



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ellen Paula Santos da Conceição

Efeito da superalimentação neonatal sobre a função adrenal e o desenvolvimento da microesteatose hepática em ratos adultos

Rio de Janeiro

2012

Ellen Paula Santos da Conceição

**Efeito da superalimentação neonatal sobre a função adrenal e o desenvolvimento da
microesteatose hepática em ratos adultos.**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências,
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Patricia Cristina Lisbôa da Silva

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Elaine de Oliveira

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C744 Conceição, Ellen Paula Santos da.
Efeito da superalimentação neonatal sobre a função adrenal e o desenvolvimento da microesteatose hepática em ratos adultos / Ellen Paula Santos da Conceição. – 2012.
109 f. : il.

Orientadora: Patrícia Cristina Lisbôa da Silva.
Coorientadora: Elaine de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-graduação em Biociências.

1. Hiperfagia – Teses. 2. Fígado gorduroso. 3. Catecolaminas – Teses.
4. Corticosterona. I. Silva, Patrícia Cristina Lisbôa da. II. Oliveira, Elaine de.
III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 591.5

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação.

Assinatura

Data

Ellen Paula Santos da Conceição

**Efeito da superalimentação neonatal sobre a função adrenal e o desenvolvimento da
microesteatose hepática em ratos adultos**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre, ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2012.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a Patricia Cristina Lisbôa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora:

Prof^a Dr^a Elaine de Oliveira
Instituto de Nutrição – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr^a. Erica Patricia Garcia de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro
2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus familiares, amigos e companheiros de bancada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Patricia Cristina Lisboa por permitir que eu desenvolvesse minha tese no LFE e por toda paciência e atenção.

À minha co-orientadora Elaine de Oliveira pela paciência, compreensão e dedicação em me ajudar no desenvolvimento dessa tese e nos trabalhos de bancada. Ao professor Egberto Gaspar de Moura por terem me orientado em grande parte de minha iniciação no laboratório.

Aos ICs e também aos pós-graduandos Nayara Peixoto Silva, Cintia Pinheiro e Viviane Younes-Rapozo.

Aos meus PAIS, Suzanete e Francisco, e aos meus queridos IRMÃOS, Isa, Ana e Gilson, pela paciência em tolerar a minha ausência, pelo incentivo e pelo amor que nunca me foi negado.

E por fim, a DEUS pela oportunidade e pelo privilégio em compartilhar tamanha experiência.

RESUMO

CONCEIÇÃO, Ellen Paula Santos da. *Efeito da superalimentação neonatal sobre a função adrenal e o desenvolvimento da microesteatose hepática em ratos adultos*. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O estado nutricional e hormonal em fases iniciais de desenvolvimento (gestação e lactação) está relacionado a alterações epigenéticas, que podem levar ao desenvolvimento de doenças. A obesidade infantil está relacionada com a ocorrência da obesidade na idade adulta, resistência à insulina e maior risco cardiometabólico. Em estudos experimentais, a superalimentação neonatal causa obesidade e aumenta o risco de doenças cardiovasculares. Estes animais apresentam obesidade visceral, hiperfagia, hiperleptinemia e hipertensão na idade adulta. Previamente, demonstramos que a hiperleptinemia neonatal causa hiperfunção da medula adrenal e microesteatose na idade adulta. No presente estudo avaliamos a função adrenal de ratos adultos obesos no modelo de superalimentação neonatal por redução do tamanho da ninhada e a sensibilidade as catecolaminas no tecido adiposo visceral (TAV) e no fígado. Ao nascimento todas as ninhadas tiveram seu número de filhotes ajustados para 10. Para induzir a superalimentação neonatal, o tamanho da ninhada foi reduzido de dez para três filhotes machos no terceiro dia de lactação até o desmame (SA), enquanto que o grupo controle permaneceu com 10 filhotes durante toda a lactação. Após o desmame, os ratos tiveram livre acesso à dieta padrão e água até 180 dias (1 animal de cada ninhada, $n = 7$). O TAV e as glândulas adrenais foram pesadas. As contrações hormonais séricas, o conteúdo hepático de glicogênio e triglicerídeos foram avaliados por kits comerciais. O conteúdo e a secreção de catecolaminas adrenais foram avaliados utilizando o método do trihidroxindol. O conteúdo dos hormônios eixo hipotálamo-hipófise-córtex adrenal, das enzimas da via de síntese das catecolaminas na glândula adrenal, ADRB2 no fígado e ADRB3 no TAV foram determinados por Western blotting ou imunohistoquímica. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Aos 180 dias de vida, o grupo SA apresentou maior massa corporal (+15%), maior consumo alimentar (+15%) e maior adiposidade visceral (+79%). Os hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-córtex-adrenal não foram alterados. O grupo SA apresentou maior expressão de tirosina hidroxilase e de DOPA descarboxilase (+31% e 90%, respectivamente); conteúdo de catecolaminas adrenais (absoluta: 35% e relativa: 40%), e secreção de catecolaminas, tanto basal quanto estimulada por cafeína (+35% e 43%, respectivamente). O conteúdo ADRB3 no TAV não foi alterado nos grupo SA, entretanto o ADRB2 no fígado apresentou-se menor (-45%). O grupo SA apresentou maior conteúdo de glicogênio e triglicerídeos no fígado (+79% e +49%, respectivamente), além de microesteatose. A superalimentação neonatal resulta em hiperativação adrenomedular e aparentemente está associada a preservação da sensibilidade às catecolaminas no VAT. Adicionalmente sugerimos que o maior conteúdo de glicogênio e triglicerídeos hepático seja devido a menor sensibilidade as catecolaminas. Tal perfil pode contribuir para a disfunção metabólica hepática e hipertensão arterial que são características deste modelo de obesidade programada.

Palavras-chave: Catecolaminas. Corticosterona. Receptor β -adrenérgico. Glicogênio. Rato.

ABSTRACT

Nutritional and hormonal status at early phases of development are related to epigenetic changes, promoting disease development. Childhood overweight is related with late obesity, insulin resistance and higher cardiometabolic risk. Rats overfed during lactation show higher visceral adiposity, hyperphagia, leptin resistance and hypertension in adulthood. Previously, we demonstrated that neonatal hyperleptinemia is associated with adrenal medullary hyperfunction and liver steatosis at adulthood. Here, we evaluated the adrenal function and liver tissue of adult obese rats that were overfed during lactation. To induce early overfeeding, the litter size was reduced from ten to three male pups at the third day of lactation until weaning (SL). Control group had ten rats per litter (NL). After weaning, rats had free access to standard diet and water until 180 days old (1 animal from each litter, n=7). Significant differences had $p < 0.05$. The SL group presented higher adrenal catecholamine content (absolute: +35% and relative: +40%), tyrosine hydroxylase (+31%), DOPA decarboxylase (+90%) protein contents, basal and caffeine-induced catecholamine *in vitro* secretion (+35% and +43%, respectively). However, hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal cortex axis were unchanged. The β_3 -adrenergic receptor content in visceral adipose tissue was unchanged in SL rats, but the β_2 -adrenergic receptor in the liver was lower (-45%). SL group showed higher glycogen and triglycerides contents in liver (+79% and +49%, respectively), which showed microsteatosis. Although the neonatal overfeeding leads to higher adrenomedullary function, adult obese SL rats have a dysfunction in hepatic β_2 -adrenergic receptor, which can contribute for the hepatic dysfunction characteristic of liver obesity complications.

