pela ADX. Em conjunto, esses dados mostram que, como em outros modelos de obesidade, na obesidade infantil, os glicocorticoides também têm efeitos permissivos em induzir hiperlipidemia e acúmulo de TAG no fígado, provavelmente por estimular uma das principais enzimas da DNL, a FASN. Em conclusão, o papel dos glicocorticoides nas alterações metabólicas observadas na obesidade deve ser considerado e possivelmente alvo de intervenções na obesidade e na síndrome metabólica.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo pretendeu verificar se a supernutrição lactacional altera a responsividade aos efeitos do tratamento prolongado com glicocorticoide na homeostase energética bem como no eixo HPA. Além disso, analisar se a ADX altera os efeitos promovidos pela obesidade infantil nos parâmetros ponderais, bioquímicos e vias metabólicas da insulina e de lipídeos no fígado.

Em resumo, este estudo foi pioneiro em demonstrar que ratos adultos de ninhadas SL apresentam:

- ✓ hiperatividade do eixo HHA;
- ✓ menor expressão de MR no PVN;
- ✓ não apresentam respostas aos glicocorticoides no balanço energético e *feedback* negativo clássico do HHA;

Observamos ainda que a ADX foi capaz de atenuar as disfunções metabólicas e hepáticas de ratos adultos com supernutrição neonatal e que o tratamento com corticosterona restaurou a maioria das respostas promovidas pela ADX nos:

- ✓ parâmetros ponderais e bioquímicos;
- ✓ hiperlipidemia e acúmulo de TAG no fígado;
- ✓ maior expressão da FASN;

A hipótese do presente era de que animais obesos fossem mais susceptíveis aos efeitos anabólicos e resistentes ao *feedback* negativo dos glicocorticoides que os de ninhada normal, e que ADX seria capaz de reduzir os efeitos metabólicos induzidos pela obesidade por meio do método de manipulação do tamanho da ninhada. Dessa forma, a obesidade infantil reduziu tanto os efeitos dos glicocorticoides exógenos na homeostase energética quanto no eixo HHA, e os glicocorticoides contribuem para as alterações metabólicas e hepáticas induzidas pela obesidade infantil na vida adulta. Por meio desse estudo conseguimos confirmar a importância dos glicocorticoides no quadro de obesidade infantil, no prejuízo das funções hepáticas e metabólicas.

Em conclusão, ao analisarmos a obesidade como um grande problema de saúde pública, devemos levar em consideração o relevante papel dos

glicocorticoides e assim, englobá-los como alvo de estudos e possíveis intervenções.

## 5. REFERÊNCIAS

Adams, L. A., Waters, O. R., Knudman, M. W., Elliott, R. R., & Olynyk, J. K. (2009). NAFLD as a risk factor for the development of diabetes and the metabolic syndrome: an eleven-year follow-up study. *The American journal of gastroenterology*, *104*(4), 861–867. <https://doi.org/10.1038/ajg.2009.67>

Adlersberg, D., Schaefer, L., & Drachman, S. R. (1950). Development of hypercholesteremia during cortisone and ACTH therapy. *Journal of the American Medical Association*, *144*(11), 909–914. <https://doi.org/10.1001/jama.1950.02920110021006>

Alarrayed, F., Hartman, A. D., & Porter, J. R. (1992). Is there a role for the adrenals in the development of hypercholesterolemia in Zucker fatty rats?. *The American journal of physiology*, *263*(2 Pt 1), E287–E295. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.263.2.E287>

Alkhoury, N., Lawitz, E., Noureddin, M., DeFronzo, R., & Shulman, G. I. (2020). GS-0976 (Firsocostat): an investigational liver-directed acetyl-CoA carboxylase (ACC) inhibitor for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Expert opinion on investigational drugs*, *29*(2), 135–141. <https://doi.org/10.1080/13543784.2020.1668374>

Almeida, D.L., Fabrício, G.S., Trombini, A.B., Pavanello, A., Tófolo, L.P., da Silva Ribeiro, T.A., de Freitas Mathias, P.C., Palma-Rigo, K. (2013). Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. *Cell Physiol Biochem*. *32*(6), p.1621-1630. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/356598>

Aréchiga-Ceballos, F., Alvarez-Salas, E., Matamoros-Trejo, G., Amaya, M.I., García-Luna, C., de Gortari, P (2014). Pro-TRH and pro-CRF expression in paraventricular nucleus of small litter-reared fasted adult rats. *J Endocrinol*. Mar 7;221(1), p. 77-88. Available from: doi: 10.1530/JOE-13-0458. PMID: 24464021.

Aronsson, M., Fuxe, K., Dong, Y., Agnati, L.F., Okret, S. and Gustafsson, J.A. (1988). Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), pp.9331–9335.

Asensio, C., Muzzin, P., Rohner-Jeanrenaud, F. (2004). Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *Int. J. Obes.* 28, S45-S52. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802856>.

Babický, A., Ostádalová, I., Parížek, J., Kolár, J., & Bíbr, B. (1973). Onset and duration of the physiological weaning period for infant rats reared in nests of different sizes. *Physiologia Bohemoslovaca*, 22(5), 449–456.

Backer, J. M., Myers, M. G., Jr, Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., & Schlessinger, J. (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *The EMBO journal*, 11(9), 3469–3479. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05426.x>

Balonan, L. C., & Sheng, H. P. (2000). Perinatal feedings adversely affect lipogenic activities but not glucose handling in adult rats. *Pediatric research*, 48(5), 668–673. <https://doi.org/10.1203/00006450-200011000-00019>

Bamberger, C. M., Schulte, H. M., & Chrousos, G. P. (1996). Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine reviews*, 17(3), 245–261. <https://doi.org/10.1210/edrv-17-3-245>

Barker, D. J., & Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet (London, England)*, 1(8489), 1077–1081. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)91340-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)91340-1)

Barker, D.J.P (1998). In utero programming of chronic disease. *Clinical Science*, v. 95, p. 115 – 128.

Bassett, D. R., & Craig, B. W. (1988). Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985), 64(3), 1249–1256. <https://doi.org/10.1152/jappl.1988.64.3.1249>

Beaumont, K., & Fanestil, D. D. (1983). Characterization of rat brain aldosterone receptors reveals high affinity for corticosterone. *Endocrinology*, 113(6), 2043–2051. <https://doi.org/10.1210/endo-113-6-2043>

Bei, F., Jia, J., Jia, Y. Q., Sun, J. H., Liang, F., Yu, Z. Y., & Cai, W. (2015). Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids in health and disease*, 14, 96. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0094-2>

Benedict, M., & Zhang, X. (2017). Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World journal of hepatology*, 9(16), 715–732. <https://doi.org/10.4254/wjh.v9.i16.715>

Bernardis, L.L. and Patterson, B.D (1968). Correlation between "Lee Index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal Endocrinology*, v. 40, p. 527-528.

Boullu-Ciocca, S., Achard, V., Tassistro, V., Dutour, A. and Grino, M. (2008). Postnatal Programming of Glucocorticoid Metabolism in Rats Modulates High-Fat Diet–Induced Regulation of Visceral Adipose Tissue Glucocorticoid Exposure and Sensitivity and Adiponectin and Proinflammatory Adipokines Gene Expression in Adulthood. *Diabetes*, 57(3), pp.669–677. <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/db07-1316>.

Boullu-Ciocca, S., Dutour, A., Guillaume, V., Achard, V., Oliver, C. and Grino, M. (2005). Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: Its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes*, 54(1), pp.197–203.

Bradbury M. W. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *American journal of physiology*.

*Gastrointestinal and liver physiology*, 290(2), G194–G198.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00413.2005>

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.  
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Bruce, B.K., King, B.M., Phelps, G.R. and Veitia, M.C. (1982). Effects of adrenalectomy and corticosterone administration on hypothalamic obesity in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 243(2), pp.E152–E157. Available from:  
<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.1982.243.2.E152>.

Bujalska, I. J., Kumar, S., & Stewart, P. M. (1997). Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet (London, England)*, 349(9060), 1210–1213. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)11222-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)11222-8)Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011;332:1519–23.

Campbell, J.E., Peckett, A.J., D'souza, A.M., Hawke, T.J. and Riddell, M.C. (2011). Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(1), pp.C198–C209. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00045.2010>.

Capriglioni Cancian, C.R., Leite, N.C., Montes, E.G., Fisher, S.V., Waselcoski, L., Lopes Stal, E.C., Christoforo, R.Z., Grassioli, S. (2016). Histological and Metabolic State of Dams Suckling Small Litter or MSG-Treated Pups. *The Scientific World Journal*, 2016:1678541. Available from:  
<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2016/1678541/>

Carsia, R. V. and Malamed, S. (1979). Acute self-suppression of corticosteroidogenesis in isolated adrenocortical cells. *Endocrinology*, 105(4), pp.911–914.

Carsia, R.V. and Malamed, S. (1983). Glucocorticoid control of steroidogenesis in isolated rat adrenocortical cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -

Molecular Cell Research, 763(1), pp.83–89. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167488983900289>.

Castonguay, T. W., Dallman, M. F., & Stern, J. S. (1986). Some metabolic and behavioral effects of adrenalectomy on obese Zucker rats. *The American journal of physiology*, 251(5 Pt 2), R923–R933. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1986.251.5.R923>

Chadt, A.; Al-Hasani, H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease (2020). *Pflugers Arch.* v. 472, p. 1273-1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>.

Conceição, E. P., Franco, J. G., Oliveira, E., Resende, A. C., Amaral, T. A., Peixoto-Silva, N., Passos, M. C., Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2013). Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.02.010>.

Conceição, E. P., Trevenzoli, I. H., Oliveira, E., Franco, J. G., Carlos, A. S., Nascimento-Saba, C. C., Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2011). Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Hormone and metabolic research*, 43(7), 513–516. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1275702>

Cotter, T. G., & Rinella, M. (2020). Nonalcoholic Fatty Liver Disease 2020: The State of the Disease. *Gastroenterology*, 158(7), 1851–1864. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.052>

Csaki, L. S., & Reue, K. (2010). Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. *Annual review of nutrition*, 30, 257–272. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104729>

Cunha, A. C., Pereira, R. O., Pereira, M. J., Soares, V.deM., Martins, M. R., Teixeira, M. T., Souza, E. P., & Moura, A. S. (2009). Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(6), 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.002>

Czech, M. P., & Corvera, S. (1999). Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *The Journal of biological chemistry*, 274(4), 1865–1868. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.1865>

Dallman, M. F., Akana, S. F., Jacobson, L., Levin, N., Cascio, C. S., & Shinsako, J. (1987). Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 512, 402–414. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb24976.x>

Dallman, M. F., Akana, S. F., Scribner, K. A., Bradbury, M. J., Walker, C. D., Strack, A. M., & Cascio, C. S. (1992). Stress, feedback and facilitation in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Journal of neuroendocrinology*, 4(5), 517–526. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1992.tb00200.x>

Dallman, M. F., Darlington, D. N., Suemaru, S., Cascio, C. S., & Levin, N. (1989). Corticosteroids in homeostasis. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*, 583, 27–34.

de Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S. and Joëls, M. (1998). Brain Corticosteroid Receptor Balance in Health and Disease\*. *Endocrine Reviews*, 19(3), pp.269–301. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article/19/3/269/2530808>.

de Moura, E. G., & Passos, M. C. (2005). Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Bioscience reports*, 25(3-4), 251–269. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2888-3>.

de Souza, C. F., Stopa, L. R. S., Martins, A. B., Wunderlich, A. L. M., Lopes, G. M., Zaia, D. A. M., Zaia, C. T. B. V., de Andrade, F. G., Leite, C. M., & Uchoa, E. T. (2022). Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats. *Life sciences*, 304, 120721. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120721>

de Souza, C. F., Stopa, L. R. S., Santos, G. F., Takasumi, L. C. N., Martins, A. B., Garnica-Siqueira, M. C., Ferreira, R. N., de Andrade, F. G., Leite, C. M., Zaia, D. A. M., Zaia, C. T. B. V., & Uchoa, E. T. (2019). Estradiol protects against

ovariectomy-induced susceptibility to the anabolic effects of glucocorticoids in rats. *Life sciences*, 218, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.037>

Diaz, R., Brown, R. W., & Seckl, J. R. (1998). Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(7), 2570–2580. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-07-02570.1998>

Dinneen, S.; Alzaid, A.; Miles, J., And Rizza, R. Metabolic effects of the nocturnal rise in cortisol on carbohydrate metabolism in normal humans. *J. Clin. Invest.*, v. 92, p. 2283–2290, 1993.

Diorio, D.; Viau, V.; Meaney, M. J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulated gyrus) in the regulation of hypothalamic- pituitary-adrenal responses to stress. *J. Neurosci.*, v. 13, p. 3839–3847, 1993.

Diraison, F., Moulin, P., & Beylot, M. (2003). Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes & metabolism*, 29(5), 478–485. [https://doi.org/10.1016/s1262-3636\(07\)70061-7](https://doi.org/10.1016/s1262-3636(07)70061-7)

Doerge, H., & Stahl, A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, 259–268. <https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2006>

Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>

Drake, A. J., Livingstone, D. E., Andrew, R., Seckl, J. R., Morton, N. M., & Walker, B. R. (2005). Reduced adipose glucocorticoid reactivation and increased hepatic glucocorticoid clearance as an early adaptation to high-fat feeding in Wistar rats. *Endocrinology*, 146(2), 913–919. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1063>

Dubuc, P.U. and Wilden, N.J. (1986). Adrenalectomy reduces but does not reverse obesity in ob/ob mice. *International Journal of Obesity*, 10(2), pp.91–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3522453>.

Duff, D. A., & Snell, K. (1982). Effect of altered neonatal nutrition on the development of enzymes of lipid and carbohydrate metabolism in the rat. *The Journal of nutrition*, 112(6), 1057–1066. <https://doi.org/10.1093/jn/112.6.1057>

Dury, A., & Moss, L. D. (1958). Effect of small doses of cortisone on lipid metabolism and retardation of atherosclerosis: probable mechanism of action. *Journal of gerontology*, 13(2), 144–148. <https://doi.org/10.1093/geronj/13.2.144>

Eckstein, S. S., Weigert, C., & Lehmann, R. (2017). Divergent Roles of IRS (Insulin Receptor Substrate) 1 and 2 in Liver and Skeletal Muscle. *Current medicinal chemistry*, 24(17), 1827–1852. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170426142826>.

Ellsworth, L., Harman, E., Padmanabhan, V., & Gregg, B. (2018). Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. *Reproduction (Cambridge, England)*, 156(2), R23–R42. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0780>

Enes-Marques, S., Rojas, V. C. T., Batista, T. H., Vitor-Vieira, F., Novais, C. O., Vilela, F. C., Rafacho, A., & Giusti-Paiva, A. (2020). Neonatal overnutrition programming impairs cholecystokinin effects in adultmale rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 86, 108494. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108494>

Faix, D., Neese, R., Kletke, C., Wolden, S., Cesar, D., Coutlangus, M., Shackleton, C. H., & Hellerstein, M. K. (1993). Quantification of menstrual and diurnal periodicities in rates of cholesterol and fat synthesis in humans. *Journal of lipid research*, 34(12), 2063–2075.

Falholt, K., Lund, B., Falholt, W. (1973). An easy colorimetric method for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clin. Chim. Acta* 46, 105-111. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(73\)90016-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(73)90016-8).

Feldman, S., & Weidenfeld, J. (1998). The excitatory effects of the amygdala on hypothalamo-pituitary-adrenocortical responses are mediated by hypothalamic norepinephrine, serotonin, and CRF-41. *Brain research bulletin*, 45(4), 389–393. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(97\)00384-5](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(97)00384-5)

Ferretti, S., Fornari, A., Pedrazzi, P., Pellegrini, M., & Zoli, M. (2011). Developmental overfeeding alters hypothalamic neuropeptide mRNA levels and response to a high-fat diet in adult mice. *Peptides*, 32(7), 1371–1383. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.06.001>

Fiorotto, M.L., Burrin, D.G., Perez, M. and Reeds, P.J. (1991). Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 260(6), pp.R1104–R1113. <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1991.260.6.R1104>.