Key words: Catecholamine. Corticosterone. Adrenergic receptor. Glycogen. Rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Biossíntese de catecolaminas em células cromafins da adrenal	21
Figura 2 –	Esquema do modelo experimental de redução da ninhada.....	31
Figura 3 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre a massa corporal e consumo alimentar	38
Figura 4 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre massa de gordura visceral .	39
Figura 5 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre o conteúdo hipotalâmico de CRH e hipofisário de ACTH	40
Figura 6 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre a concentração sérica de ACTH e corticosterona nos	41
Figura 7 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre o peso da glândula adrenal, conteúdo absoluto e relativo de catecolaminas adrenais.....	42
Figura 8 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre a secreção <i>in vitro</i> basal e estimulada por cafeína de catecolaminas pela medula adrenal	43
Figura 9 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre o conteúdo de TH, de DOPA-d, dopamina β -hidroxilase e feniletanolamina N metiltransferase em homogenatos de medulas adrenais	44
Figura 10 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre o conteúdo do receptor β 3-adrenérgicos no tecido adiposo retroperitoneal e do receptor β 2-adrenérgicos no fígado	45
Figura 11 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre a razão peso do fígado pelo comprimento da tibia, conteúdo de glicogênio e triglicérides no fígado	46
Figura 12 –	Efeito da superalimentação pós-natal sobre características morfométricas hepáticas	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CART -	cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide
AgRP -	agouti-related protein
α -MSH -	α -melanocyte-stimulating hormone
NPY -	neuropeptídeo Y
CRH -	corticotropin-releasing hormone
HHA -	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
TRH -	thyrotropin-releasing hormone
ACTH -	adrenocorticotrofina
11 β HSD1 -	11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1
NAD -	nicotinamide adenine dinucleotide
NADP -	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
SNA -	sistema nervoso autônomo
SNP -	sistema nervoso parassimpático
SNS -	sistema nervoso simpático
TH -	tirosina hidroxilase
L-DOPA -	3,4-dihidroxi-L-fenilalanina
DBH -	dopamina β -hidroxilase
FNMT -	feniletanolamina N-metiltransferase
IASO/IOTF -	International Association for the Study of Obesity & International Obesity TaskForce
POMC -	Pro-opiomelanocortin
MC4R -	melanocortin 4 receptor
STAT3 -	signal transducer and activator of transcription 3
JAK2 -	janus kinase 2
SOCS3 -	suppressor of cytokine signaling 3
PKC -	protein kinase C
JNK -	c-Jun N-terminal kinases
IKK2 -	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IRS1 -	insulin receptor substrate 1
PI3K -	phosphoinositide 3-kinase

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	PROGRAMAÇÃO METABÓLICA OU PLASTICIDADE ONTOGENÉTICA	11
1.1	Obesidade e programação por superalimentação neonatal	12
2	EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL (HHA)	15
2.1	Obesidade & eixo HHA	16
2.2	Eixo HHA & superalimentação neonatal	18
3	SISTEMA NERVOSO SIMPATOADRENAL	20
3.1	Sistema simpatoadrenal & distúrbios cardiometabólicos	24
3.2	Sistema simpatoadrenal & superalimentação neonatal	26
4	JUSTIFICATIVA DO PRESENTE ESTUDO	28
5	OBJETIVOS	29
6	MATERIAIS E MÉTODOS	30
7	RESULTADOS	38
8	DISCUSSÃO	49
9	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE - Developmental plasticity in adrenal function and liver tissue primed by neonatal overfeeding in rats	75
	ANEXO – Carta de submissão	109

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada uma pandemia, independente do nível de desenvolvimento do país (WHO, 2007; Choudhury & Friedman, 2011), assumindo grande importância por estar relacionada ao desenvolvimento de doenças altamente debilitantes, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de cânceres. Segundo estimativa da International Association for the Study of Obesity & International Obesity TaskForce (2010) (IASO/IOTF), um bilhão de adultos apresentam sobrepeso e pelo menos 475 milhões são obesos. Igualmente preocupante é o elevado número de crianças em idade pré-escolar e adolescentes acima do peso, pois se sabe que crianças obesas tendem a se tornarem adultos obesos e manifestar precocemente as doenças relacionadas à obesidade (Beilin & Huang, 2008; Reilly & Kelly, 2011). Estima-se que mais de 200 milhões de crianças apresentam sobrepeso e mais de 40 milhões sejam obesas, dessas 43 milhões possuem menos de cinco anos de idade (Slyper, 2004; de Assis, 2005; WHO, 2008a), demonstrando que a obesidade tende a ocorrer em idades cada vez mais precoces.

Estudos clínicos e experimentais descrevem a obesidade como produto de um desequilíbrio energético caracterizado pelo elevado consumo de alimentos de alta densidade calórica, somado a inatividade física (Beilin & Huang, 2008). Em seres humanos, a obesidade pode ser diagnosticada através da medida da circunferência abdominal, que é um importante indicador de obesidade visceral, onde circunferência abdominal superior a 94-90 cm em homens e 80 cm em mulheres, de acordo com a etnia, representa um elevado risco cardiovascular (WHO, 2008b).

A obesidade tem origem multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais, sócio-culturais e econômicas (Monteiro *et al.*, 2000; Levy-Costa *et al.*, 2005). Atualmente a maior parte dos estudos voltados para a compreensão do desenvolvimento da obesidade está centrada em desvendar como influências ambientais e comportamentais interagem com fatores genéticos para o desenvolvimento da obesidade e dos distúrbios relacionados (Velloso, 2006; de Moura *et al.*, 2008).

1 PROGRAMAÇÃO METABÓLICA OU PLASTICIDADE ONTOGENÉTICA

Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais apontam a relação entre a influência de fatores nutricionais (Ravelli, 1976; Stanner, 1997; Rodrigues *et al.*, 2011; Troina *et al.*, 2010; Figueiredo *et al.*, 2009; Passos *et al.*, 2002; Symonds *et al.*, 2009), hormonais (de Oliveira Cravo *et al.*, 2002; Yura *et al.*, 2005; Vickers *et al.*, 2008; Trevenzoli *et al.*, 2010a, 2010b; Bonomo *et al.*, 2005; Toste *et al.*, 2007) e ambientais (Young, 2000; Dutra *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010; Santos-Silva *et al.*, 2010) na gestação e/ou lactação e a suscetibilidade ao desenvolvimento da obesidade na puberdade e idade adulta. A fase do desenvolvimento em que tais influências ocorrem é de extrema importância, pois são em janelas específicas que são definidos padrões epigenéticos de expressão gênica, que em sua maioria poderão permanecer por toda vida (Dietz, 1994; Gluckman & Hanson, 2004; Thompson, 2007; de Moura *et al.*, 2008; Straussman *et al.*, 2009; Plagemann *et al.*, 2010). A princípio, isto tornaria o indivíduo melhor adaptado a determinada condição desfavorável a que foi exposto no início da vida. No entanto, caso o indivíduo seja exposto a um ambiente com melhores condições, ele estará mais suscetível ao desenvolvimento de doenças (Barker, 2004; de Moura *et al.*, 2008). A este fenômeno foi atribuído o nome de *programação metabólica* (Lucas, 1991; Barker, 2005) ou mais recentemente *plasticidade ontogenética* (Gluckman & Hanson, 2007), por sua característica mais probabilística do que determinística.