Fiorotto, M.L., Burrin, D.G., Perez, M. and Reeds, P.J. (1991). Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 260(6), pp.R1104–R1113.

Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, v.226, n.1, p. 497-509.

Frayling T. M. (2007). A new era in finding Type 2 diabetes genes-the unusual suspects. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 24(7), 696–701. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2007.02172.x>

Freedman, M.R., Horwitz, B.A. and Stern, J.S. (1986). Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 250(4), pp.R595–R607. <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1986.250.4.R595>.

Friedman J. M. (2003). A war on obesity, not the obese. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5608), 856–858. <https://doi.org/10.1126/science.1079856>

Friedman, J. E., Yun, J. S., Patel, Y. M., McGrane, M. M., & Hanson, R. W. (1993). Glucocorticoids regulate the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *The Journal of biological chemistry*, 268(17), 12952–12957.

Geer, E. B., Islam, J., & Buettner, C. (2014). Mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: focus on adipose tissue function and lipid metabolism. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 43(1), 75–102. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.10.005>

Gill, G.N. (1976). Acth regulation of the adrenal cortex. *Pharmacology & Therapeutics. Part B: General and Systematic Pharmacology*, 2(2), pp.313–338. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306039X76800116>.

Glavas, M. M., Kirigiti, M. A., Xiao, X. Q., Enriori, P. J., Fisher, S. K., Evans, A. E., Grayson, B. E., Cowley, M. A., Smith, M. S., & Grove, K. L. (2010). Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinology*, 151(4), 1598–1610. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1295>

Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2004). Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 9(5), 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2004.03.001>

Godoy-Matos, A. F., Silva Júnior, W. S., & Valerio, C. M. (2020). NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*, 12, 60. <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00570-y>

Goedeke, L., Bates, J., Vatner, D. F., Perry, R. J., Wang, T., Ramirez, R., Li, L., Ellis, M. W., Zhang, D., Wong, K. E., Beysen, C., Cline, G. W., Ray, A. S., & Shulman, G. I. (2018). Acetyl-CoA Carboxylase Inhibition Reverses NAFLD and Hepatic Insulin Resistance but Promotes Hypertriglyceridemia in Rodents. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 68(6), 2197–2211. <https://doi.org/10.1002/hep.30097>

Guarino, M.P., Santos, A.I., Mota-Carmo, M., Costa, P.F (2013). Effects of anaesthesia on insulin sensitivity and metabolic parameters in Wistar rats. *In Vivo*. Jan-Feb;27(1):127-32. PMID: 23239861.

Guillemin, R., Clayton G. W., Smith, J.D., Lipscomb, H.S. (1958). Measurement of free corticosteroids in rat plasma: physiological validation of a method. *Endocrinology* 63, 349-358. <https://doi.org/10.1210/endo-63-3-349>.

Habbout, A., Li, N., Rochette, L., & Vergely, C. (2013). Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *The Journal of nutrition*, 143(5), 553–562. <https://doi.org/10.3945/jn.112.172825>

Hadizadeh, F., Faghihimani, E., & Adibi, P. (2017). Nonalcoholic fatty liver disease: Diagnostic biomarkers. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 8(2), 11–26. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i2.11>

Hahn P. (1984). Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. *The Journal of nutrition*, 114(7), 1231–1234. <https://doi.org/10.1093/jn/114.7.1231>

Heeren, J., & Scheja, L. (2021). Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Molecular metabolism*, 50, 101238. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101238>

Herman, J.P., M.-F., P. and Cullinan, W.E. (1996). Neuronal Circuit Regulation of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Stress Axis. *Critical Reviews™ in Neurobiology*, 10(3–4), pp.371–394. <http://www.dl.begellhouse.com/journals/7b004699754c9fe6,24015b0723d06c98,6a60b5a224069a5c.html>.

Hill, R. B., Jr, Droke, W. E., & Hays, A. P. (1965). HEPATIC LIPID METABOLISM IN THE CORTISONE-TREATED RAT. *Experimental and molecular pathology*, 4, 320–327. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(65\)90007-9](https://doi.org/10.1016/0014-4800(65)90007-9)

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109:1125–

31. Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical investigation*, 109(9), 1125–1131. <https://doi.org/10.1172/JCI15593>

Hou, M., Liu, Y., Zhu, L., Sun, B., Guo, M., Burén, J. and Li, X. (2011). Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *PLoS ONE*, 6(11), pp.1–9.

Huang, F; Zhu, P.; Wang, J.; Chen, J.; Lin, W. Postnatal overfeeding induces hepatic microRNA-221 expression and impairs the PI3K/AKT pathway in adult male rats (2021). *Pediatr Res.* v.89, p 143-149. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0877-7>.

Itoh, S. and Hirota, R. (1976). Atrophy of Adrenal Gland and Thymus Following Cortisol Treatment in Newborn Rats. *Folia Endocrinologica Japonica*, 52(12), pp.1230–1242. Available from: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrine1927/52/12/52\\_1230/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrine1927/52/12/52_1230/_article/-char/ja/).

Jacobson, L. and Sapolsky, R. (1991). The Role of the Hippocampus in Feedback Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis\*. *Endocrine Reviews*, 12(2), pp.118–134. <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-12-2-118>.

Jamieson, P. M., Chapman, K. E., Edwards, C. R., & Seckl, J. R. (1995). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 beta- reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology*, 136(11), 4754–4761. <https://doi.org/10.1210/endo.136.11.7588203>

Jazwiec PA, Sloboda DM. Nutritional adversity, sex and reproduction: 30 years of DOHaD and what have we learned? *J Endocrinol.* 2019 Jul 1;242(1):T51-T68. doi: 10.1530/JOE-19-0048. PMID: 31013473.

Jessop, D.S., Dallman, M.F., Fleming, D. and Lightman, S.L. (2001). Resistance to glucocorticoid feedback in obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(9), pp.4109–4114.

Jiang, Z. G., Tapper, E. B., Connelly, M. A., Pimentel, C. F., Feldbrügge, L., Kim, M., Krawczyk, S., Afdhal, N., Robson, S. C., Herman, M. A., Otvos, J. D., Mukamal, K. J., & Lai, M. (2016). Steatohepatitis and liver fibrosis are predicted by the characteristics of very low density lipoprotein in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 36(8), 1213–1220. <https://doi.org/10.1111/liv.13076>

Kapoor, A., Dunn, E., Kostaki, A., Andrews, M. H., & Matthews, S. G. (2006). Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *The Journal of physiology*, 572(Pt 1), 31–44. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.105254>

Kawano, Y., & Cohen, D. E. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology*, 48(4), 434–441. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0758-5>

Keith, S. W., Redden, D. T., Katzmarzyk, P. T., Boggiano, M. M., Hanlon, E. C., Benca, R. M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J. L., Fontaine, K. R., Wang, C., Aronne, L. J., Wright, S. M., Baskin, M., Dhurandhar, N. V., Lijoi, M. C., Grilo, C. M., DeLuca, M., Westfall, A. O., & Allison, D. B. (2006). Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *International journal of obesity (2005)*, 30(11), 1585–1594. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803326>

Keller-Wood, M. E., & Dallman, M. F. (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine reviews*, 5(1), 1–24. <https://doi.org/10.1210/edrv-5-1-1>

Kennedy G. C. (1957). The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. *The Journal of endocrinology*, 16(1), 9–17. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0160009>

Kershaw, E. E., Morton, N. M., Dhillon, H., Ramage, L., Seckl, J. R., & Flier, J. S. (2005). Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-

induced obesity. *Diabetes*, 54(4), 1023–1031.  
<https://doi.org/10.2337/diabetes.54.4.1023>

Khulan, B., & Drake, A. J. (2012). Glucocorticoids as mediators of developmental programming effects. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 26(5), 689–700. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.03.007>

Kibenge, M. T., & Chan, C. B. (2001). Interactions between effects of adrenalectomy and diet on insulin secretion in falfa Zucker rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 79(1), 1–7.

King, B. M., Banta, A. R., Tharel, G. N., Bruce, B. K., & Frohman, L. A. (1983). Hypothalamic hyperinsulinemia and obesity: role of adrenal glucocorticoids. *The American journal of physiology*, 245(2), E194–E199.  
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.1983.245.2.E194>

Klausner, H., & Heimberg, M. (1967). Effect of adrenalcortical hormones on release of triglycerides and glucose by liver. *The American journal of physiology*, 212(6), 1236–1246.  
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1967.212.6.1236>

Kohjima, M., Enjoji, M., Higuchi, N., Kotoh, K., Kato, M., Takayanagi, R., & Nakamuta, M. (2007). NIM811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analogue, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, 27(9), 1273–1281. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2007.01560.x>

Koletzko, B., & Shamir, R. (2011). Nutrition in early life: malnutrition, obesity, and special needs of premature babies. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 14(3), 274–275.  
<https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283458678>

Kretz, O., Schmid, W., Berger, S., & Gass, P. (2001). The mineralocorticoid receptor expression in the mouse CNS is conserved during development. *Neuroreport*, 12(6), 1133–1137.  
<https://doi.org/10.1097/00001756-200105080-00017>

Lee, M. J., Gong, D. W., Burkey, B. F., & Fried, S. K. (2011). Pathways regulated by glucocorticoids in omental and subcutaneous human adipose tissues: a microarray study. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 300(3), E571–E580. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00231.2010>

Lesage, J., Del-Favero, F., Leonhardt, M., Louvart, H., Maccari, S., Vieau, D., & Darnaudery, M. (2004). Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *The Journal of endocrinology*, 181(2), 291–296. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1810291>

Lietzke, S. E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M. P., & Lambright, D. G. (2000). Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Molecular cell*, 6(2), 385–394. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00038-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00038-1)

Lindsay, R. S., Lindsay, R. M., Waddell, B. J., & Seckl, J. R. (1996). Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia*, 39(11), 1299–1305. <https://doi.org/10.1007/s001250050573>

Liu, H. W., Srinivasan, M., Mahmood, S., Smiraglia, D. J., & Patel, M. S. (2013). Adult-onset obesity induced by early life overnutrition could be reversed by moderate caloric restriction. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 305(7), E785–E794. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00280.2013>

Ljung, T., Andersson, B., Bengtsson, B.A., Björntorp, P. and Mårin, P. (1996). Inhibition of cortisol secretion by dexamethasone in relation to body fat distribution: a dose-response study. *Obesity research*, 4(3), pp.277–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8732962>.

Ljung, T., Ottosson, M., Ahlberg, A.C., Edén, S., Odén, B., Okret, S., Brönnegård, M., Stierna, P. and Björntorp, P. (2002). Central and peripheral glucocorticoid receptor function in abdominal obesity. *Journal of endocrinological investigation*,

25(3), pp.229–35. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11936464>.

López, M., Tovar, S., Vázquez, M. J., Nogueiras, R., Seoane, L. M., García, M., Señarís, R. M., & Diéguez, C. (2007). Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. *International journal of obesity (2005)*, *31*(2), 371–377.  
<https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803425>

Lytle, K. A., & Jump, D. B. (2016). Is Western Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis in Ldlr<sup>-/-</sup> Mice Reversible?. *PloS one*, *11*(1), e0146942.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146942>

Mantha, L., Palacios, E., & Deshaies, Y. (1999). Modulation of triglyceride metabolism by glucocorticoids in diet-induced obesity. *The American journal of physiology*, *277*(2), R455–R464.  
<https://doi.org/10.1152/ajprequ.1999.277.2.R455>

Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., & Flier, J. S. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5549), 2166–2170.  
<https://doi.org/10.1126/science.1066285>

Matthews S. G. (2002). Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *13*(9), 373–380.  
[https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(02\)00690-2](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(02)00690-2)

McCance R. A. (1962). Food, growth, and time. *Lancet (London, England)*, *2*(7257), 621–626. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(62\)92539-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(62)92539-4)

McMillen, I. C., & Robinson, J. S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological reviews*, *85*(2), 571–633. <https://doi.org/10.1152/physrev.00053.2003>

Metges, C.C. Early nutrition and later obesity: animal models provide insights into mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 646, p. 105–112,2009.

Moreira, A. S., Teixeira Teixeira, M., da Silveira Osso, F., Pereira, R. O., de Oliveira Silva-Junior, G., Garcia de Souza, E. P., Mandarim de Lacerda, C. A., & Moura, A. S. (2009). Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 19(11), 805–810. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.01.008>

Morton, N. M., Ramage, L., & Seckl, J. R. (2004). Down-regulation of adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by high-fat feeding in mice: a potential adaptive mechanism counteracting metabolic disease. *Endocrinology*, 145(6), 2707–2712. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1674>

Mota, M., Banini, B. A., Cazanave, S. C., & Sanyal, A. J. (2016). Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism: clinical and experimental*, 65(8), 1049–1061. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.014>

Naeser P. (1973). Effects of adrenalectomy on the obese-hyperglycemic syndrome in mice (gene symbol ob). *Diabetologia*, 9(5), 376–379. <https://doi.org/10.1007/BF01239430>

Nestel, P. J., Havel, R. J., & Bezman, A. (1962). SITES OF INITIAL REMOVAL OF CHYLOMICRON TRIGLYCERIDE FATTY ACIDS FROM THE BLOOD. *The Journal of clinical investigation*, 41(10), 1915–1921. <https://doi.org/10.1172/JCI104648>

Nieman, L. K., Chrousos, G. P., Kellner, C., Spitz, I. M., Nisula, B. C., Cutler, G. B., Merriam, G. R., Bardin, C. W., & Loriaux, D. L. (1985). Successful treatment of Cushing's syndrome with the glucocorticoid antagonist RU 486. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 61(3), 536–540. <https://doi.org/10.1210/jcem-61-3-536>

Nishi, M. (2004). Visualization of Glucocorticoid Receptor and Mineralocorticoid Receptor Interactions in Living Cells with GFP-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Journal of Neuroscience*, 24(21), pp.4918–4927. Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.5495-03.2004>.

Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry*, 286(5), 3177–3184. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.179325>

Oben, J. A., Muralidarane, A., Samuelsson, A. M., Matthews, P. J., Morgan, M. L., McKee, C., Soeda, J., Fernandez-Twinn, D. S., Martin-Gronert, M. S., Ozanne, S. E., Sigala, B., Novelli, M., Poston, L., & Taylor, P. D. (2010). Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of hepatology*, 52(6), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.12.042>

Ojha, S., Robinson, L., Symonds, M. E., & Budge, H. (2013). Suboptimal maternal nutrition affects offspring health in adult life. *Early human development*, 89(11), 909–913. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2013.08.022>

Parlee, S. D., Lentz, S. I., Mori, H. & MacDougald, O. A. (2014). Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods Enzymol.* 537, 93–122.

Patel, M. S., & Srinivasan, M. (2011). Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Annals of nutrition & metabolism*, 58 Suppl 2(Suppl 2), 18–28. <https://doi.org/10.1159/000328040>

Paterson, J. M., Morton, N. M., Fievet, C., Kenyon, C. J., Holmes, M. C., Staels, B., Seckl, J. R., & Mullins, J. J. (2004). Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 7088–7093. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305524101>

Paxinos, G. and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San diego, CA: Academic.

Pentinat, T., Ramon-Krauel, M., Cebria, J., Diaz, R., & Jimenez-Chillaron, J. C. (2010). Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition. *Endocrinology*, 151(12), 5617–5623. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0684>

Plagemann, A. (2006). Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Hormone Research*, 65(SUPPL. 3), pp.83–89.

Plagemann, A. (2006). Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Hormone Research*, 65(SUPPL. 3), pp.83–89.

Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rohde, W., & Dörner, G. (1999a). Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Brain research*, 818(1), 160–163. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01264-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01264-5)

Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Voits, M., Fink, H., Rohde, W., & Dörner, G. (1999b). Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain research*, 836(1-2), 146–155. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01662-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01662-5)

Plagemann, A., Heidrich, I., Götz, F., Rohde, W., & Dörner, G. (1992). Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Experimental and clinical endocrinology*, 99(3), 154–158. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211159>

Polyzos, S. A., Kountouras, J., & Mantzoros, C. S. (2019). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism: clinical and experimental*, 92, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.014>

Powers, B. S., & Di Luzio, N. R. (1958). Dietary cholesterol and adrenal regulation of plasma lipids. *The American journal of physiology*, 195(1), 166–170. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1958.195.1.166>

Ramon-Krauel, M., Pentinat, T., Bloks, V. W., Cebrià, J., Ribo, S., Pérez-Wienese, R., Vilà, M., Palacios-Marin, I., Fernández-Pérez, A., Vallejo, M., Téllez, N., Rodríguez, M. À., Yanes, O., Lerin, C., Díaz, R., Plosch, T., Tietge, U. J. F., & Jimenez-Chillaron, J. C. (2018). Epigenetic programming at the Mogat1 locus may link neonatal overnutrition with long-term hepatic steatosis and insulin resistance. *FASEB journal : official publication of the Federation of American*

*Societies for Experimental Biology*, fj201700717RR. Advance online publication.  
<https://doi.org/10.1096/fj.201700717RR>

Rask, E., Olsson, T., Söderberg, S., Andrew, R., Livingstone, D. E., Johnson, O., & Walker, B. R. (2001). Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(3), 1418–1421. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.3.7453>

Ratka, A., Sutanto, W., Bloemers, M., & de Kloet, E. R. (1989). On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology*, 50(2), 117–123. <https://doi.org/10.1159/000125210>

Rebuffé-Scrive, M., Krotkiewski, M., Elfverson, J., & Björntorp, P. (1988). Muscle and adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 67(6), 1122–1128. <https://doi.org/10.1210/jcem-67-6-1122>

Reul, J.M., van den Bosch, F.R. and de Kloet, E.R. (1987). Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology*, 45(5), pp.407–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3587523>.

Ribas-Aulinas, F., Parra-Vargas, M., Ramon-Krauel, M., Diaz, R., Lerin, C., Cambras, T., & Jimenez-Chillaron, J. C. (2021). Time-Restricted Feeding during Puberty Ameliorates Adiposity and Prevents Hepatic Steatosis in a Mouse Model of Childhood Obesity. *Nutrients*, 13(10), 3579. <https://doi.org/10.3390/nu13103579>

Rinaldi, W., Gomes, R.M., Scomparin, D.X., Grassioli, S., Ribeiro, T.A., Fabricio, G.S., Barella, L.F., Pavanello, A., Trombini, A.B., Mathias, P.C., de Oliveira, J.C. (2014). Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats. *J Int Soc Sports Nutr.*, 11:25. Available from: <https://jissn.biomedcentral.com/articles/10.1186/1550-2783-11-25>.

Ristic-Medic, D., Petrovic, S., Arsic, A., & Vucic, V. (2021). Liver disease and

COVID-19: The link with oxidative stress, antioxidants and nutrition. *World journal of gastroenterology*, 27(34), 5682–5699.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i34.5682>

Rizza, R. A., Mandarino, L. J., & Gerich, J. E. (1982). Cortisol-induced insulin resistance in man: impaired suppression of glucose production and stimulation of glucose utilization due to a postreceptor defect of insulin action. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 54(1), 131–138.  
<https://doi.org/10.1210/jcem-54-1-131>

Rodrigues, A. L., de Moura, E. G., Passos, M. C., Dutra, S. C., & Lisboa, P. C. (2009). Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *The Journal of physiology*, 587(Pt 11), 2647–2661.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.169045>

Rodrigues, A. L., de Moura, E. G., Passos, M. C., Trevenzoli, I. H., da Conceição, E. P., Bonono, I. T., Neto, J. F., & Lisboa, P. C. (2011). Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(2), 109–117.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.013>

Rodrigues, A. L., De Souza, E. P., Da Silva, S. V., Rodrigues, D. S., Nascimento, A. B., Barja-Fidalgo, C., & De Freitas, M. S. (2007). Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *The Journal of endocrinology*, 195(3), 485–494.  
<https://doi.org/10.1677/JOE-07-0046>.

Romsos, D.R. Energy balance: role of adrenal gland secretions. In: *Proceedings of the 14th International Congress of Nutrition*, edited by YoungKW, Cha LY, Yull LK, Soon JJ, and He KS. Seoul, South Korea: International Congress of Nutrition, 1991, p. 129–132.

Rosqvist, F., Kullberg, J., Ståhlman, M., Cedernaes, J., Heurling, K., Johansson, H. E., Iggman, D., Wilking, H., Larsson, A., Eriksson, O., Johansson, L., Straniero, S., Rudling, M., Antoni, G., Lubberink, M., Orho-Melander, M., Borén,

J., Ahlström, H., & Risérus, U. (2019). Overeating Saturated Fat Promotes Fatty Liver and Ceramides Compared With Polyunsaturated Fat: A Randomized Trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *104*(12), 6207–6219. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00160>

Rutledge, A. C., Su, Q., & Adeli, K. (2010). Apolipoprotein B100 biogenesis: a complex array of intracellular mechanisms regulating folding, stability, and lipoprotein assembly. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, *88*(2), 251–267. <https://doi.org/10.1139/o09-168>

Sayer, A. A., Syddall, H. E., Dennison, E. M., Gilbody, H. J., Duggleby, S. L., Cooper, C., Barker, D. J., & Phillips, D. I. (2004). Birth weight, weight at 1 y of age, and body composition in older men: findings from the Hertfordshire Cohort Study. *The American journal of clinical nutrition*, *80*(1), 199–203. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.1.199>

Šefčíková, Z., Bujňáková, D., Raček, L., Kmet, V., & Mozeš, Š. (2011). Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests. *Physiological research*, *60*(2), 337–346. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931939>

Sherman, B. M., Pfohl, B., & Winokur, G. (1985). The correspondence of plasma ACTH and cortisol before and after dexamethasone in healthy and depressed subjects. *Psychiatric medicine*, *3*(1), 41–52.

Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(24), 13656–13661. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13656>

Shimomura, Y., Bray, G. A., & Lee, M. (1987). Adrenalectomy and steroid treatment in obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, *19*(7), 295–299. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1011804>

Singh, S., Karthikeyan, C., & Moorthy, N. S. H. N. (2023). Fatty Acid Synthase (FASN): A Patent Review Since 2016-Present. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 10.2174/1574892818666230112170003. Advance online publication. <https://doi.org/10.2174/1574892818666230112170003>

Softic, S., Gupta, M. K., Wang, G. X., Fujisaka, S., O'Neill, B. T., Rao, T. N., Willoughby, J., Harbison, C., Fitzgerald, K., Ilkayeva, O., Newgard, C. B., Cohen, D. E., & Kahn, C. R. (2018). Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. *The Journal of clinical investigation*, 128(3), 1199. <https://doi.org/10.1172/JCI99009>

Solomon, J., & Mayer, J. (1973). The effect of adrenalectomy on the development of the obese-hyperglycemic syndrome in ob-ob mice. *Endocrinology*, 93(2), 510–512. <https://doi.org/10.1210/endo-93-2-510>

Sominsky, L., Ong, L.K., Ziko, I., Dickson, P.W., Spencer, S.J (2017). Neonatal overfeeding increases capacity for catecholamine biosynthesis from the adrenal gland acutely and long-term in the male rat. *Mol Cell Endocrinol*. Jul 15, 470, p. 295-303. Available from: doi: 10.1016/j.mce.2017.11.014. PMID: 29183807.

Spencer S. J. (2013). Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Frontiers in neuroscience*, 7, 109. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00109>

Spencer, R.L., Kim, P.J., Kalman, B.A. and Cole, M.A. (1998). Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Endocrinology*, 139(6), pp.2718–2726.

Spencer, S. J., & Tilbrook, A. (2009). Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1133–1143. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.02.013>

Starley, B. Q., Calcagno, C. J., & Harrison, S. A. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(5), 1820–1832. <https://doi.org/10.1002/hep.23594>

Stefanidis, A., & Spencer, S. J. (2012). Effects of neonatal overfeeding on juvenile and adult feeding and energy expenditure in the rat. *PloS one*, 7(12), e52130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052130>

Stern, N., Beck, F. J., Eggena, P., Phillips, D., & Sowers, J. R. (1983). Corticosteroid modulation of the renin system and blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Clinical and experimental hypertension. Part A, Theory and practice*, 5(9), 1543–1557. <https://doi.org/10.3109/10641968309069510>

Stewart, P. M., & Krozowski, Z. S. (1999). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitamins and hormones*, 57, 249–324.

Stewart, P. M., Boulton, A., Kumar, S., Clark, P. M., & Shackleton, C. H. (1999). Cortisol metabolism in human obesity: impaired cortisone-->cortisol conversion in subjects with central adiposity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(3), 1022–1027. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.3.5538>

Stopa, L.R.S., de Souza, C.F., Martins, A.B., Lopes, G.M., Costa, N.O., Gerardin, D.C.C., de Carvalho, G.G., Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Uchoa, E.T. and Leite, C.M. (2021). Neonatal overfeeding reduces estradiol plasma levels and disrupts noradrenergic-kisspeptin-GnRH pathway and fertility in adult female rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 524(December 2020). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720720304494?via%3Dihub>

Stopa, L.R.S., de Souza, C.F., Santos, G.F., Martins, A.B., Ferreira, R.N., de Andrade, F.G., Leite, C.M., Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V. and Uchoa, E.T. (2019). Sex differences in glucocorticoids-induced anabolic effects in rats. *Physiology and Behavior*, 209(April), p.112587. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112587>.

Suzuki, H., & Mizugashira, M. (1979). Effect of adrenalectomy on liver lipid content of fasted rats. *The Journal of nutrition*, 109(8), 1413–1418. <https://doi.org/10.1093/jn/109.8.1413>

Symonds, M. E., Sebert, S. P., Hyatt, M. A., & Budge, H. (2009). Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nature reviews. Endocrinology*, 5(11), 604–610. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.195>

Tataranni, P.A.; Larson, D.E.; Snitker, S.; Young, J.B.; Flatt, J.P.; Ravussin, E. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 271, p. E317-E325, 1996.

Titchenell, P. M., Lazar, M. A., & Birnbaum, M. J. (2017). Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(7), 497–505.

Tokuyama, K. and Himms-Hagen, J. (1987). Increased sensitivity of the genetically obese mouse to corticosterone. *The American journal of physiology*, 252(2 Pt 1), pp.E202-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3548420>.

Tokuyama, K. and Himms-Hagen, J. (1989). Enhanced acute response to corticosterone in genetically obese (ob/ob) mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 257(2), pp.E133–E138. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.1989.257.2.E133>.

Torrezan, R., Malta, A., de Souza Rodrigues, W.D.N., Dos Santos, A.A.A., Miranda, R.A., Moura, E.G., Lisboa, P.C., de Freitas Mathias, P.C (2019). Monosodium l-glutamate-obesity onset is associated with disruption of central control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system. *J Neuroendocrinol.*, 31(6):e12717. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jne.12717>

Uchoa, E.T., Sabino, H.A., Ruginsk, S.G., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L. (2009a). Hypophagia induced by glucocorticoid deficiency is associated with an increased activation of satiety-related responses. *J Appl Physiol* 106 596-604. [doi: 10.1152/jappphysiol.90865.2008](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90865.2008).

Uchoa, E.T., Silva, L.E.C.M., Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L. (2009b). Hypothalamic oxytocin neurons modulate hypophagic effect induced by adrenalectomy. *Horm Behav* 56 532-538. [doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.09.007](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.09.007).

Uchoa, E.T., da Silva, L.E., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L. (2010). Corticotrophin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. *Horm Behav* 58 714-719. [doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.07.003](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.07.003).

Uchoa, E.T., Silva, L.E., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L. (2012). Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropeptides* 46 119-124. [doi: 10.1016/j.npep.2012.02.002](https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.02.002).

Van Cauter, E., Blackman, J. D., Roland, D., Spire, J. P., Refetoff, S., & Polonsky, K. S. (1991). Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *The Journal of clinical investigation*, 88(3), 934–942. <https://doi.org/10.1172/JCI115396>.

Velkoska, E., Cole, T. J., & Morris, M. J. (2005). Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 288(6), E1236–E1243. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00505.2004>

Verboven, K., Wouters, K., Gaens, K., Hansen, D., Bijnen, M., Wetzels, S., Stehouwer, C. D., Goossens, G. H., Schalkwijk, C. G., Blaak, E. E., & Jocken, J. W. (2018). Abdominal subcutaneous and visceral adipocyte size, lipolysis and inflammation relate to insulin resistance in male obese humans. *Scientific reports*, 8(1), 4677. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22962-x>.

Vicennati, V., & Pasquali, R. (2000). Abnormalities of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in nondepressed women with abdominal obesity and relations with insulin resistance: evidence for a central and a peripheral alteration. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(11), 4093–4098. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.11.6946>.

Walker, C., Salzmann, C., Long, H., Otis, M., Roberge, C. and Gallo-Payet, N. (2004). Direct Inhibitory Effects of Leptin on the Neonatal Adrenal and Potential Consequences for Brain Glucocorticoid Feedback. *Endocrine Research*, 30(4), pp.837–844. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/ERC-200044096>.

Wang, D. M., Burrage, W. S., Irwin, J. W., & Aronow, S. (1955). Cortisone or hydrocortisone in the treatment of severe, intractable asthma?. *The Journal of allergy*, 26(5), 448–452. [https://doi.org/10.1016/0021-8707\(55\)90035-6](https://doi.org/10.1016/0021-8707(55)90035-6).

Wang, Y., Jones Voy, B., Urs, S., Kim, S., Soltani-Bejnood, M., Quigley, N., Heo, Y. R., Standridge, M., Andersen, B., Dhar, M., Joshi, R., Wortman, P., Taylor, J. W., Chun, J., Leuze, M., Claycombe, K., Saxton, A. M., & Moustaid-Moussa, N. (2004). The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. *The Journal of nutrition*, 134(5), 1032–1038. <https://doi.org/10.1093/jn/134.5.1032>

Westlund, K. N., Aguilera, G., & Childs, G. V. (1985). Quantification of morphological changes in pituitary corticotropes produced by in vivo corticotropin-releasing factor stimulation and adrenalectomy. *Endocrinology*, 116(1), 439–445. <https://doi.org/10.1210/endo-116-1-439>.

Wiedmer, P., Klaus, S., & Ortmann, S. (2002). Energy metabolism of young rats after early postnatal overnutrition. *The British journal of nutrition*, 88(3), 301–306. <https://doi.org/10.1079/BJN2002660>

Windeløv, J.A., Pedersen, J. and Holst, J.J. (2016). Use of anesthesia dramatically alters the oral glucose tolerance and insulin secretion in C57Bl/6 mice. *Physiological Reports*, 4(11), p.e12824. Available from: <http://doi.wiley.com/10.14814/phy2.12824>.

Wu, X., Zayzafoon, M., Zhang, X., & Hameed, O. (2011). Is there a role for fatty acid synthase in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma?: A comparison with AMACR. *American journal of clinical pathology*, 136(2), 239–246. <https://doi.org/10.1309/AJCP0Y5QWWYDKCJE>

Wurie, H. R., Buckett, L., & Zammit, V. A. (2012). Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells. *The FEBS journal*, 279(17), 3033–3047. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08684.x>.

Wurtman R. J. (1966). Control of epinephrine synthesis by the pituitary and adrenal cortex: possible role in the pathophysiology of chronic stress. *Recent advances in biological psychiatry*, 9, 359–368. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8228-7\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8228-7_26).