Nosso grupo tem se dedicado a investigar os desdobramentos de diferentes eventos adversos ocorridos na lactação e suas repercussões na idade adulta. Com relação a influência do estado nutricional materno, já identificamos que o modelo experimental de restrição protéica durante a lactação (dieta com 8% de proteína) resulta em menor peso e adiposidade corporal, hipoinsulinemia, hiperfunção tireoidiana e maiores concentrações séricas de corticosterona e de catecolaminas adrenais na prole na idade adulta (Fagundes *et al.*, 2007; Lisboa *et al.*, 2008), bem como resistência central ao efeito anorexigênico da leptina (Passos *et al.*, 2004). Identificamos também que a restrição calórica materna (dieta com 60% do consumo dos animais controles) durante a lactação promove, apesar de menor volume de leite, uma maior concentração de lipídios e proteínas na segunda metade do período de lactação (Passos *et al.*, 2000) bem como maior concentração de triiodotironina (T3) no leite ao final da lactação (Passos *et al.*, 2001). A prole lactente apresenta hiperleptinemia, que somada à maior transferência de T3 pelo leite pode justificar a programação para o hipertireoidismo, uma vez que a hiperleptinemia é um potente estimulador da função

tireoidiana (Lisboa *et al.*, 2003). Na idade adulta (180 dias), esta prole apresenta maior peso corporal, possivelmente devido às alterações nutricionais e hormonais do leite materno (Passos *et al.*, 2000). O modelo de desmame precoce em ratos Wistar, pode ser obtido farmacologicamente, bloqueando-se a prolactina (Bonomo *et al.*, 2005) ou pelo impedimento físico do acesso da prole ao leite materno nos três últimos dias da lactação está associado a uma significativa perda de peso, sendo também considerado um modelo de desnutrição neonatal leve (Lima *et al.*, 2011). Na idade adulta esta prole desenvolve obesidade central, dislipidemia, resistência periférica à insulina, hiperleptinemia e resistência hipotalâmica a leptina, justificando sua hiperfagia (Bonomo *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011). Assim, em diferentes modelos de programação metabólica, demonstrou-se que fatores como a hiperleptinemia, o aumento de hormônios tireoideanos e a escassez de nutrientes podem atuar como fatores determinantes para alterações funcionais futuras, que devem envolver modificações no padrão de expressão gênica de fatores reguladores do metabolismo energético.

1.1 Obesidade e programação por superalimentação neonatal

Não só a desnutrição neonatal, mas também a superalimentação é capaz de desencadear modificações fisiológicas que serão prejudiciais ao indivíduo em longo prazo. Diversos estudos experimentais utilizam a superalimentação neonatal como modelo experimental de obesidade (Plagemann *et al.*, 1999a; Boullu-ciocca *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2011; Plagemann *et al.*, 2011; Conceição *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012). A superalimentação neonatal induzida pela redução do tamanho da ninhada no terceiro dia da lactação (grupo superalimentado, SA) resulta em obesidade da prole lactente devido à menor concorrência entre os filhotes pelo leite materno e elevação do conteúdo de triglicérido no leite (Velkoska *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2009).

A obesidade neonatal causada pela SA resulta em hiperfagia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, resistência hipotalâmica a insulina e a leptina, e maior adiposidade visceral já ao desmame (Plagemann *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2011; Conceição *et al.*, 2011). Durante a lactação, estruturas hipotalâmicas que possuem importantes funções na modulação do consumo alimentar e gasto energético encontram-se em formação e são altamente vulneráveis à ação de hormônios neurotróficos, que podem conduzir

a persistente desorganização estrutural e consequente disfunção (Plagemann *et al.*, 1999a e 1999b; Bouret & Draper, 2004; Pinto *et al.*, 2004; Bouret & Simerly, 2007; Bouret *et al.*, 2010).

O modelo de obesidade por redução do tamanho da ninhada em ratos resulta em persistente malformação e disfunção dos núcleos hipotalâmicos que regulam peso corporal e consumo alimentar, caracterizada pela redução do efeito inibitório da leptina sobre neurônios relacionados à regulação do apetite no núcleo hipotalâmico arqueado dos ratos adultos jovens (aos 50 dias) (Davidowa & Plagemann, 2000 e 2001). Adicionalmente os neurônios do núcleo ventromedial apresentam resposta alterada aos peptídeos orexígenos NPY (*neuropeptide Y*) e AgRP (*agouti-related protein*) e aos anorexígenos α -MSH (*α -melanocyte-stimulating hormone*) e o CART (*cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide*) (Heidel *et al.*, 1999; Davidowa *et al.*, 2002, 2003; Li *et al.*, 2002), além de uma inesperada redução do conteúdo hipotalâmico de RNAm de NPY aos 133 dias (Ferretti *et al.*, 2011) e no conteúdo de proteína aos 180 dias (Rodrigues *et al.*, 2011).

Além da resistência hipotalâmica a insulina, os animais submetidos à SA neonatal apresentam menor sensibilidade a insulina no tecido adiposo epididimal aos 90 dias (Rodrigues *et al.*, 2007) e no coração aos 140 dias (Martins *et al.*, 2008). Adicionalmente, apresentam hipermetilação da região promotora do gene do receptor de insulina no hipotálamo, refletindo em menor expressão e consequente resistência insulínica aos 21 dias (Plagemann *et al.*, 2010). Apesar da menor sensibilidade em alguns tecidos, a SA neonatal resulta em hiperinsulinemia e aumento da sensibilidade a insulina no coração ao desmame (Pereira *et al.*, 2006) e nas células- β pancreáticas aos 360 dias (Cunha *et al.*, 2009), ajudando a explicar a própria hiperinsulinemia.

No modelo SA também é descrita a menor sensibilidade central a leptina, aos 180 dias, caracterizado pela redução do conteúdo hipotalâmico de JAK2 (*janus kinase 2*) e STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) fosforilada, que são proteínas da via principal de sinalização da leptina e aumento do conteúdo de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), que é uma proteína estimulada pela leptina, mas que inibe a sinalização deste hormônio, através da desfosforilação do ObR (receptor de leptina) e da JAK2 (Rodrigues *et al.*, 2011). Este hormônio tem como principais funções inibir a ingestão alimentar (Cummings, 2004) e aumentar o gasto energético (Villanueva, 2008). A leptina é uma adipocina que promove inibição dos neurônios orexígenos produtores de NPY/AgRP e ativação dos neurônios anorexígenos produtores de α -MSH/CART do núcleo hipotalâmico

arqueado, consequentemente causando a ativação dos neurônios do núcleo paraventricular produtores de CRH (*corticotropin-releasing hormone*) e TRH (*thyrotropin-releasing hormone*) (Pekary, 2010).