Xavier, J.L.P., Scomparin, D.X., Pontes, C.C., Ribeiro, P.R., Cordeiro, M.M., Marcondes, J.A., Mendonça, F.O., Silva, M.T.D., Oliveira, F.B., Franco, G.C.N., Grassioli, S. (2019). Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring. *An Acad Bras Cienc.* 91(1), e20170971. <https://www.scielo.br/j/aabc/a/qSx98svbCnqswZGBWPwx3gB/?lang=en>.

Xiao, X. Q., Williams, S. M., Grayson, B. E., Glavas, M. M., Cowley, M. A., Smith, M. S., & Grove, K. L. (2007). Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. *Endocrinology*, 148(9), 4150–4159. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0373>

Yang, F., Dai, Y., Min, C., & Li, X. (2018). Neonatal overfeeding induced glucocorticoid overexposure accelerates hepatic lipogenesis in male rats. *Nutrition & metabolism*, 15, 30. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0272-0>

Yilmaz, A., Suleyman, H., Umudum, Z., & Sahin, Y. N. (2002). The effect of adrenalectomy on leptin levels and some metabolic parameters in rats with diet-induced obesity. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(5), 580–583. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.580>

Younossi, Z. M., Rinella, M. E., Sanyal, A. J., Harrison, S. A., Brunt, E. M., Goodman, Z., Cohen, D. E., & Loomba, R. (2021). From NAFLD to MAFLD: Implications of a Premature Change in Terminology. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 73(3), 1194–1198. <https://doi.org/10.1002/hep.31420>

Yukimura, Y., Bray, G.. and Wolfse, A.. (1978). Some Effects of Adrenalectomy in the Fatty Rat. *Endocrinology*, 103(5), pp.1924–1928. <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-103-5-1924>.

Zakrzewska, K.E.; Cusin, I.; Stricker-Krongrad, A.; Boss, D.; Ricquer, D.; Jeanrenaud, B.; Rohner-Jeanrenaud, F (1999). Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes*, v. 48, p. 365-375.

Zhang, J., Wang, C., Terroni, P. L., Cagampang, F. R., Hanson, M., & Byrne, C. D. (2005). High-unsaturated-fat, high-protein, and low-carbohydrate diet during pregnancy and lactation modulates hepatic lipid metabolism in female adult offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 288(1), R112–R118. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00351.2004>

## 6. ANEXOS

### 6.1. ANEXO A - Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 60/2019

Londrina, 24 de abril de 2019.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: “Supernutrição pós-natal por redução da ninhada: efeitos nos parâmetros metabólicos e reprodutivos em fêmeas e participação dos glicocorticoides nas alterações metabólicas em machos” protocolo CEUA nº 3457.2019.11 sob a responsabilidade de **Ernane Torres Uchôa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel), em **24/04/2019**.

Este projeto tem por objetivo avaliar os efeitos da manipulação do tamanho da ninhada no desenvolvimento sexual, metabólico e comportamento reprodutivo de fêmeas e de suas proles, e avaliar os efeitos da adrenalectomia e do tratamento prolongado com corticosterona nas respostas induzidas pelo método de manipulação do tamanho da ninhada na homeostase energética em machos. Grau de Invasividade: 3

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/06/2019 a 31/05/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogêneo / Wistar
Nº de animais	<b>Matrizes: 80 machos e 60 fêmeas oriundos do Biotério Central do CCB</b> Prole estimada - 1ª geração: 300 machos e 300 fêmeas Prole estimada - 2ª geração: 100 machos e 100 fêmeas Total: 940 animais
Peso/ Idade	Matrizes adultas: 210-230g Prole estimada - 1ª geração: 60 a 90 dias Prole estimada - 2ª geração: 60 dias
Sexo	480 Machos e 460 fêmeas
Origem	Biotério Central do CCB da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, cérebro, tecido adiposo, swab vaginal e adrenais

Cumprе orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel, anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Prof. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
Coordenadora da CEUA/Uel

Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda  
Rodrigues Graciano  
Coordenadora da Comissão de  
Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual de Londrina  
e-mail: uea@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)

**Prof. (a) Dr. (a). Ernane Torres Uchôa**

**Responsável pelo projeto**

Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para a Chefia do Depto. de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para a Direção de Centro do CCB

C/C para o Biotério Central/CCB

6.2. ANEXO B – Artigo referente ao Estudo 1: “Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats”. *Life Sciences*. 2022 Sep 1;304:120721. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120721.

Life Sciences 304 (2022) 120721



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lifesci](http://www.elsevier.com/locate/lifesci)



Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats

Camila F. de Souza<sup>a</sup>, Larissa Rugila S. Stopa<sup>b</sup>, Andressa B. Martins<sup>a</sup>, Ana Luiza M. Wunderlich<sup>b</sup>, Gabriela Mendicelli Lopes<sup>c</sup>, Dimas A.M. Zaia<sup>d</sup>, Cassia Thais B.V. Zaia<sup>e</sup>, Fábio Goulart de Andrade<sup>e</sup>, Cristiane Mota Leite<sup>f</sup>, Ernane Torres Uchoa<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>c</sup> Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>d</sup> Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>e</sup> Department of Histology, State University of Londrina, Londrina, Brazil

<sup>f</sup> University of Northern Paraná (UNOPAR), Londrina, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Glucocorticoids  
Litter size reduction  
Mineralocorticoid receptor  
Negative feedback

ABSTRACT

**Aims:** Litter size reduction on the first days of life results in increased body weight and adiposity, with higher levels of circulating glucocorticoids. Obese rodents are more sensitive to the anabolic effects of glucocorticoids and less responsive to glucocorticoids feedback on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. This study aimed to evaluate effects of the treatment with corticosterone on metabolic responses and HPA axis in adult male rats reared in small litters.

**Main methods:** From postnatal day (PND) 60 to 88, adult male rats of normal (NL- 10 pups/dam) and small (SL- 3 pups/dam) litters received oral treatment with Corticosterone (CORT-15 µg/L) in the drinking water or no treatment, composing the four experimental groups (NL-water; NL-CORT; SL-water and SL-CORT), for the evaluation of energy homeostasis and HPA axis.

**Key findings:** Male rats of SL-water group presented on PND88: glucose intolerance, higher adiposity, plasma triglycerides, free fatty acids, total and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and corticosterone. SL-water animals showed increased mRNA of corticotrophin-releasing hormone (CRH) in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and proopiomelanocortin (POMC) in the pituitary, with decreased mRNA expression of PVN mineralocorticoid receptor. NL-CORT animals presented glucose intolerance, increased body weight, food intake, total and LDL cholesterol. Glucocorticoid treatment reduced corticosterone levels and adrenal cortex thickness in NL group, associated with increased mRNA of PVN CRH and pituitary POMC, without effects on SL animals.

**Significance:** Lactation overnutrition promotes hyperreactivity of HPA axis and reduces the responsiveness to glucocorticoids effects on energy balance and negative feedback of HPA axis in adult male rats.

1. Introduction

The nutritional status during early life can lead to important repercussions in the individual's adult life [1], as well-established by the “Developmental origins of health and disease” (DOHaD) concept. Post-natal nutrition in rodents may be modified by manipulating the litter

size [1], and litter size reduction method has been widely used to observe the long-term effects of lactation overnutrition, in which the animals are allocated in smaller litters (SL), with 3 or 4 pups/dam, compared to the control, with approximately 10 to 12 pups/dam [2]. Thus, litter reduction induces overnutrition by increasing milk intake, leading to the early development of obesity, which persists until

\* Corresponding author at: Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, UEL, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário, Londrina, PR 860570-970, Brazil.  
E-mail address: [erchoa@uel.br](mailto:erchoa@uel.br) (E.T. Uchoa).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120721>

Received 2 April 2022; Received in revised form 5 June 2022; Accepted 13 June 2022

Available online 15 June 2022

0024-3205/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

**6.3. ANEXO C - Artigo referente à parte do Estudo 2: “Glucocorticoids contribute to metabolic and liver impairments induced by lactation overnutrition in male adult rats” submetido para a revista *Frontiers in Physiology*.**

**Glucocorticoids contribute to metabolic and liver impairments induced by lactation overnutrition in male adult rats.**

Camila F. de Souza<sup>1</sup>, Larissa Rugila S. Stopa<sup>2</sup>, Andressa B. Martins<sup>1</sup>, Ana Luiza M. Wunderlich<sup>2</sup>, Gabriela L. Mendicelli<sup>3</sup>, Flaviane de F. Silva<sup>5</sup>, Ayumi Cristina Medeiros Komino<sup>5</sup>, Dimas A. M. Zaia<sup>4</sup>, Cassia Thaïs B. V. Zaia<sup>1,2,3</sup>, Fabio Bessa Lima<sup>5</sup>, Ernane Torres Uchoa<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

<sup>5</sup> Department of Physiology and Biophysics, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

\*Correspondence addresses:

Ernane Torres Uchoa

Department of Physiological Sciences

State University of Londrina, UEL

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, km 380, Campus Universitário

Londrina - PR, 860570-970, Brazil

Phone: +554333715928 / +554333714307

FAX: +554333714254

E-mail: [ernane\\_uchoa@yahoo.com.br](mailto:ernane_uchoa@yahoo.com.br) / [euchoa@uel.br](mailto:euchoa@uel.br)

## Abstract

**Introduction:** Lactation overnutrition is a programming agent of energy metabolism, and litter size reduction leads to the early development of obesity, which persists until adulthood. Liver metabolism is disrupted by obesity, and increased levels of circulating glucocorticoids are pointed as a possible mediator for the obesity development, since bilateral adrenalectomy (ADX) can reduce obesity in different models of obesity.

**Methods:** This study aimed to evaluate the effects of glucocorticoids on metabolic changes and liver lipogenesis and insulin pathway induced by lactation overnutrition. For this, on the postnatal day 3 (PND), 3 pups (small litter - SL) or 10 pups (normal litter - NL) were kept with each dam. On PND 60, male Wistar rats underwent bilateral adrenalectomy (ADX) or fictitious surgery (sham), and half of ADX animals received corticosterone (CORT- 25 mg/L) diluted in the drinking fluid. On PND 74, the animals were euthanized by decapitation for trunk blood collection, and liver dissection and storage.

**Results and Discussion:** SL rats presented increased corticosterone, free fatty acids, total and LDL-cholesterol plasma levels, without changes in triglycerides (TG) and HDL-cholesterol. The SL group also showed increased content of liver TG, and expression of fatty acid synthase (FASN), but decreased expression of PI3K<sub>p110</sub> in the liver, compared to NL rats. In the SL group, the ADX decreased plasma levels of corticosterone, FFA, TG and HDL cholesterol, liver TG, and liver expression of FASN, and IRS2, compared to sham animals. In SL animals, CORT treatment increased plasma levels of TG and HDL cholesterol, liver TG, and expression of FASN, IRS1, and IRS2, compared with the ADX group. In summary, the ADX attenuated plasma and liver changes observed after lactation overnutrition, and CORT treatment could reverse most ADX-induced effects.

**Conclusion:** Thus, increased circulating glucocorticoids are likely to play a pivotal role in liver and plasma impairments induced by lactation overnutrition in male rats.

Keywords: adrenalectomy, corticosterone, litter size reduction, triglycerides, obesity.

## 1. Introduction

The nutritional or hormonal setting during fetal and/or postnatal periods plays an important modulatory role. It is known that the development of several organs is not completed at birth and it often continues during the lactation period (Ellsworth et al., 2018). So, this window may be considered a vulnerable time for offspring, once the systems are plastic and sensitive to changes in the environment, which will result in effects on adult life, as well-established by the “Developmental origins of health and disease” (DOHaD) concept (Barker, 1998).

Food intake during the neonatal period is a relevant factor for the development of obesity in adulthood (Fiorotto et al., 1991). In this context, the litter size reduction method in rodents is an important tool to observe the long-term effects of lactation overnutrition as demonstrated for the first time by Kennedy in 1957 (Plagemann, 2006). This method consists of allocating the pups in smaller litters (SL), with 3 pups/dam compared with the control with 10 pups/dam. Then, the animals from SL develop earlier obesity which persists until adulthood (Plagemann 2006; Spencer 2013).

One of the comorbidities of obesity is triglycerides (TG) accumulation in the liver which occurs from an imbalance between lipid input, as fatty acid uptake and *de novo* lipogenesis (DNL), and lipid output as very low-density lipoprotein (VLDL) (Donnelly et al., 2005; Doege et al., 2006; Bradburry et al., 2006). Under physiological conditions, the concentration of hepatic TG is low, since the liver is not a fat storage organ. Therefore, in a condition of excess of carbohydrates, the liver produces fatty acids by DNL and exports triglyceride as VLDL (Donnelly et al., 2005; Doege et al., 2006; Bradburry et al., 2006; Nestel et al., 1962; Cohen et al., 2011).

Obesity is associated TG accumulation in the liver, once the lipid storage capacity of an expanded adipose tissue is limited, and the excess of lipids, and TG are stored in hepatocytes. The sources of TG in the liver are increased lipolysis (approximately 60%) and DNL in the liver (25%) (Donnelly et al., 2005). In this context, the DNL consists in synthesizing non-esterified fatty acids from glucose. For this, glucose is converted to acetyl-CoA through glycolysis, and acetyl-CoA is then converted to malonyl-CoA by acetyl-CoA carboxylase (ACC). Fatty acid synthase enzyme (FASN) catalyzes the formation of palmitic acid from malonyl-CoA and acetyl-CoA. Palmitic acid is then elongated and desaturated to generate monounsaturated fatty acids, which are the major fatty acid constituents of TG. Acyl-CoAs are esterified to form diacylglycerol, which is esterified to another acyl-CoA molecule to form triglyceride by the acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase (DGAT), which seems to be especially important for VLDL production (Wurie et al., 2012; Heeren and Scheja, 2021). Another important molecule in DNL is the Apolipoprotein B100 (Apo B100), which is synthesized by hepatocytes and has a unique feature of the ApoB molecule the ability to interact with lipid species (phospholipids, cholesterol, TG, and cholesteryl esters) used to arrangement of VLDL (Rutledge et al., 2009).

Lipid accumulation in the liver has a relationship with fetal and neonatal programming impairment in liver lipid metabolism (Oben et al., 2010). Animals with childhood obesity present metabolic liver dysfunctions such as TG accumulation (Oben et al., 2010), increased circulating free fatty acids, hyperinsulinemia, impairment of the insulin signaling pathway in the liver and skeletal muscle, in addition to a higher concentration of circulating glucocorticoids (Hou et al., 2011), once that hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) of these animals matured more quickly (Spencer & Tilbrook, 2009; Boullu-ciocca et al., 2005). According to the literature, adrenal glucocorticoids

have an important role in energy homeostasis. Glucocorticoids are known to increase appetite and body weight in humans and rodents (Tataranni et al., 1996; Zakrzewska et al., 1999), and their excess can increase central adiposity, as seen in Cushing's syndrome (Rebuffé-Scrive et al., 1988). Different models of obesity have increased plasma concentrations of glucocorticoids, and conversely, bilateral removal of the adrenal glands, adrenalectomy (ADX), can attenuate or prevent the development of obesity (Bruce et al., 1982; Yukimura et al., 1978; Dubuc & Wilden, 1986; Romsos, D. R., 1991). Within lipid metabolism, glucocorticoids act in the synthesis and oxidation of fatty acids, the esterification of fatty acids to triglyceride and phospholipid, and the outward hepatic transport of lipoprotein lipids (Klausner and Heimberg, 1957).

Thus, it is known that: 1) glucocorticoids are pointed as possible mediators for obesity development and its comorbidities in different experimental models; 2) animals with obesity due to litter reduction show metabolic liver dysfunctions and increased circulating glucocorticoids; 3) the litter size reduction method is a model that leads to obesity and its comorbidities; 4) ADX reverses several anabolic effects in models of obesity. Therefore, this study hypothesized that glucocorticoids contribute to dyslipidemia and metabolic liver dysfunctions in adult male rats induced by neonatal obesity. For the investigation of this hypothesis, the current work aimed to evaluate the effects of ADX on biometric parameters, plasma lipid profile, lipid metabolism and insulin signaling pathway in the liver in adult male animals reared in small litters.

## **2. Material and Methods**

### **Animals.**

Male Wistar rats (n=77) were obtained from the mating of 37 females with males from the Animal Facility of State University of Londrina (UEL). Of these 37 females, the pregnancy was confirmed by the presence of sperm on the vaginal smear of 33 females (89%). The adjustment of the litter size occurred on the postnatal day (PND) 3, with PND 0 considered the day of birth. The lactation overnutrition was induced remaining with dam 3 pups, 2 males and 1 female to compose the small litter (SL), and the normal litter (NL) remained with dam 10 pups, 5 males and 5 females (Stopa et al., 2021). The surplus pups were anesthetized with an association of ketamine (100 mg/kg, 10%, Agener União, Apucarana, Brazil) and xylazine hydrochloride (20 mg/kg, 2%, Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, Brazil) intraperitoneally, and euthanized by decapitation. After weaning, the dams were also anesthetized with the above-mentioned association of ketamine and xylazine hydrochloride intraperitoneally, and euthanized by decapitation, the female pups were used in other experiments and the male pups were used in the current study and were housed in groups of 3 to 4 rats of the same experimental group in each cage. The animals were kept in controlled conditions of light (12 h light/dark cycle: 6 am to 6 pm/6 pm to 6 am) and temperature ( $22 \pm 2$  °C), with fluid and feed ad libitum, except for the hours of feed restriction before the euthanasia. All experiments were performed at the Department of Physiological Sciences/UEL. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use for experimentation (CEUA number: 3457.2109.11, Of. Circ. CEUA 60/2019).

### **Adrenalectomy or fictitious surgery (sham).**

Bilateral ADX and sham surgeries were performed under anesthesia with the association of ketamine (100 mg/kg, Agener União) and xylazine hydrochloride (20 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, Brazil, 2%) intraperitoneal, and a single dorsal

midline incision on the skin and a bilateral small cut through the muscle layer was made. After the surgery and during the experimental period, ADX animals were given 0,9% saline with 0.5% ethanol, without corticosterone (ADX) or with corticosterone (B: corticosterone, Sigma Co., CA) (ADX+B) at the concentration of 25 mg/L (Uchoa et al., 2009a, b, 2010, 2012). There was about 15% of mortality of animals submitted to ADX surgery during or after the first days of the procedure. Sham-operated animals underwent similar surgical procedures without removal of adrenal glands and were given tap water with 0.5% ethanol to drink.

### **Experiment protocol.**

The evaluation of the weight the animals was performed on PND 3, 7, 10, 14, 17, and 21 (Stopa et al., 2021). From PND 21, the weaning day, the animals were weighed every 5 days until PND 60. On PND 60, animals of both litters were submitted to bilateral adrenalectomy (ADX) or sham surgery (fictitious surgery). After the surgery, the animals were kept with access to the solution of water containing 0,5% ethanol, or 0,9% NaCl containing 0,5% ethanol, or 0,9% NaCl containing corticosterone (25mg / L) diluted in ethanol 0,5% for 14 days, according to the experimental group (NL-*sham*; SL-*sham*; NL-ADX; SL-ADX; NL- ADX+B and SL-ADX+B). All animals were weighed, and the amount of food ingested was daily evaluated for a period of 14 days. On PND 74, the rats were weighed, and the nasoanal length was measured, for Lee index determination (Bernardis and Patterson, 1968), and the animals were kept under food restriction from 8 am to 2 pm and non-anesthetized animals were euthanized by decapitation at 2 pm (Fig. 1). After euthanasia, blood was collected to assess plasma concentrations of corticosterone, free fatty acids (FFA), TG, total, HDL and LDL cholesterol. The liver was removed, and the left lobe was stored for TG content and western blotting analyses.

### **Euthanasia.**

For the purpose to avoid hormonal and biochemical changes induced by anesthesia (Windeløv et al 2016; Guarino et al. 2013), the euthanasia was performed by decapitation in non-anesthetized animals after 6 hours feed restriction, as approved by the Ethics Committee on Animal Use for experimentation (CEUA number: 3457.2109.11, Of. Circ. CEUA 60/2019). The blood was immediately collected in heparinized tubes and centrifuged at 14,000 ×g for 20 min at 4 °C to plasma obtention, which was stored at -20 °C for biochemical analysis.

### **Measurement of plasma concentration of corticosterone, FFA, TG, total, HDL, and LDL cholesterol.**

The determination of plasma concentrations of total cholesterol, HDL cholesterol (commercial kits, VIDA biotechnology, MG), LDL cholesterol (commercial kits, Wiener lab., Argentina), TG (commercial kits, Laborclin, PR) and FFA (Falholt et al., 1973) were performed by the spectrophotometric method. The Fluorimetric method of Guillemin et al (1958) was used to determine corticosterone (de Souza et al. 2019; Stopa et al. 2019; Stopa et al. 2021).

### **Analysis of liver TG content.**

To measure the liver TG content, lipids were extracted from liver samples with chloroform-methanol by the Folch method (Folch et al., 1957) as previously described (de Fatima Silva et al., 2022). The TG were determined by enzymatic assay (commercial kit, Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) and expressed by mg of TG by 100 mg of the liver.

### **Protein expression by Western Blotting in the liver.**

Liver samples were homogenized in extraction buffer (135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EDTA, 5 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 10 mM NaF, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 20 mM Tris, 2 mM PMSF, 2.5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, cOmplete™ tablets, and pH 7.4) to obtain the total protein fraction. The homogenate was centrifuged (12,000 rpm, 40 minutes, 0 °C), and the total proteins of the supernatant were quantified by the Bradford method (Bradford, 1976).

In all analyzes, equal amounts of total proteins (35 µg) plus Laemmli buffer (BioRad, #1610747) were added to 8% polyacrylamide gel, submitted to electrophoresis, and transferred to nitrocellulose membrane. The membranes were blocked with 4% BSA diluted in phosphate-buffered saline with 0.1% Tween 20 (PBST) and incubated overnight (4 °C) with the primary antibody diluted in 4% BSA in PBST, as detailed in supplementary file. On the next day, membranes were rinsed (4×5 minutes) with PBST, followed by 75 min incubation with secondary antibody conjugated to peroxidase (rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch, #111-035-003; mouse IgG, Jackson ImmunoResearch, #115-035-003; or goat IgG, Jackson ImmunoResearch, #305-035-003; all secondaries 1:5000 diluted in 0.1% PBST; room temperature). A new 4 x 5 min 0.1% PBST rinse protocol was performed and the membranes were incubated for 2 minutes with peroxidase substrate (Clarity Western ECL, BioRad, #1705061) for chemiluminescence detection (G:BOX, Syngene™). The density of the blots was analyzed in Image J software (National Institutes of Health, USA) and expressed in arbitrary units after normalization by the constitutive protein vinculin. Different targets were obtained from different membranes, except for the phosphorylated proteins, where after the incubation with the anti-phospho antibodies, the respective membrane was stripped, blocked, and incubated with the total antibody for each protein. For each membrane the control blot vinculin was performed, to assure the sample loading and provide accurate normalization.

### **Statistical analysis.**

The normal distribution and homogeneity of the data were tested by Shapiro-Wilk test and Levene's test, respectively, and the results were analyzed by two-way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test. Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## **3. Results**

### **Adrenalectomy attenuates changes in ponderal, and biochemical parameters induced by lactation overnutrition by litter size in male rats:**

The body weight along the experimental protocol showed no interaction among days (PND 60 to 74), litter size (NL and SL) and groups (sham, ADX, and ADX+B) [F(28;924)=0.888,  $p=0.532$ ], but with effects of days [F(14;53)=63.395,  $p < 0.0001$ ], litter size [F(1;66)=89.42,  $p < 0.0001$ ] and groups [F(2;66)=3.641,  $p=0.032$ ]. This body weight response was integrated into the area under the curve (AUC) of body weight, which showed no interaction between the groups and litter size on the AUC of body weight [F(2;66)=0.055,  $p=0.946$ ], with effects of litter size [F(1;66)=89.6,  $p < 0.0001$ ] and groups [F(2;66)=3.83,  $p=0.027$ ]. SL animals demonstrated an increase in body weight compared with NL groups. ADX animals reduced body weight compared with the sham group and the treatment with corticosterone increased body weight, compared with the ADX group in both litters (Fig. 2.A, B).

An interaction was observed between groups and litter size on food intake [F(2;68)=5.88, p=0.004]. Food intake of SL animals of sham and ADX+B groups was lower than shown in NL groups. ADX groups in both litters showed a reduction in food intake, compared with sham animals, and treatment with corticosterone reversed ADX effects in NL animals (Fig. 2.C). No interaction was observed between groups and litter size on fluid intake [F(2;68)=1.31, p=0.28], without effects of litter size [F(1;68)=2.05, p=0.16] and groups [F(2;68)=15.33, p<0.001]. ADX + B groups in both litters showed increased fluid intake compared with ADX and sham animals (Fig. 2.D).

No interaction was observed between the groups and litter size on the weights of epididymal [F(2;66)=0.394, p=0.676] and retroperitoneal [F(2;67)=0.668, p=0.516] adipose tissues, with effects of litter size for epididymal [F(1;66)=11.46, p<0.001] and retroperitoneal depots [F(1;67)=12.2, p<0.001], as well as with effects of groups for epididymal [F(2;66)=23.6, p<0.0001] and retroperitoneal depots [F(2;67)=27.3, p<0.0001]. SL animals showed increased weights of both fat depots compared with NL groups. ADX animals reduced the weights of epididymal and retroperitoneal adipose tissues compared with the sham group and the treatment with corticosterone increased the weight of these fat depots, compared with the ADX group in both litters (Fig. 2.E, F). No interaction was observed between the groups and litter size on Lee index [F(2;68)=0.09, p=0.914], with no effects of litter size [F(1;68)=0.015, p=0.903] and with effects of groups [F(2;68)=4.11, p=0.021]. ADX groups in both litters demonstrated a decrease in the Lee index compared with their respective sham animals (Fig. 2.G).

There was an interaction between groups and litter size on FFA [F(2;57)=5.59, p=0.006] and TG [F(2;59)=3.29, p=0.044] plasma levels. In sham animals, SL induced an increase in FFA plasma levels, and ADX reduced this response, without the effects of corticosterone treatment. ADX reduced plasma levels of TG and corticosterone treatment reversed this response in both litters, but TG levels were lower in ADX+B animals of SL than ADX-SL and ADX+B-NL groups. (Fig. 3.A and B).

An interaction was observed between groups and litter size (NL and SL) on plasma levels of total [F(2;56)=5.54, p=0.006] and LDL cholesterol [F(2;58)=5.52, p=0.006], without interaction in HDL cholesterol [F(1;61)=2.22, p=0.117]. The reduction the litter size promoted higher plasma levels of total and LDL cholesterol in the sham group compared to NL-sham animals. In the NL group, the treatment with corticosterone in ADX group induced higher concentrations of total and LDL cholesterol than in sham and ADX group (Fig. 3.C and D). Plasma levels of HDL cholesterol showed effects of the group [F(2;61)=19.72, p<0.001], without effects of the litter size [F(1;61)=0.7, p=0.407]. ADX reduced (p<0.001) HDL plasma levels, compared to the sham group, and corticosterone treatment reversed (p<0.001) this effect in both litters (Fig. 3.E).

Interaction was not observed between group and litter size on the plasma concentrations of corticosterone [F(2;47)=5.16, p=0.009]. Reduction of the litter size induced higher (p<0.05) plasma concentrations of corticosterone in sham animals compared to their respective NL animals. Adrenalectomy reduced (p<0.05) plasma concentration of corticosterone in both litters and treatment with corticosterone enhanced the plasma concentration of corticosterone only in NL animals, without effects in SL animals (Fig. 3.F).

### **Effects of adrenalectomy and treatment with glucocorticoid on liver insulin signaling pathway of adult male rats with lactation overnutrition:**

No interaction was observed between the groups and litter size on pIR/IR [F(2;50)=1.08, p=0.35], with no effects of litter size [F(1;50)=2.56, p=0.12] and groups

[F(2; 50)=0.18, p=0.84] (Fig.4 A). There was also no interaction between the groups and litter size (NL and SL) on IRS1 [F(2;50)=1.00, p=0.37], with no effects of litter size [F(1;50)=0.32, p=0.57] and with effects of groups [F(2;50)=4.67, p=0.014] (Fig.4 B). Treatment with corticosterone in ADX animals promoted higher expression of IRS1 in the liver of both litters. Interaction was not observed between the groups and litter size (NL and SL) on IRS2 [F(2;50)=0.13, p=0.88], with no effects of litter size [F(1;50)=2.55, p=0.12] and with effects of groups [F(2;50)=12.59, p< 0.001]. ADX animals of both litters showed a decrease in expression of IRS2, compared to sham, and treatment with corticosterone reversed this response (Fig.4 C).

Interaction was not observed between the groups and litter size on <sup>Ser473</sup>pAKT/AKT [F(2; 50)=1.41, p=0.25], with no effects of litter size [F(1;50)=1.71, p=0.20] and groups [F(2; 50)=1.21, p=0.31] (Fig.4 D). There was no interaction between the groups and litter size on p<sub>110α</sub>PI3K [F(2;47)=1.72, p=0.19], with effects of litter size [F(1;47)=15.76, p<0.001] and with no effects of groups [F(2;47)=0.88, p=0.42] (Fig.4 E). The reduction of the litter size promoted a decrease in the expression of p<sub>110α</sub>PI3K compared with NL animals. No interaction was also between the groups and litter size on GLUT 2 [F(2;49)=0.19, p=0.83], without effects of litter size [F(1;49)=0.99, p=0.33] and groups [F(2;49)=1.19, p=0.31] (Fig.4 F).

#### **Effects of adrenalectomy and treatment with glucocorticoid on lipid metabolism in the liver of adult male rats with lactation overnutrition:**

No interaction was observed between the groups and litter size on liver TG [F(2;52)=0.27, p=0.76], with effects of litter size [F(1;52)=48.73, p<0.001] and groups [F(2;52)=12.73, p<0.001]. SL groups presented higher (p<0.05) liver TG content than NL animals. ADX promoted reduction (p<0.05) in liver TG content and the treatment with corticosterone reversed this response in both litters (Fig. 5 A).

There was no interaction between the groups and litter size on p-ACC/ACC [F(2;45)=1.60, p=0.21], with no effects of litter size [F(1;45)=0.0003, p=0.99] and with effects of groups [F(2;45)=2.49, p= 0.21] (Fig. 5 B). No interaction was observed between the groups and litter size (NL and SL) on FASN [F(2;47)=0.24, p=0.79], with effects of litter size [F(1;47)=7.01, p=0.011] and groups [F(2;47)=6.82, p=0.003] (Fig. 5 C). The reduction of the litter size promoted an increase of FASN expression, compared with NL animals, while the adrenalectomy reduced the FASN expression, and the treatment with corticosterone reverted this parameter in both litters.

Additionally, there was no interaction between the groups and litter size (NL and SL) on DGAT2 [F(2;50)=0.06, p=0.94], with no effects of litter size [F(1;50)=1.92, p=0.17] and groups [F(2;50)=0.06, p= 0.94] (Fig. 5 D). Also, no interaction was observed between the groups and litter size (NL and SL) on APOB100 [F(2;50)=1.22, p=0.30], with no effects of litter size [F(1;50)=2.96, p=0.092] and groups [F(2;50)=0.53, p= 0.59] (Fig. 5 E).