Roedores submetidos ao modelo SA apresentam obesidade associada a hipertensão arterial aos 112 dias (Morris *et al.*, 2005). Este grupo atribui a causa da hipertensão arterial ao aumento da leptinemia, uma vez que é descrito que somente a administração intracerebroventricular de leptina é capaz de elevar tanto a liberação de catecolaminas adrenais quanto o tônus vasomotor (Marsh *et al.*, 2003). A própria redução de NPY apresentada por animais SA aos 180 dias (Rodrigues *et al.*, 2011) também está associada ao aumento da atividade simpática (Egawa *et al.*, 1991). Entretanto, foi demonstrada por Young (2002) em roedores SA aos 65 dias de vida, a menor geração de noradrenalina estimulada por sacarose no tecido adiposo marrom, coração e rins, refletindo menor atividade simpática periférica, sugerindo uma dissociação na atividade do sistema nervoso autônomo.

2 EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-CÓRTEX ADRENAL (HHA)

O eixo HHA exerce importantes funções na regulação da resposta a situações adversas, modulando o metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios, promovendo a excitabilidade do córtex cerebral, perda de potássio e consequente retenção de sódio e água, além de atuar como antiinflamatório e antialérgico (Oakley & Cidlowski, 2011).

As diferentes ações mediadas pelo eixo HHA ocorrem em resposta aos hormônios esteróides secretados pelo córtex da glândula adrenal. A secreção destes hormônios obedece ao ritmo circadiano, com pico matutino associado ao início das atividades em mamíferos diurnos (Son *et al.*, 2011). Estímulos estressantes, como o jejum, exercem influência positiva sobre a ativação do eixo HHA, causando liberação de CRH pelo hipotálamo, este, por sua vez, estimula a síntese e secreção de adrenocorticotrofina (ACTH) pela adeno-hipófise. Uma vez na corrente sanguínea, o ACTH atua no córtex adrenal promovendo a síntese e liberação de hormônios esteróides, como por exemplo, os glicocorticóides (GC) pela zona fasciculata (Charmandari, 2005; Plotsky, 1989). O hipotálamo e a hipófise possuem receptores para GC, que ao serem ativados, inibem a síntese e secreção de CRH e ACTH, caracterizando uma retroalimentação negativa sobre o eixo (Charmandari, 2005).

Além da ligação ao seu receptor, a ação dos glicocorticóides também depende da atividade de enzimas presentes em seus tecidos alvos (Boullu-ciocca *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2011; Jessop *et al.*, 2001). A enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (11 β HSD1) catalisa a conversão de cortisol em seu metabólito inativo cortisona utilizando NAD (*nicotinamide adenine dinucleotide*) como cofator. A 11 β HSD1, também atua como uma redutase, ativando a cortisona a cortisol em humanos e a 11 desidrocorticosterona a corticosterona em roedores, utilizando desta vez NADP (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) como cofator, contribuindo assim para o aumento da disponibilidade tecidual de GC (Oakley & Cidlowski, 2011). Esta enzima é encontrada no sistema nervoso central (SNC), fígado, tecido adiposo, pulmões, tecido muscular, células β pancreáticas e tecido vascular (Monder & White, 1993; Stewart & Krozowski, 1999). Sua maior expressão e/ou atividade está associada à obesidade tanto em seres humanos (Westerbacka *et al.*, 2003) quanto modelos transgênicos em roedores (Masuzaki *et al.*, 2003). Adiante neste trabalho, abordaremos maiores detalhes sobre esta enzima. Já o catabolismo dos GC é realizado pelas enzimas 5 α redutase tipo 1 e 5 β redutase. Sabe-se que a hiper-expressão e/ou hiperatividade hepática da enzima 5 α redutase tipo 1 é observada em mulheres obesas com resistência

hepática a insulina, provavelmente como um mecanismo compensatório para redução da biodisponibilidade de GC (Tomlinson *et al.*, 2008). Livingstone e colaboradores (2000) identificaram o aumento da atividade 5 α redutase tipo 1 no fígado de ratos obesos Zucker, que está associada a redução da geração local de GC. Estes dados reforçam a existência de mecanismos hepato-protetores dos desdobramentos da obesidade tal como é descrito em seres humanos.

A influência do eixo HHA sobre o balanço energético se dá tanto por meio da ação direta do GC sobre os tecidos alvos, quanto pela sua interferência no metabolismo de outros hormônios (Walker, 2007). Suas ações genômicas, ao longo de horas e dias, preparam o organismo para a mobilização dos estoques de ácidos graxos e glicose, advindos do fígado, músculo esquelético e do tecido adiposo, ao promover glicogenogênese, gliconeogênese, catabolismo muscular e *turnover* de ácidos graxos (Bollen *et al.*, 1998; Peckett *et al.*, 2011). Os GC também modulam a liberação e ação de hormônios, como por exemplo, inibindo a secreção de insulina, promovendo a síntese e secreção das catecolaminas (Krizanova *et al.*, 2001; Hodel, 2001; Park *et al.*, 2008), reduzindo a resposta a insulina e aumentando a sensibilidade tecidual às catecolaminas (Hadcock & Malbon, 1988). Essas ações possibilitam a oferta energética para os tecidos periféricos em situações de luta e fuga, jejum prolongado e redução da temperatura ambiental.

2.1 Obesidade & eixo HHA

A obesidade em seres humanos e em modelos experimentais está relacionada com o aumento da atividade do eixo HHA, bem como aumento da produção e da depuração de GC (Andrew *et al.*, 1998; Seckl *et al.*, 2004; Peckett *et al.*, 2011). A fisiopatologia da obesidade central está relacionada com os efeitos GC principalmente sobre o tecido adiposo e fígado (Livingstone *et al.*, 2000; Plagemann, 2004; Boullu-ciocca *et al.*, 2005; Peckett *et al.*, 2011; Gathercole *et al.*, 2011; Baudrand *et al.*, 2011). O excesso de GC contribui para o aumento da adiposidade visceral ao estimular a ingestão alimentar (pelo aumento da expressão de NPY) (George *et al.*, 2010; Peckett *et al.*, 2011); aumentar a atividade da lipoproteína lipase no tecido adiposo omental, elevando a disponibilidade de ácidos graxos livres para captação pelo tecido subjacente e para circulação (Björntorp & Rosmond, 2000); induzir a maturação de pré-adipócitos e sua posterior hiperplasia (Bujalska *et al.*, 1999). Entretanto, estudos recentes

revelam que indivíduos muito obesos podem não apresentar proporcional elevação do nível sérico de GC (Basu *et al.*, 2009; Stimson *et al.*, 2009).

A literatura aponta além da concentração sérica de GC, os níveis teciduais de enzimas que regulam seu metabolismo local podem estar envolvidos na maior sensibilidade encontrada em modelos de obesidade (Boullu-ciocca *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2011; Jessop *et al.*, 2001). Camundongos transgênicos que super-expressam 11 β HSD1 no tecido adiposo visceral apresentam obesidade central, resistência a insulina e dislipidemia, ao promover o aumento da disponibilidade tecidual de GC (Masuzaki *et al.*, 2003). Enquanto camundongos que tiveram o gene para 11 β HSD1 suprimido apresentam resistência ao desenvolvimento de obesidade e das desordens associadas mesmo sendo alimentados com dieta hipercalórica (Paterson *et al.*, 2004).

Torrecilla e colaboradores (2011) demonstraram que pacientes obesos mórbidos com síndrome metabólica apresentam superexpressão hepática dos genes envolvidos na produção de glicocorticóides (11 β -HSD1 e H6PDH) e na sua ação (receptor de GC). O gene para enzima gliconeogênica, PEPCCK (estimulada por GC) também está superexpresso neste grupo de indivíduos obesos. Esses achados reforçam o conceito de que a superexpressão de 11 β -HSD1 no fígado é crucial para o desenvolvimento de síndrome metabólica. Assim a superexpressão da enzima 11 β -HSD1 no fígado está relacionada com o aumento da sensibilidade tecidual aos GC e conseqüente estímulo da lipogênese (Walker, 2007). O excesso de triglicerídeos no hepatócito é prejudicial às suas funções celulares, resultando em um fenômeno chamado de lipotoxicidade, que induz o estresse oxidativo, o prejuízo da sinalização da insulina, a apoptose e a ativação de resposta inflamatória no fígado, além de estar relacionada, em longo prazo, com o desenvolvimento de fibrose e cirrose (Trauner *et al.*, 2010). O prejuízo da sinalização da insulina ocorre através da ativação da PKC (*protein kinase C*), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) e IKK2 (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-2*) que fosforilam o IRS-1 e IRS-2 (*insulin receptor substrate 1 e 2*, respectivamente) no resíduo de serina ao invés de tirosina, interferindo na sua capacidade de ativar PI3 quinase (Samuel *et al.*, 2004). Clinicamente, este fenômeno resulta em esteatose hepática não-alcoólica. Sua prevalência é até 30% nos países desenvolvidos e cerca de 10% nas nações em desenvolvimento. Indivíduos com esteatose hepática não-alcoólica têm uma taxa de mortalidade maior do que a população em geral e apresentam elevado risco de desenvolver doenças cardiovasculares e diabetes no futuro (Smith & Adams, 2011).

2.2 Eixo HHA & superalimentação neonatal

A superalimentação neonatal também é capaz de influenciar o amadurecimento de mecanismos centrais e periféricos envolvidos no metabolismo de GC. Boullu-Ciocca *et al.*, (2005) descreveram no modelo de superalimentação neonatal um amadurecimento precoce do eixo HHA e maior sensibilidade periférica na idade adulta. Esses animais apresentam maior peso da glândula adrenal e maior conteúdo de corticosterona ao desmame e aos 120 dias de idade, acompanhado de maior concentração sérica e urinária de corticosterona. Ao desmame, o mecanismo de retroalimentação negativa exercido pelos GC foi capaz de reduzir os níveis de RNAm de CRH no núcleo hipotalâmico paraventricular. Além disso, foi demonstrado que ratos SA possuem maior conteúdo de receptores de GC aos 8 dias de vida, período em que a superalimentação ainda não afeta o peso corporal e os níveis séricos de ACTH e corticosterona. Já aos 120 dias, a expressão de CRH não difere do grupo controle, refletindo a falência da capacidade da corticosterona sérica em reduzir a estimulação central do eixo, possivelmente devido a menor concentração de receptores de GC no hipotálamo.

Aos 21 dias, os animais SA apresentam maior conteúdo de receptores de GC no tecido adiposo, sem aumento do conteúdo de 11β -HSD1, contribuindo para a hiperplasia e hipertrofia do tecido adiposo visceral em um período importante de determinação da morfologia deste tecido (Boullu-ciocca *et al.*, 2005). Aos 120 dias, esses animais apresentam elevado conteúdo de receptor de GC e de 11β -HSD1 no tecido adiposo visceral (Boullu-ciocca *et al.*, 2005). Hou e colaboradores (2011), demonstraram, adicionalmente, maior atividade da enzima 11β -HSD1 no tecido adiposo retroperitoneal aos 35 e 112 dias de idade em ratos Sprague-Dawley no mesmo modelo experimental, favorecendo a maturação dos pré-adipócitos e a lipogênese e inibindo a lipólise. Tais resultados somados a hipercorticosteronemia comprovam a maior atuação dos GC sobre o tecido adiposo visceral, sugerindo sua participação na obesidade central apresentada pela prole SA.

Considerando a resposta adreno-cortical ao estresse mediante ambiente hiper-nutritivo, Boullu-ciocca e colaboradores (2005), no modelo SA, identificaram que a corticosteronemia é maior aos 120 dias de vida após um discreto estímulo estressante. Rödel e colaboradores (2010), em ninhadas de ratos naturalmente reduzidas e não manipuladas, (ou seja, em que a gestação já acontece com menos embriões) aos 33 dias, associaram a maior corticosteronemia pós-estímulo à menor estimulação tátil entre os irmãos e pelo menor número de filhotes em cada ninhada durante a lactação. Spencer & Tilbrook, (2009) e Boullu-ciocca *et al.*, (2005)

atribuem a hiperatividade do córtex adrenal a influencia do ambiente hiper-nutritivo durante o desenvolvimento morfo-funcional do eixo HHA. Outra variável apontada como responsável pelo amadurecimento precoce do eixo HHA é a hiperleptinemia neonatal. Em um experimento conduzido por Proulx e colaboradores (2001), foi demonstrado que a hiperleptinemia neonatal é capaz de aumentar o conteúdo hipotalâmico de receptores de GC, amplificando a eficiência da retroalimentação negativa exercida pelos GC, conforme ocorre no modelo SA (Boullu-ciocca *et al.*, 2005).

Hou e colaboradores (2011) demonstram que ratos SA possuem elevado conteúdo hepático de 11β -HSD1 associada à hipercorticosteronemia. Sabe-se que em modelos transgênicos de super-expressão hepática dessa enzima estão associados à resistência hepática a insulina, dislipidemia, hipertensão e esteatose hepática (Paterson *et al.*, 2004). Recentemente, confirmamos a resistência insulínica hepática neste modelo aos 180 dias de vida, que apresentou alteração na sinalização de insulina no fígado (Conceição & Franco *et al.*, artigo submetido) caracterizada pela redução dos conteúdos do isoforma β do receptor de insulina, do IRS1 e fosfo-IRS1, da PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) e da Akt aos 180 dias. Velkoska e colaboradores (2005) demonstraram a hipertensão arterial aos 90 dias de vida em ratos SA. Em conjunto, esses resultados refletem um aumento da sensibilidade periférica a corticosterona como resultado da superalimentação neonatal que favorecem a deposição da gordura corporal e uma maior resposta a situações de estresse e a hipertensão arterial na idade adulta.