Finally, no interaction was observed between the groups and litter size (NL and SL) on 11β hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11βHSD1) [F(2; 50)=0.05, p=0.95], with effects of litter size [F(1; 50)=6.27, p=0.02] and without effects of groups [F(2;50)=1.64, p=0.20] (Fig. 6 A). All SL animals showed decreased 11βHSD1 expression compared with NL groups (Fig. 5 F).

#### **4. Discussion**

The present study aimed to investigate the glucocorticoids' contribution to metabolic and lipidic liver functions in adult male Wistar rats with lactation overnutrition. For this purpose, the effects of ADX and the treatment with corticosterone were analyzed

as tools to reach these goals. Indeed, this study is the pioneer to show that ADX attenuated plasma and liver changes observed after lactation overnutrition, and corticosterone treatment reversed most of the ADX-induced effects, indicating that circulating glucocorticoids contribute to liver and plasma impairments induced by childhood obesity in adult male rats.

There are different models to achieve obesity in rodents, and one of them is to observe the consequences of early neonatal overfeeding using the litter size reduction method (Plagemann et al., 1999a; Plagemann et al., 1999b). In this model, there is a decrease in competition for milk during the breastfeeding period and thus, several authors also affirm that the composition of breast milk is modified, presenting a higher concentration of lipids, mainly an increase in TG (Cunha et al., 2009; Moreira et al., 2009; Sefcikova et al., 2011).

The litter size reduction method programs overweight in adulthood according to several data (Rodrigues et al., 2009; Rodrigues et al., 2011; Ferretti et al., 2011; Plagemann et al., 1992; Boullu-Ciocca et al., 2005; Conceição et al., 2011). The increased body weight, adiposity and the impairment of lipidic profile in SL animals corroborates with the literature, where animals reared in small litters present obesity-related changes that persist until adulthood, as higher body weight, accompanied by higher circulating free fatty acids (FFA) (Bei et al. 2015) and total cholesterol, as well as fat depots (Hahn, 1984; Enes-Marques et al., 2020), without changes in plasma TG (Conceição et al. 2013, Rodrigues et al., 2007).

Interestingly, besides dyslipidemia, adult animals with childhood obesity also presented lipid accumulation in the liver, observed by increased liver TG content, accompanied by increased DNL, seen by enhanced expression of FASN in the liver, following previous studies (Ribas-Aulinas et al., 2021; Yang et al., 2018; Duff and Snell, 1982). Indeed, increased content of liver TG, as well as plasma levels of TG and FFA, might be ascribed to increased expression of FASN in the liver in SL animals, which could account for increased synthesis of fatty acids and consequently DNL.

In addition to higher body weight gain and impairment in lipidic profile, the SL animals also had a higher concentration of circulating glucocorticoids, as previously shown (Souza et al. 2022, Hou et al., 2011). Animals with obesity in different experimental models have increased levels of circulating glucocorticoids (Mantha et al., 1999., Tokuyama and Himms-Hagen 1989; Freedman et al. 1986), and removal of them by adrenalectomy attenuates or prevents the development of obesity (Romsos, D. R., 1991; Tokuyama and Himms-Hagen, 1989; Freedman et al., 1986), pointing glucocorticoids as a possible mediator of obesity in these experimental models. Accordingly, the role of glucocorticoids as an important modulator of energy balance in obesity induced by early overnutrition was also demonstrated in the current work, where ADX was able to reduce body weight gain and food intake, to induce an improvement in lipid profile, with reduction of FFA, TG, total and LDL cholesterol, and to reduce TG content as well as expression of FASN in the liver of SL animals, and treatment with corticosterone could restore most of these changes induced by ADX.

ADX-induced reduction of body weight gain and plasma lipid profile in childhood obesity is following the reversal effect of ADX on metabolic parameters in other obesity models (Alarrayed et al, 1992; Yilmaz et al., 2002; Kibenge and Chan, 2001; Mantha et al., 1999). Additionally, the decrease of triglyceride content and FASN expression in the liver by ADX may be due to the well-established stimulatory effects of glucocorticoids on both the accumulation of lipids and TG in the liver (Suzuki and Mizugashira, 1979) and the expression of key enzymes of DNL in the liver, as FASN (Wang et al., 2004; Lee et al., 2011). It is tempting to suggest that enhanced levels of circulating glucocorticoids

in SL animals might have permissive effects on FASN expression, and consequently DNL, and TG accumulation in the liver, since ADX was able to attenuate these parameters in the present work, and glucocorticoids are known to induce FASN and DNL (Wang et al., 2004; Lee et al., 2011), and TG content in the liver (Suzuki and Mizugashira, 1979). Conversely, *in vitro* studies showed that both lipid accumulation and TG content in HepG2 cells was significantly increased by glucocorticoid treatment by an increase of DNL (Yang et al., 2018). Thus, the lack of effects of litter size reduction and adrenal removal on the other molecules involved in lipid metabolism in the liver is likely to indicate that FASN is a key molecule underlying glucocorticoids-induced up-regulation of DNL and TG accumulation in the liver on adult male rats with childhood obesity.

Despite plasma insulin was not measured, it is known that animals reared in small litters present increased concentrations of circulating insulin (Conceição et al. 2013, Liu et al. 2013, Hou et al., 2011), and insulin acts in lipid metabolism, stimulating DNL mainly by upregulating the transcription factor sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c for expression of ACC and FASN (Csaki and Reue., 2010; Horton et al., 2002), important for fatty acid synthesis and lipid biosynthesis. In addition to this, insulin regulates glucose metabolism in the hepatocytes, stimulating glycolysis and synthesis of glycogen and inhibiting gluconeogenesis (Titchenell et al., 2017). For these outcomes, insulin binds to its receptor, insulin receptor (IR) in the membrane, a tyrosine kinase receptor which autophosphorylates itself in the internal surface of the cell upon insulin binding, and thereby activates its intrinsic tyrosine kinase activity, resulting in phosphorylation of substrates of insulin receptor (IRS) proteins on tyrosine residues, which can activate phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). PI3K is a dimer composed of a catalytic (p110) and a regulatory (p85) subunit, and the target proteins of PI3K are Akt and PKC isoforms (Barker et al., 1992; Lietzke et al., 200; Czech and Corvera, 1999). In this context, the reduction of the expression of PI3K in the liver of adult animals with neonatal overnutrition observed in the present work is according to impairment of hepatic PI3K pathway in neonatal overfed animals in adulthood shown in previous studies (Huang et al., 2021; Conceição et al., 2013), despite the other molecules of this pathway was unchanged in the current data, suggesting a partial disruption of the insulin signaling pathway in the liver of adult male rats with neonatal overnutrition.

GLUT2 in the liver is responsible for the influx of glucose in the postprandial period, and the efflux of glucose in the post-absorptive and fasting periods (Chadt et al., 2020). In addition to the insulin signaling pathway, the lack of changes in the expression of GLUT2 in the liver by either litter size reduction or adrenalectomy also points that increased DNL observed in SL animals is not related to insulin-induced glucose utilization in the liver, since PI3K-AKT pathway in this tissue was impaired in animals with childhood obesity. On the other hand, a decrease of IRS2 expression in the liver following ADX might underly reduction of FASN expression and TG content in this tissue, since IRS2 in the liver has been pointed as an important mediator of lipid synthesis and DNL in the liver (Eckstein et al., 2017).

The major function of the 11 $\beta$ -HSD1 is to convert inactive cortisone to active cortisol (corticosterone). This is in the endoplasmic reticulum and widely expressed in liver and adipose tissue being responsible for amplifying local glucocorticoids action (Bujalska, et al., 1997; Jamieson, et al., 1995; Masuzaki, et al., 2001). The majority of obesity animal models show that hepatic 11 $\beta$ -HSD1 expression and/or activity are unchanged (Morton et al., 2004) or reduced (Drake et al., 2005). Despite Yang et al (2018) have reported that postnatal overfeeding-induced litter size reduction leads to increased mRNA expression of 11 $\beta$ -HSD1 in the liver of adult male rats, the present data indicate the opposite, hepatic protein expression of 11 $\beta$ -HSD1 being down-regulated by neonatal

overnutrition. Accordingly, likely hepatic lipid accumulation leading to an increased risk of NAFLD during adulthood in animals with lactation overnutrition may be ascribed to increased circulating glucocorticoids, rather than glucocorticoids overexposure through 11 $\beta$ -HSD1 up-regulation in the liver. This reduction in liver 11 $\beta$ -HSD1 may account for partial impairment of the insulin signaling pathway in the liver in the present study, once overexpression of 11 $\beta$ -HSD1 in the liver in mice results in insulin resistance (Masuzaki et al., 2001; Peterson et al., 2004).

In spite of recovery of body weight in the SL/ADX+B group without recovery of food intake was unexpected, it seems to be a specific profile of SL animals to some challenges, since Marangon et al. (2020) have reported that SL animals also showed changes on body weight gain without changes on food intake. Within this, context, the lack of corticosteronemia elevation in the SL/ADX+B group, in spite of the highest values of fluid intake, is likely because SL animals might have been adapted to increased corticosterone plasma levels, and that the concentration of corticosterone treatment of 25mg/L, which was enough to restore corticosterone plasma levels to NL animals, could not be sufficient to restore corticosterone levels in SL animals. Accordingly, the treatment with corticosterone was, at least in part, effective in reversing or attenuating the effects of ADX even in SL animals, since some parameters have been partially or fully restored in ADX+B animals. However, it cannot be ruled out the possibility that other hormones of adrenal glands, as aldosterone, could also participate on these responses. In fact, replacement with aldosterone+corticosterone to ADX rats was more effective in enhancing food intake and body weight gain than only corticosterone replacement (Devenport et al., 1983, 1985). Furthermore, aldosterone replacement to ADX animals restored daily caloric intake, especially lipid intake, and body fat deposition (Devenport and Devenport, 1982; Tempel and Leibowitz, 1989). Altogether, it is important to point out that, besides corticosterone, aldosterone is another adrenal hormone important to be considered in the control of energy balance. Finally, it is important to highlight that a limitation of the current study was that female animals were included in the analysis; thus, the present conclusion is only to male rats, since male and female animals may have different responses.

## 5. Conclusion

In summary, metabolic and liver dysfunctions in adult male rats induced by neonatal overnutrition were attenuated by ADX, and the treatment with corticosterone restored most of them. Altogether, these data show that, likely in other obesity models, in childhood obesity, glucocorticoids also have permissive effects to induce hyperlipidemia and TG accumulation in the liver, probably by specific up-regulation of one of the key enzymes of DNL: FASN. In conclusion, the role of glucocorticoids in the metabolic impairments in obesity should be considered, and possibly be a target for interventions in obesity and metabolic syndrome.

### Conflict of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Funding Sources

This work received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (FA), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES- Finance Code 001), Brazil.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Superintendência de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (SETI), Fundação Araucária (FA) and Universidade Estadual de Londrina (PROPPG) for providing financial support for the publication fee.

## Author Contributions

**CFS:** Conceptualization (equal), Data curation (equal), Formal analysis, (equal) Investigation (equal), Methodology (equal), Project administration (equal), Supervision (equal), Validation (equal), Visualization (equal), Writing - original draft (equal), Writing - review & editing (equal). **LRSS:** Investigation (equal). **ABM:** Investigation (equal). **ALM:** Investigation (equal). **GML:** Investigation (equal). **FFS:** Investigation (equal), Methodology (lead), Writing - review & editing (lead). **ACMK:** Investigation (equal), Methodology (lead), Writing - review & editing (lead). **DAMZ:** Funding acquisition (equal), Investigation (lead), Methodology (lead). **CTBVZ:** Funding acquisition (equal), Investigation (equal), Methodology (equal). **FGA:** Funding acquisition (equal), Investigation (lead), Methodology (lead). **FBL:** Funding acquisition (equal), Investigation (lead), Methodology (lead). **CML:** Conceptualization (equal), Methodology (equal), Investigation (equal). **ETU:** Conceptualization (equal), Data curation (equal), Formal analysis (equal), Funding acquisition (equal), Methodology (equal), Project administration (equal), Resources (equal), Supervision (equal), Validation (equal), Visualization (equal), Writing - original draft (equal), Writing - review & editing (equal).

## Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this article. Further enquiries can be directed to the corresponding author.

## References

- Alarrayed, F., Hartman, A. D., & Porter, J. R. (1992). Is there a role for the adrenals in the development of hypercholesterolemia in Zucker fatty rats?. *The American journal of physiology*, 263(2 Pt 1), E287–E295. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1992.263.2.E287>
- Backer, J. M., Myers, M. G., Jr, Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., & Schlessinger, J. (1992). Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *The EMBO journal*, 11(9), 3469–3479. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05426.x>
- Barker, D.J.P. (1998). In utero programming of chronic disease. *Clinical Science*, 95(2), p.115.
- Bei, F., Jia, J., Jia, Y. Q., Sun, J. H., Liang, F., Yu, Z. Y., & Cai, W. (2015). Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids in health and disease*, 14, 96. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0094-2>
- Bernardis, L.L. and Patterson, B.D (1968). Correlation between "Lee Index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal Endocrinology*, v. 40, p. 527-528.

Boullu-Ciocca, S., Dutour, A., Guillaume, V., Achard, V., Oliver, C. and Grino, M. (2005). Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: Its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes*, 54(1), pp.197–203.

Bradbury M. W. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 290(2), G194–G198. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00413.2005>

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

Bruce, B.K., King, B.M., Phelps, G.R. and Veitia, M.C. (1982). Effects of adrenalectomy and corticosterone administration on hypothalamic obesity in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 243(2), pp.E152–E157.

Bujalska, I. J., Kumar, S., & Stewart, P. M. (1997). Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet (London, England)*, 349(9060), 1210–1213. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)11222-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)11222-8) Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011;332:1519–23.

Chadt, A.; Al-Hasani, H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease (2020). *Pflugers Arch.* v. 472, p. 1273-1298. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02417-x>.

Conceição, E. P., Trevenzoli, I. H., Oliveira, E., Franco, J. G., Carlos, A. S., Nascimento-Saba, C. C., Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2011). Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Hormone and metabolic research*, 43(7), 513–516. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1275702>

Conceição, E. P., Franco, J. G., Oliveira, E., Resende, A. C., Amaral, T. A., Peixoto-Silva, N., Passos, M. C., Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2013). Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.02.010>.

Csaki, L. S., & Reue, K. (2010). Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. *Annual review of nutrition*, 30, 257–272. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104729>

Cunha, A. C., Pereira, R. O., Pereira, M. J., Soares, V.deM., Martins, M. R., Teixeira, M. T., Souza, E. P., & Moura, A. S. (2009). Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2. *The Journal of nutritional biochemistry*, 20(6), 435–442. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.002>

Czech, M. P., & Corvera, S. (1999). Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *The Journal of biological chemistry*, 274(4), 1865–1868. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.1865>.

de Fatima Silva, F., Komino, A.C.M., Andreotti, S., Boltes Reis, G., Caminhotto, R.O., Landgraf, R.G., de Souza, G.O., Sertié, R.A.L., Collins, S., Donato Jr., J. and Bessa Lima,

F. (2022). Dexamethasone-Induced Adipose Tissue Redistribution and Metabolic Changes: Is Gene Expression the Main Factor? An Animal Model of Chronic Hypercortisolism. *Biomedicines*, 10(9), p.2328. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092328>.

de Souza, C. F., Stopa, L. R. S., Martins, A. B., Wunderlich, A. L. M., Lopes, G. M., Zaia, D. A. M., Zaia, C. T. B. V., de Andrade, F. G., Leite, C. M., & Uchoa, E. T. (2022). Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats. *Life sciences*, 304, 120721. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120721>

de Souza, C. F., Stopa, L. R. S., Santos, G. F., Takasumi, L. C. N., Martins, A. B., Garnica-Siqueira, M. C., Ferreira, R. N., de Andrade, F. G., Leite, C. M., Zaia, D. A. M., Zaia, C. T. B. V., & Uchoa, E. T. (2019). Estradiol protects against ovariectomy-induced susceptibility to the anabolic effects of glucocorticoids in rats. *Life sciences*, 218, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.037>

Devenport, L.D., Devenport, J.A. (1982). The effects of adrenal hormones on brain and body size. *Physiol Psychol*, 10, 399- 404.

Devenport, L.D., Torres, A., Murray, C.G. (1983). Effects of aldosterone and deoxycorticosterone on food intake and body weight. *Behav Neurosci*, 97, 667-669.

Devenport, L.D., Goodwin, K.G., Hopkins, P.M. (1985) Continuous infusion of aldosterone: correlates of body weight gain. *Pharmacol, Biochem Behav*, 22, 707-709.

Doerge, H., & Stahl, A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, 259–268. <https://doi.org/10.1152/physiol.00014.2006>

Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1343–1351. <https://doi.org/10.1172/JCI23621>

Drake, A. J., Livingstone, D. E., Andrew, R., Seckl, J. R., Morton, N. M., & Walker, B. R. (2005). Reduced adipose glucocorticoid reactivation and increased hepatic glucocorticoid clearance as an early adaptation to high-fat feeding in Wistar rats. *Endocrinology*, 146(2), 913–919. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1063>

Dubuc, P.U. and Wilden, N.J. (1986). Adrenalectomy reduces but does not reverse obesity in ob/ob mice. *International journal of obesity*, 10(2), pp.91–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3522453>.

Duff, D. A., & Snell, K. (1982). Effect of altered neonatal nutrition on the development of enzymes of lipid and carbohydrate metabolism in the rat. *The Journal of nutrition*, 112(6), 1057–1066. <https://doi.org/10.1093/jn/112.6.1057>

Eckstein, S. S., Weigert, C., & Lehmann, R. (2017). Divergent Roles of IRS (Insulin Receptor Substrate) 1 and 2 in Liver and Skeletal Muscle. *Current medicinal chemistry*, 24(17), 1827–1852. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170426142826>.

Ellsworth, L., Harman, E., Padmanabhan, V., & Gregg, B. (2018). Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. *Reproduction (Cambridge, England)*, *156*(2), R23–R42. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0780>

Enes-Marques, S., Rojas, V. C. T., Batista, T. H., Vitor-Vieira, F., Novais, C. O., Vilela, F. C., Rafacho, A., & Giusti-Paiva, A. (2020). Neonatal overnutrition programming impairs cholecystokinin effects in adult male rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, *86*, 108494. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108494>

Falholt, K., Lund, B., & Falholt, W. (1973). An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fatty acids in plasma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *46*(2), 105–111. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(73\)90016-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(73)90016-8)

Ferretti, S., Fornari, A., Pedrazzi, P., Pellegrini, M., & Zoli, M. (2011). Developmental overfeeding alters hypothalamic neuropeptide mRNA levels and response to a high-fat diet in adult mice. *Peptides*, *32*(7), 1371–1383. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.06.001>

Fiorotto, M.L., Burrin, D.G., Perez, M. and Reeds, P.J. (1991). Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *260*(6), pp.R1104–R1113.

Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, v.226, n.1, p. 497-509.

Freedman, M.R., Horwitz, B.A. and Stern, J.S. (1986). Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *250*(4), pp.R595–R607.

Guarino, M. P., Santos, A. I., Mota-Carmo, M., & Costa, P. F. (2013). Effects of anaesthesia on insulin sensitivity and metabolic parameters in Wistar rats. *In vivo (Athens, Greece)*, *27*(1), 127–132.

Guillemin, R., Clayton, G. W., Smith, J. D., & Lipscomb, H. S. (1958). Measurement of free corticosteroids in rat plasma: physiological validation of a method. *Endocrinology*, *63*(3), 349–358. <https://doi.org/10.1210/endo-63-3-349>

Hahn P. (1984). Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. *The Journal of nutrition*, *114*(7), 1231–1234. <https://doi.org/10.1093/jn/114.7.1231>

Heeren, J., & Scheja, L. (2021). Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Molecular metabolism*, *50*, 101238. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101238>

Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002;109:1125–31. Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of clinical*

*investigation*, 109(9), 1125–1131. <https://doi.org/10.1172/JCI15593>

Hou, M., Liu, Y., Zhu, L., Sun, B., Guo, M., Burén, J. and Li, X. (2011). Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *PLoS ONE*, 6(11), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025726>

Huang, F; Zhu, P.; Wang, J.; Chen, J.; Lin, W. Postnatal overfeeding induces hepatic microRNA-221 expression and impairs the PI3K/AKT pathway in adult male rats (2021). *Pediatr Res*. v.89, p 143-149. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0877-7>.

Jamieson, P. M., Chapman, K. E., Edwards, C. R., & Seckl, J. R. (1995). 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive 11 beta- reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology*, 136(11), 4754–4761. <https://doi.org/10.1210/endo.136.11.7588203>

Kawano, Y., & Cohen, D. E. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology*, 48(4), 434–441. <https://doi.org/10.1007/s00535-013-0758-5>

Kennedy G. C. (1957). The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. *The Journal of endocrinology*, 16(1), 9–17. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0160009>

Kibenge, M. T., & Chan, C. B. (2001). Interactions between effects of adrenalectomy and diet on insulin secretion in fa/fa Zucker rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 79(1), 1–7.

Klausner, H., & Heimberg, M. (1967). Effect of adrenalcortical hormones on release of triglycerides and glucose by liver. *The American journal of physiology*, 212(6), 1236–1246. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1967.212.6.1236>

Lee, M. J., Gong, D. W., Burkey, B. F., & Fried, S. K. (2011). Pathways regulated by glucocorticoids in omental and subcutaneous human adipose tissues: a microarray study. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 300(3), E571–E580. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00231.2010>

Lietzke, S. E., Bose, S., Cronin, T., Klarlund, J., Chawla, A., Czech, M. P., & Lambright, D. G. (2000). Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Molecular cell*, 6(2), 385–394. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00038-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00038-1)

Liu, H. W., Srinivasan, M., Mahmood, S., Smiraglia, D. J., & Patel, M. S. (2013). Adult-onset obesity induced by early life overnutrition could be reversed by moderate caloric restriction. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 305(7), E785–E794. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00280.2013>

Mantha, L., Palacios, E., & Deshaies, Y. (1999). Modulation of triglyceride metabolism by glucocorticoids in diet-induced obesity. *The American journal of physiology*, 277(2), R455–R464. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.2.R455>

Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., & Flier, J. S. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic

syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5549), 2166–2170. <https://doi.org/10.1126/science.1066285>

Moreira, A. S., Teixeira Teixeira, M., da Silveira Osso, F., Pereira, R. O., de Oliveira Silva-Junior, G., Garcia de Souza, E. P., Mandarim de Lacerda, C. A., & Moura, A. S. (2009). Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 19(11), 805–810. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.01.008>

Morton, N. M., Ramage, L., & Seckl, J. R. (2004). Down-regulation of adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by high-fat feeding in mice: a potential adaptive mechanism counteracting metabolic disease. *Endocrinology*, 145(6), 2707–2712. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1674>

Nestel, P. J., Havel, R. J., & Bezman, A. (1962). SITES OF INITIAL REMOVAL OF CHYLOMICRON TRIGLYCERIDE FATTY ACIDS FROM THE BLOOD. *The Journal of clinical investigation*, 41(10), 1915–1921. <https://doi.org/10.1172/JCI104648>

Oben, J. A., Mouralidarane, A., Samuelsson, A. M., Matthews, P. J., Morgan, M. L., McKee, C., Soeda, J., Fernandez-Twinn, D. S., Martin-Gronert, M. S., Ozanne, S. E., Sigala, B., Novelli, M., Poston, L., & Taylor, P. D. (2010). Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of hepatology*, 52(6), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.12.042>

Paterson, J. M., Morton, N. M., Fievet, C., Kenyon, C. J., Holmes, M. C., Staels, B., Seckl, J. R., & Mullins, J. J. (2004). Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(18), 7088–7093. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305524101>

Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rohde, W., & Dörner, G. (1999). Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Brain research*, 818(1), 160–163. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01264-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01264-5)

Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Voits, M., Fink, H., Rohde, W., & Dörner, G. (1999). Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain research*, 836(1-2), 146–155. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01662-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01662-5)

Plagemann, A., Heidrich, I., Götz, F., Rohde, W., & Dörner, G. (1992). Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Experimental and clinical endocrinology*, 99(3), 154–158. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211159>

Plagemann, A. (2006). Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Hormone Research*, 65(SUPPL. 3), pp.83–89.

Rebuffé-Scrive, M., Krotkiewski, M., Elfverson, J., & Björntorp, P. (1988). Muscle and

adipose tissue morphology and metabolism in Cushing's syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 67(6), 1122–1128. <https://doi.org/10.1210/jcem-67-6-1122>

Ribas-Aulinas, F., Parra-Vargas, M., Ramon-Krauel, M., Diaz, R., Lerin, C., Cambras, T., & Jimenez-Chillaron, J. C. (2021). Time-Restricted Feeding during Puberty Ameliorates Adiposity and Prevents Hepatic Steatosis in a Mouse Model of Childhood Obesity. *Nutrients*, 13(10), 3579. <https://doi.org/10.3390/nu13103579>

Rodrigues, A. L., de Moura, E. G., Passos, M. C., Dutra, S. C., & Lisboa, P. C. (2009). Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *The Journal of physiology*, 587(Pt 11), 2647–2661. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.169045>

Rodrigues, A. L., de Moura, E. G., Passos, M. C., Trevenzoli, I. H., da Conceição, E. P., Bonono, I. T., Neto, J. F., & Lisboa, P. C. (2011). Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(2), 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.11.013>

Rodrigues, A. L., De Souza, E. P., Da Silva, S. V., Rodrigues, D. S., Nascimento, A. B., Barja-Fidalgo, C., & De Freitas, M. S. (2007). Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *The Journal of endocrinology*, 195(3), 485–494. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0046>

Romsos D R. Energy balance: role of adrenal gland secretions. In: *Proceedings of the 14th International Congress of Nutrition*, edited by YoungKW, Cha LY, Yull LK, Soon JJ, and He KS. Seoul, South Korea: International Congress of Nutrition, 1991, p. 129–132.

Rutledge, A. C., Su, Q., & Adeli, K. (2010). Apolipoprotein B100 biogenesis: a complex array of intracellular mechanisms regulating folding, stability, and lipoprotein assembly. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 88(2), 251–267. <https://doi.org/10.1139/o09-168>

Šefčíková, Z., Bujňáková, D., Raček, L., Kmet, V., & Mozeš, Š. (2011). Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests. *Physiological research*, 60(2), 337–346. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931939>

Spencer, S. J., & Tilbrook, A. (2009). Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*, 34(8), 1133–1143. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.02.013>

Spencer S. J. (2013). Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. *Frontiers in neuroscience*, 7, 109. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00109>

Starley, B. Q., Calcagno, C. J., & Harrison, S. A. (2010). Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(5), 1820–1832. <https://doi.org/10.1002/hep.23594>

Stopa, L.R.S., de Souza, C.F., Martins, A.B., Lopes, G.M., Costa, N.O., Gerardin, D.C.C., de Carvalho, G.G., Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Uchoa, E.T. and Leite, C.M. (2021). Neonatal overfeeding reduces estradiol plasma levels and disrupts noradrenergic-kisspeptin-GnRH pathway and fertility in adult female rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 524(December 2020). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111147>

Stopa, L.R.S., de Souza, C.F., Santos, G.F., Martins, A.B., Ferreira, R.N., de Andrade, F.G., Leite, C.M., Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V. and Uchoa, E.T. (2019). Sex differences in glucocorticoids-induced anabolic effects in rats. *Physiology and Behavior*, 209(April), p.112587. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112587>

Suzuki, H., & Mizugashira, M. (1979). Effect of adrenalectomy on liver lipid content of fasted rats. *The Journal of nutrition*, 109(8), 1413–1418. <https://doi.org/10.1093/jn/109.8.1413>

Tataranni, P.A.; Larson, D.E.; Snitker, S.; Young, J.B.; Flatt, J.P.; Ravussin, E. Effects of glucocorticoids on energy metabolism and food intake in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 271, p. E317-E325, 1996.

Tempel, D.L., Leibowitz, S.F. (1989). PVN steroid implants: effect on feeding patterns and macronutrient selection. *Brain Res Bull*, 23, 553-560. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(89\)90200-1](https://doi.org/10.1016/0361-9230(89)90200-1)

Titchenell, P. M., Lazar, M. A., & Birnbaum, M. J. (2017). Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(7), 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>

Uchoa, E.T., Sabino, H.A., Ruginsk, S.G., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L. (2009a). Hypophagia induced by glucocorticoid deficiency is associated with an increased activation of satiety-related responses. *J. Appl. Physiol*, 106, 596-604. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.90865.2008>

Uchoa, E.T., Silva, L.E.C.M., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L.K. (2009b). Hypothalamic oxytocin neurons modulate hypophagic effect induced by adrenalectomy. *Horm. Behav.*, 56, 532–538. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.09.007>

Uchoa, E.T., Silva, L.E.C.M., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L.K. (2010). Corticotrophin-releasing factor mediates hypophagia after adrenalectomy, increasing meal-related satiety responses. *Horm. Behav*, 58, 714-719. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.07.003>

Uchoa, E.T., Silva, L.E.C.M., de Castro, M., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L.K. (2012). Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. *Neuropeptides*, 46, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.02.002>

Wang, Y., Jones Voy, B., Urs, S., Kim, S., Soltani-Bejnood, M., Quigley, N., Heo, Y. R., Standridge, M., Andersen, B., Dhar, M., Joshi, R., Wortman, P., Taylor, J. W., Chun, J., Leuze, M., Claycombe, K., Saxton, A. M., & Moustaid-Moussa, N. (2004). The human fatty acid synthase gene and de novo lipogenesis are coordinately regulated in human adipose tissue. *The Journal of Nutrition*, 134(5), 1032–1038. <https://doi.org/10.1093/jn/134.5.1032>

Windeløv, J.A., Pedersen, J. and Holst, J.J. (2016). Use of anesthesia dramatically alters the oral glucose tolerance and insulin secretion in C57Bl/6 mice. *Physiological Reports*, 4(11), p.e12824.

Wurie, H. R., Buckett, L., & Zammit, V. A. (2012). Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells. *The FEBS journal*, 279(17), 3033–3047. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08684.x>

Yang, F., Dai, Y., Min, C., & Li, X. (2018). Neonatal overfeeding induced glucocorticoid overexposure accelerates hepatic lipogenesis in male rats. *Nutrition & Metabolism*, 15, 30. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0272-0>

Yilmaz, A., Suleyman, H., Umudum, Z., & Sahin, Y. N. (2002). The effect of adrenalectomy on leptin levels and some metabolic parameters in rats with diet-induced obesity. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 25(5), 580–583. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.580>

Yukimura, Y., & Bray, G. A. (1978). Effects of adrenalectomy on body weight and the size and number of fat cells in the Zucker (fatty) rat. *Endocrine research communications*, 5(3), 189–198. <https://doi.org/10.1080/07435807809083752>

Yukimura, Y., Bray, G., and Wolfse, A.. (1978). Some Effects of Adrenalectomy in the Fatty Rat\*. *Endocrinology*, 103(5), pp.1924–1928.

Zakrzewska, K.E.; Cusin, I.; Stricker-Krongrad, A.; Boss, D.; Ricquer, D.; Jeanrenaud, B.; Rohner-Jeanrenaud, F (1999). Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes*, v. 48, p. 365-375.

## Figure Legends

**Fig. 1.** Experimental design of protocol. ADX: adrenalectomy; NL: normal litter; SL: small litter; PND: postnatal day.