3 SISTEMA NERVOSO SIMPATOADRENAL:

Ameaças a homeostase e integridade corporal, como a reação de "luta ou fuga", hipoglicemia grave, hemorragia, frio ou infarto agudo do miocárdio são captados pelo sistema nervoso central (SNC) e induzem a ativação de seus sistemas autônomos de resposta, o sistema nervoso parassimpático (SNP) e simpático (SNS). A ativação do ramo simpático resulta na liberação das catecolaminas, noradrenalina pelas terminações nervosas e principalmente a adrenalina pela medula adrenal (Bannister, 1982).

As células cromafins que compõem a porção medular da glândula adrenal constituem um gânglio simpático modificado por terem a mesma origem embrionária que o SNC, estando envolvidas nas respostas do organismo a situações de estresse. Tais situações desencadeiam a liberação de catecolaminas pela medula adrenal para a corrente sanguínea (de Diego, 2008), preparando o corpo para resposta de "luta ou fuga". O aumento de catecolaminas para circulação aumenta a frequência e contração cardíaca e a pressão arterial, aumentando o fluxo de sangue para os músculos, preparando-o para a atividade intensa; além de aumentar o metabolismo celular e a dilatação das pupilas e bronquíolos (Hoffman & Taylor, 2001). Para suprir as demandas energéticas, a adrenalina estimula a glicogenólise e a gliconeogênese hepática, a glicogenólise muscular e a lipólise, aumenta a secreção de glucagon e inibe a secreção de insulina (Young, 2006; Teff, 2008; Jocken & Blaak, 2008).

A regulação da liberação de catecolaminas pela medula adrenal envolve a percepção do estímulo agressor pelo SNC (hipotálamo lateral e ventromedial), que inicia o disparo de potencial de ação. Esse estímulo elétrico percorre a fibra esplênica até a terminação nervosa liberando nas fendas sinápticas acetilcolina, que é captada pelos receptores colinérgicos nicotínicos das células cromafins (Feldberg *et al.*, 1934; de Diego, 2008). A ativação do receptor causa a despolarização da membrana da célula cromafim e consequente abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, resultando no aumento da concentração citosólica de Ca^{+2} e consequente exocitose das vesículas de catecolaminas (Douglas & Poisner 1961, 1962).

As catecolaminas são derivadas do aminoácido tirosina, que é gerado a partir da fenilalanina por ação da fenilalanina hidroxilase, ou obtido diretamente da dieta. Elas são constituídas por um grupo catecol (dihidroxibenzênio em posição *orto*) e um grupo amina. Sua síntese tem início com a hidroxilação da tirosina pela enzima tirosina hidroxilase (TH), que forma a 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). Esta é uma etapa limitante na biossíntese das

catecolaminas, pois a TH é inibida por retroalimentação pelos compostos catecóis formados (Kuhar, 1999). A regulação da atividade da enzima TH dá-se pela fosforilação de quatro resíduos de serina em sua porção N-terminal - Ser8, Ser19, Ser31, e Ser40 (Bobrovskaya *et al.*, 1998, 2001; Corbitt *et al.*, 1998; Kumer and Vrana, 1996). Posteriormente, a L-DOPA é descarboxilada pela enzima DOPA-descarboxilase (DOPA-d), ainda na porção citosólica, formando a dopamina. A dopamina é transportada ativamente para o interior de vesículas contendo a enzima dopamina β -hidroxilase (D β H), uma oxidase que catalisa a formação de noradrenalina ou norepinefrina (Kuhar, 1999). Na população de células cromafins produtoras de adrenalina, a enzima feniletanolamina N-metiltransferase (FNMT) catalisa a metilação da noradrenalina, formando adrenalina ou epinefrina (Kuhar, 1999). Os produtos dopamina, noradrenalina e adrenalina acumulam-se nas células cromafins até que seja deflagrado o estímulo a sua secreção (Figura 1).

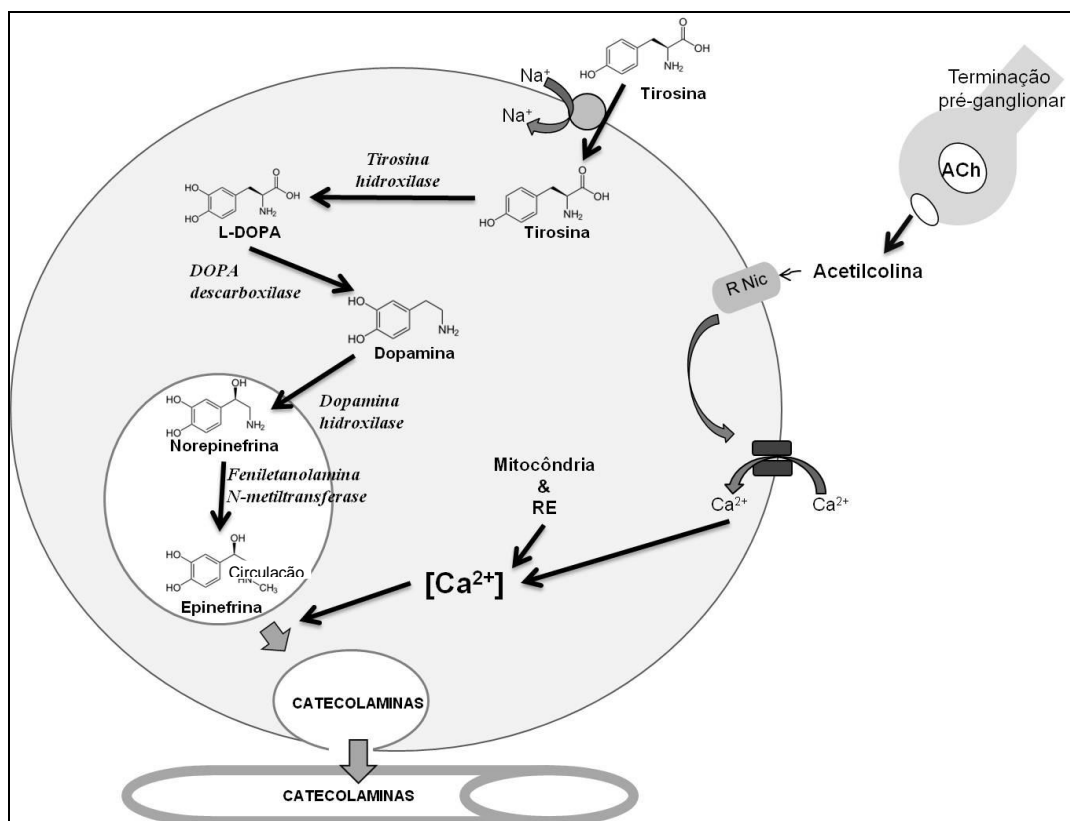


Figura 1: Biossíntese de catecolaminas em células cromafins da adrenal. Adaptado de Kuhar, 1999.

Após sua liberação na corrente sanguínea as catecolaminas possuem uma meia vida curta, pois são rapidamente metabolizadas por duas vias enzimáticas que envolvem a COMT (catecol orto metil transferase) e a MAO (monoaminoxidase). Em seres humanos a meia vida da adrenalina varia em torno de 20 minutos e da noradrenalina, 2 horas (Grouzmann *et al.*, 2001) e em roedores é de apenas 2 minutos (Rang *et al.*, 2004). Essas duas enzimas são intracelulares, logo degradam as catecolaminas antes de sua secreção ou depois de sua captação pelas células que possuem receptores adrenérgicos. Os produtos finais da degradação das catecolaminas, encontrados na urina são a metanefrina e ácido vanilmandélico (Hoffman & Taylor, 2001).

As catecolaminas exercem seus efeitos sobre os tecidos mediante sua ligação a receptores ligados à proteína G. Existem dois tipos de receptores adrenérgicos: α -adrenérgicos (subtipos α_1 e α_2) e β -adrenérgicos (subtipos β_1 , β_2 , e β_3) (Tabela 1) (Barbe *et al.*, 1996; Dóda, 1996). Os receptores α_2 -adrenérgicos quando ativados se ligam a proteína G inibitória que inativa a adenilato ciclase, diminuindo a concentração de AMPc e reduzindo a ativação da proteína quinase A (PKA). A ligação das catecolaminas ao receptor β -adrenérgico (β_2 e β_3) resulta no acoplamento do receptor à proteína G estimulatória, que estimula a adenilato ciclase a produzir AMPc, que ativa a PKA. Esta fosforila a lipase hormônio sensível com (LHS) e a perilipina (Granneman *et al.*, 2007). A fosforilação da perilipina (Ser492) favorece a associação da LHS fosforilada (Ser 659 e Ser660) à gotícula de gordura do adipócito (Langin & Lafontan, 2004; Brasaemle *et al.*, 2009). A LHS hidrolisa moléculas de triacilglicerol à diacilglicerol liberando ácido graxo (Egan *et al.*, 1992; Jenkins-Kruchten *et al.*, 2003). Essa hidrólise constitui a etapa limitante da lipólise mediada por hormônios.

Tabela 1: Característica dos receptores adrenérgicos

Tecidos e efeitos	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$
Músculo liso:					
Vasos sanguíneos	Constricção	Constricção / dilatação		Dilatação	
Brônquios	Constricção			Dilatação	
Trato GI	Relaxamento	Relaxamento		Relaxamento	
Esfíncter GI	Contração				
Útero	Contração			Relaxamento	
Destrusor da bexiga				Relaxamento	
Esfíncter da bexiga	Contração				
Vias seminais	Contração			Relaxamento	
Íris	Contração				
Músculo ciliar				Relaxamento	
Coração:					
Frequência			Aumento		
Força de contração			Aumento	Aumento	
Musculatura esquelética:				Tremor; ↑ massa muscular e velocidade de contração; Glicogenólise	Termogênese
Fígado:	Glicogenólise			Glicogenólise	
Tecido adiposo:		↓ lipólise	Lipólise	Lipólise	Lipólise Termogênese
Ilhotas pancreáticas		↓ secreção de insulina			
Terminações nervosas:					
Adrenérgicas		↓ liberação		↑ liberação	
Colinérgicas		↓ liberação			
Glândulas salivares:	Liberação de K^+		Secreção de amilase		
Tronco encefálico:		Inibe fluxo simpático			

Fonte: Rang *et al.*, 2004, p. 185; Tentolouris *et al.*, 2008.

A síntese e secreção de catecolaminas podem ser moduladas por hormônios como os GC e a leptina. A ativação do SNS pelo estresse é suprimida pelo bloqueio da liberação de CRH por dexametasona, demonstrando uma relação positiva entre GC e o sistema simpatoadrenal (Habib, 2000). Sabe-se que o córtex e a medula adrenal estão interligados por

capilares com orientação centrípeta e as células cromafins possuem receptores para os GC. Assim GC são capazes de exercer ações genômicas, como a promoção da maturação das células cromafins e da produção das catecolaminas, principalmente de adrenalina, ao estimular a transcrição de FNMT (Hodel, 2001). Da mesma forma ações não-genômicas, como a inibição da secreção de catecolaminas, quando sob estímulo crônico de GC (Park, 2008). Os GC também exercem influência permissiva sobre a sensibilidade tecidual as catecolaminas, elevando a expressão de RNAm do receptor β -adrenérgico tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Ma, 2011), além de promover o aumento da eficiência de ligação entre o receptor adrenérgico e a proteína G estimulatória (Hadcock & Malbon, 1988).

3.1 Sistema simpatoadrenal & distúrbios cardiometabólicos

O SNS está relacionado com a regulação do gasto energético e mobilização de gordura, ao estimular a termogênese, a glicogenólise e a lipólise (Spraul, 1993), assumindo desta forma, grande importância na fisiopatologia da obesidade. De fato, há décadas têm-se demonstrado a contribuição do SNA para o desenvolvimento da obesidade (Bray *et al.*, 1981; Scheurink *et al.*, 1996), que se caracteriza pela redução da atividade simpática e aumento da atividade parassimpática (Young & McDonald, 1992). No modelo de obesidade hipotalâmica induzida pela administração neonatal de glutamato monossódico em camundongos, que causa lesões no núcleo arqueado e na eminência mediana (Olney, 1969), foi demonstrado redução da expressão de TH e D β H, e menor conteúdo e secreção estimulada por potássio de catecolaminas adrenais aos 90 dias (Martins *et al.*, 2004). Tais resultados refletem uma disfunção adrenomedular na idade adulta que contribui para a preservação dos estoques energéticos sob forma de gordura.

O aumento da atividade simpática está associada ao desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares (Hall *et al.*, 2001; Morris, 2008), que são normalizados pela redução do peso corporal (Poirier *et al.*, 2006; Batsis *et al.*, 2007). Sendo assim, diferentes estudos consideram a participação de parâmetros alterados pela obesidade na gênese de doenças cardiovasculares, como por exemplo: a hiperatividade do sistema simpatoadrenal e do sistema renina-angiotensina, a ausência de resposta a agentes vasodilatadores, a hipersensibilidade a vasoconstrictores, o estado pró-inflamatório sistêmico, a hiperinsulinemia e a hiperleptinemia (Hall *et al.*, 2001; Poirier *et al.*, 2006).

O SNS pode ser modulado de acordo com a oferta energética, na qual o estado alimentado promove a sua ativação, enquanto a restrição alimentar inibe sua atividade (Rumantir *et al.*, 1999; Gentile *et al.*, 2007). Isso ocorre, possivelmente, pelo estímulo ao aumento da concentração sérica de leptina e insulina pelo estado alimentado (Sato *et al.*, 1999; Greenfield *et al.*, 2009). Este mecanismo de alguma forma preserva a massa de tecido adiposo, pois no excesso alimentar ativa o processo de gasto energético, enquanto que na restrição reduz a ativação simpática. Entretanto, nos estados de jejum prolongado ocorre uma maior ativação simpática, em especial da medula adrenal.