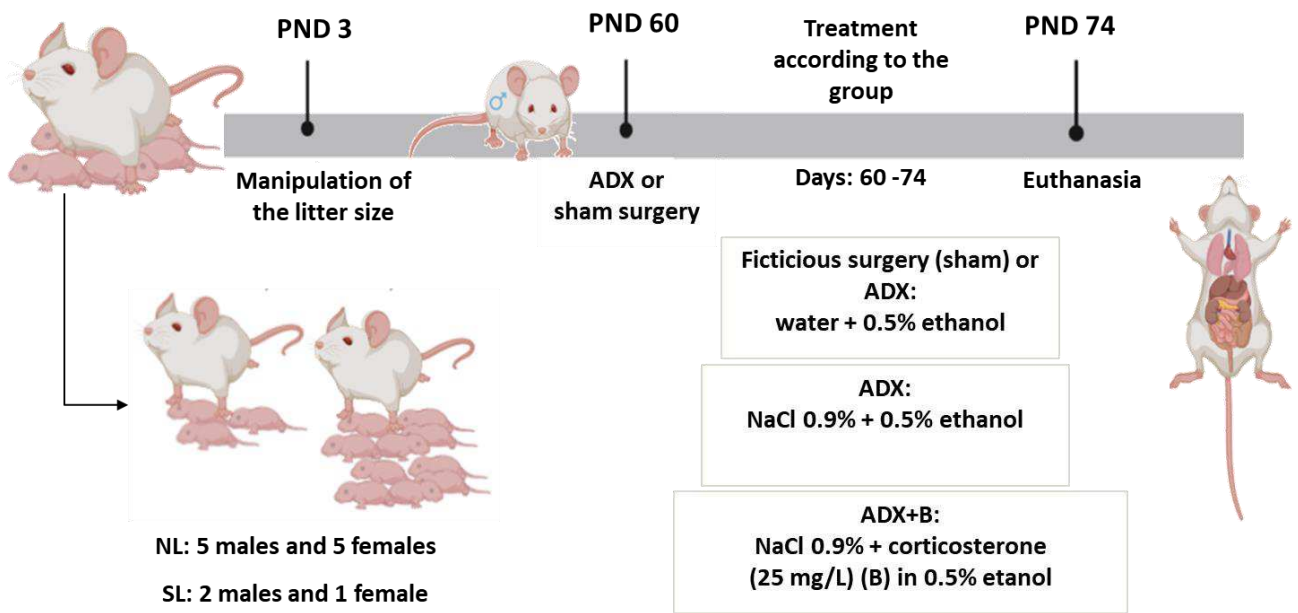
**Fig. 2.** Body weight from PND 60 to 74 (A), AUC of body weight from PND 60 to 74 (B), mean daily food intake (C) and mean daily fluid intake (mL/100g) from PND 60 to 74 (D), weights of epididymal (E) and retroperitoneal (F) adipose tissues on PND 74, and Lee Index ( $g^{1/3}/cm$ ) on PND 74 (G) of male rats from normal (NL) and small (SL) litters: sham; ADX; ADX+B. Data were analyzed by two-way Anova, followed by the Tukey post hoc test and expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; # $p < 0.05$  SL versus NL; B= corticosterone (n = 13).

**Fig. 3.** Plasma concentrations of free fatty acids (a), triglycerides (B), total cholesterol (C), HDL cholesterol (D), LDL cholesterol (E) and corticosterone (F) of male rats from normal (NL) and small (SL) litters on PND 74: sham; ADX; ADX+B, from PND 60 to 74. Data were analyzed by two-way Anova, followed by the Tukey post hoc test and expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; # $p < 0.05$  SL versus NL; B= corticosterone (n = 13).

**Fig. 4.** Liver expression of insulin receptor (IR) (A), insulin receptor substrate (IRS) 1(B), insulin receptor substrate (IRS) 2 (C), PI3Kp110 (D), Ser473pAKT/AKT (E) and GLUT2 (F) of male rats from normal (NL) and small (SL) litters on PND 74: sham; ADX; ADX+B. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; # $p < 0.05$  SL versus NL; B= corticosterone (n = 13).

**Fig. 5.** Liver triglycerides (mg/100 mg of liver) (A), liver expression of fatty acid synthase (FASN) (B), acetyl-CoA carboxylase (p-ACC/ACC) (C), diacylglycerol acyltransferase (DGAT) 2 (D), Apo B100 (E) and 11  $\beta$ - Hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11  $\beta$ HSD1) (F) of male rats from normal (NL) and small (SL) litters on PND 74: sham; ADX; ADX+B. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ ; # $p < 0.05$  SL versus NL; B= corticosterone (n = 13).

**Fig. 1**



**Fig. 2**

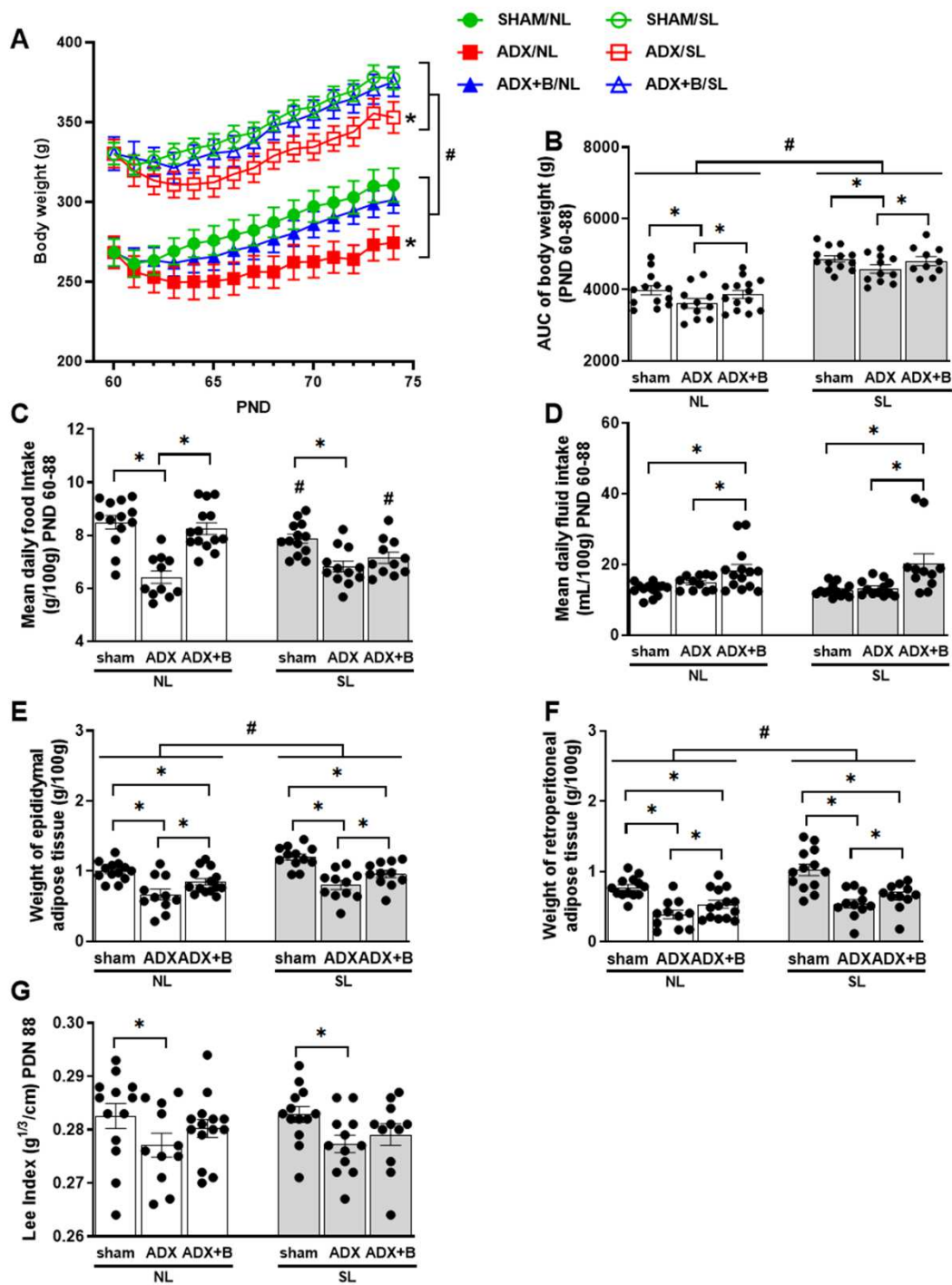


Fig. 3

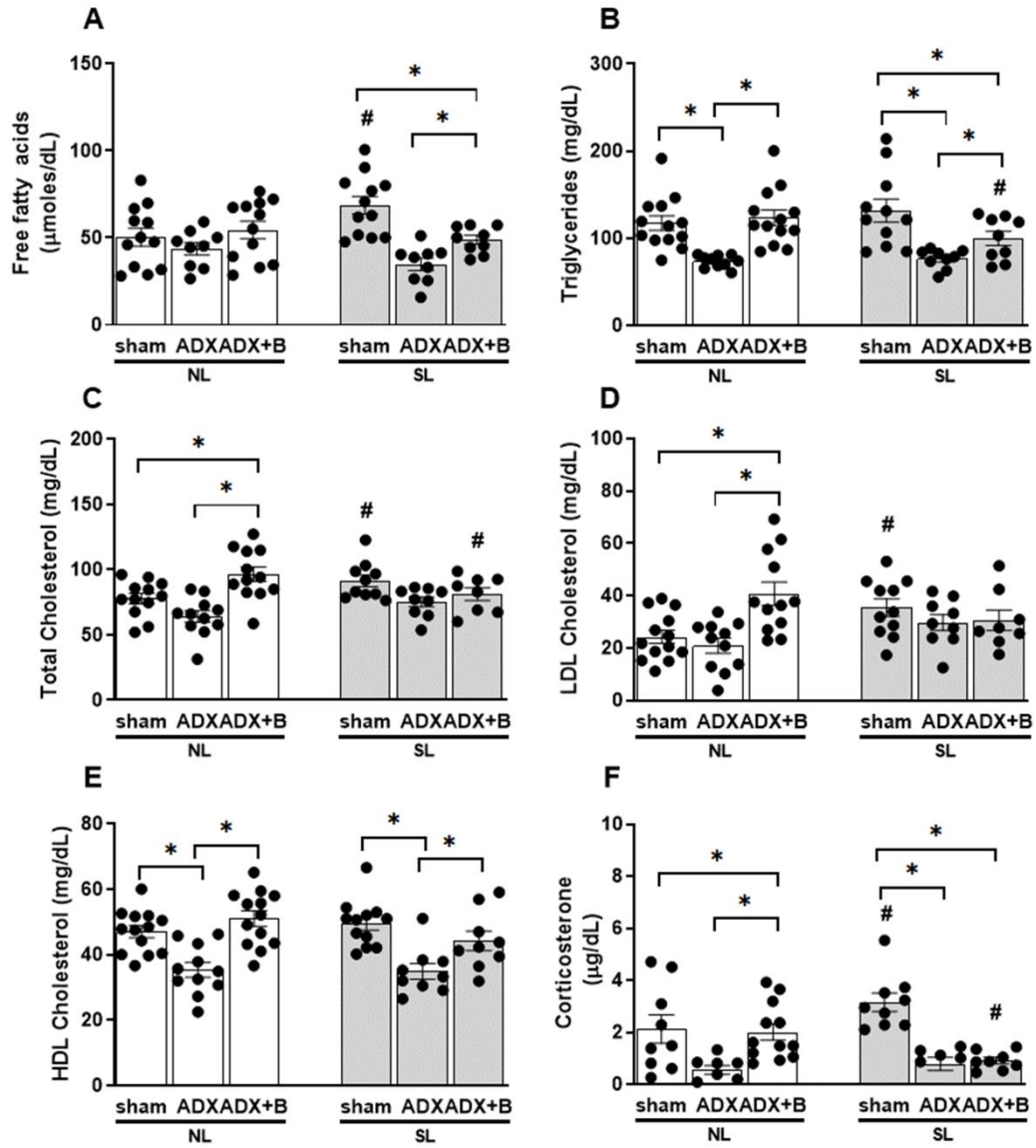
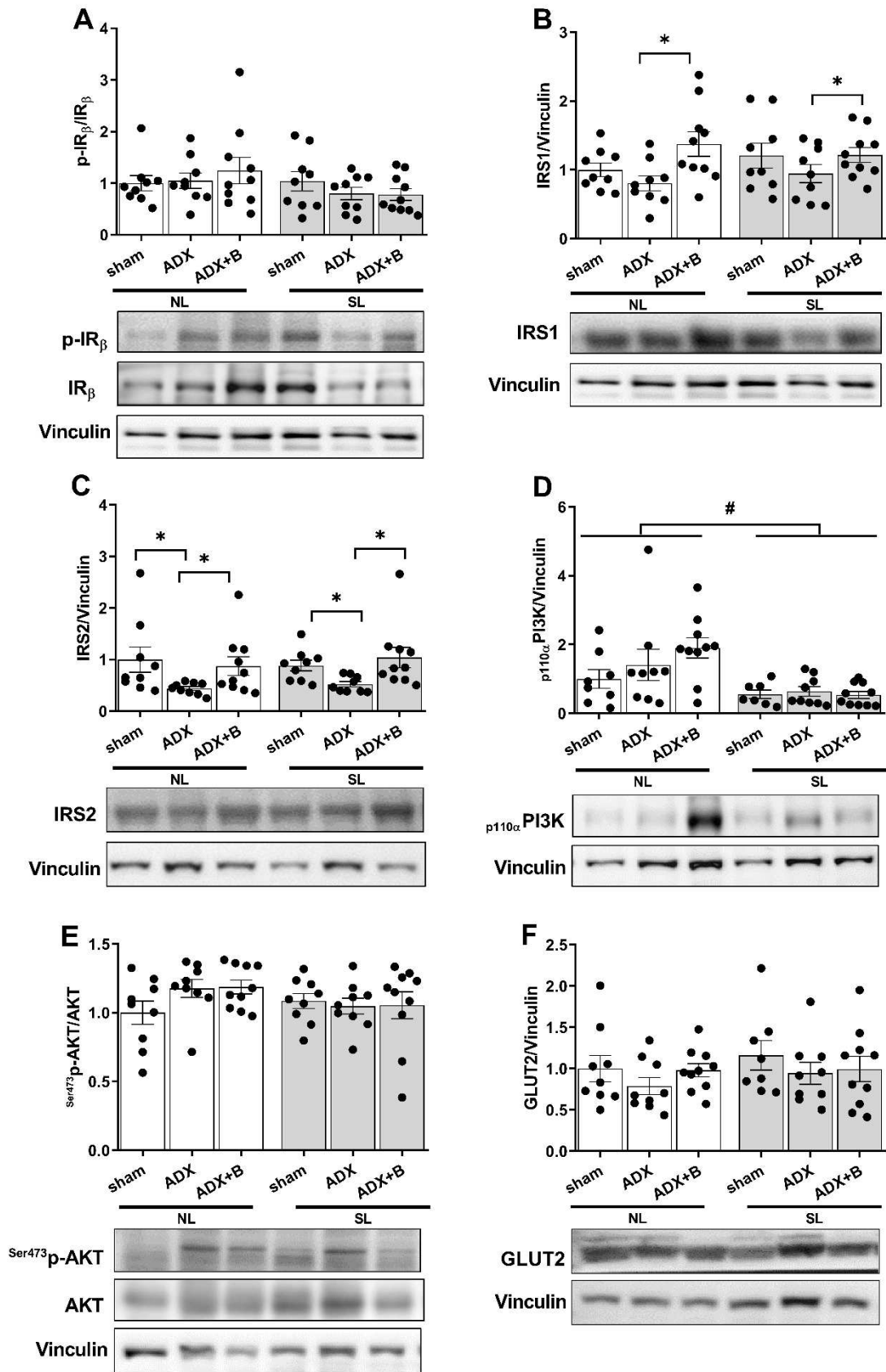


Fig. 4



**Fig. 5**