Estudos que investigam a relação entre a leptinemia e distúrbios cardiovasculares indicam que a hiperleptinemia está associada com a ocorrência de infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico em seres humanos, independentemente da presença de outros fatores de risco para doenças cardiovasculares (Rayner & Trayhurn, 2001; Zhang *et al.*, 2011; Sierra-Johnson *et al.*, 2007). A atividade simpática é inibida, a nível hipotalâmico, em escala proporcional a expressão de NPY no núcleo do trato solitário (Morris *et al.*, 1997). Assim, uma possível explicação para a associação de hiperleptinemia e maior risco cardiovascular é sua capacidade de suprimir a expressão de NPY e conseqüentemente aumentar a atividade simpática (Baltazi *et al.*, 2008). Desta forma a hiperatividade do sistema simpatoadrenal resulta na elevação da pressão arterial, da frequência cardíaca, da concentração sérica de glicose e de ácidos graxos livres e glicerol, todos fatores que contribuem para maior risco cardiovascular.

A leptina também é capaz de estimular a expressão de α -MSH, derivado de POMC (*pro-opiomelanocortin*), que por sua vez, estimula a atividade simpática ao se ligar aos receptores MC4R (*melanocortin 4 receptor*), aumentando a pressão arterial (Ni *et al.*, 2006). Tal efeito ocorre independentemente da resistência ao efeito anorexigênico da leptina, sugerindo uma sensibilidade seletiva a leptina nos núcleos hipotalâmicos (Kalil & Haynes, 2012).

A hiperinsulinemia associada à obesidade é capaz de estimular a atividade do SNS (Greenfield *et al.*, 2009; Grassi, 2010). Muntzel *et al.*, (1994) ao administrar insulina no terceiro ventrículo de ratos Wistar constatou a elevação da atividade simpática muscular, porém este tratamento não foi capaz de estimular a atividade simpatoadrenal, as concentrações plasmáticas de glicose e insulina, a pressão sanguínea e frequência cardíaca, evidenciando uma independência entre a ativação do SNS e do sistema simpatoadrenal.

Em relação à atividade simpatoadrenal sobre o metabolismo energético, estudos apontam uma interação entre hormônios que se apresentam geralmente alterados na obesidade e atividade do sistema simpatoadrenal (Aiston *et al.*, 1999; O'Doherty *et al.*, 2009). Estudos *in vivo* sugerem que a hiperleptinemia em obesos atua como supressor da glicogenólise hepática pela redução da sensibilidade a glicogenólise mediada pela adrenalina (Nemecz *et al.*, 1999). Desta forma, a leptina age como um hipoglicemiante ao impedir a degradação do estoque hepático de glicogênio. Entretanto, a administração intracerebroventricular de leptina resulta na diminuição do conteúdo hepático de glicogênio (Takahashi *et al.*, 1997). Possivelmente isto decorre da ação da leptina sobre o núcleo hipotalâmico ventromedial, que resulta na estimulação da atividade simpática no fígado. Nosso grupo demonstrou que a hiperleptinemia neonatal é capaz de causar hiperleptinemia e resistência hipotalâmica a leptina aos 180 dias, essa prole apresenta maior glicogênio hepático, confirmando os achados de Nemecz *et al.*, (1999) em indivíduos obesos (Trevenzoli *et al.*, 2010b). Em conjunto tais resultados reforçam a independência entre a ativação do SNS e do sistema simpatoadrenal, bem como sua importância para a homeostase glicêmica e a interação entre hormônios sensores do estado nutricional.

3.2 Sistema simpatoadrenal & superalimentação neonatal

Crianças obesas apresentam redução a sensibilidade lipolítica mediada pelas catecolaminas (Bougnères *et al.*, 1997; Enoksson *et al.*, 2000) e o emagrecimento não é capaz de melhorar a sensibilidade as catecolaminas no tecido adiposo (Blaak *et al.*, 1994). Esses dados sugerem que a resistência a lipólise possa ser uma das alterações iniciais para o estabelecimento da obesidade. Mediante a esse fato, estudos utilizam modelos de obesidade neonatal para uma melhor compreensão dos desdobramentos da obesidade precoce sobre a função simpatoadrenal, e assim identificar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos, além de desenvolver medidas terapêuticas para as alterações simpatoadrenais relacionadas com a obesidade (Young, 2002; Martins *et al.*, 2004).

Heggeness e colaboradores (1970) identificaram maior conteúdo tecidual de noradrenalina no coração em ratos SA aos 15 dias de vida, porém não ao desmame. Como os sistemas neuroendócrinos ainda se encontram em formação durante os primeiros 15 dias de vida em roedores, possivelmente o excesso de nutrientes atue como fator estimulatório do

SNS. Outro estudo, mostrou maior conteúdo de adrenalina no tecido adiposo marrom de ratos SA ao desmame (Young, 2002). É interessante ressaltar que a maior atividade do SNS verificada nessa idade coexiste com a obesidade corporal (Heggeness *et al.*, 1970; Young, 2002).

Posteriormente, para avaliar o efeito da superalimentação pela redução do tamanho da ninhada na atividade simpática de ratos aos 65 dias de idade, foi quantificada a noradrenalina formada em ratos alimentados com ração controle acompanhada ou não de oferta de sacarose a 10% - um potente estimulador da formação de noradrenalina (Young *et al.*, 1982). Os ratos SA apresentaram redução da formação de noradrenalina no coração, nos rins e no tecido adiposo marrom intra-escapular, bem como menor formação de noradrenalina em resposta a sacarose (Young *et al.*, 2002). Este mesmo perfil foi identificado no modelo de obesidade por lesão hipotalâmica ventromedial pela administração de ouro tioglucose (Young & Landsberg, 1980). Assim, ao contrário do que ocorre no início da vida, os animais submetidos à superalimentação neonatal apresentam redução da atividade basal e estimulada do SNS, contribuindo para manutenção da obesidade dos ratos SA.

Em relação a função simpatoadrenal de ratos SA, Lau e colaboradores (1988) identificaram aumento da atividade das enzimas TH e FNMT somente na lactação, à exemplo do conteúdo de noradrenalina no coração evidenciado por Heggeness e colaboradores (1970). Esse aumento pode ser atribuído a maior concentração de GC apresentada pelos animais SA no mesmo período, uma vez que estes são capazes de promover a síntese de catecolaminas ao estimular a expressão de FNMT (Hodel, 2001). No mesmo trabalho identificou-se uma sutil elevação no início da lactação da atividade da colina acetiltransferase, um marcador de atividade das terminações colinérgica que inervam as células cromafins (Lau *et al.*, 1988). A transitoriedade desse efeito da superalimentação sobre o nervo esplênico ainda pode ser encarada como resultado de mecanismos protetores de nervos periféricos que possuem seus corpos celulares no SNC. Desta forma resultando em um rápido retorno a homeostase.

Além das deficiências simpatoadrenais relacionadas à produção e secreção das catecolaminas, os tecidos alvos podem ainda apresentar reduzida sensibilidade a estes hormônios (Wang *et al.*, 2001; Haemmerle *et al.*, 2004). Estudos *in vivo* demonstram que indivíduos obesos apresentam redução da sensibilidade ao efeito lipolítico das catecolaminas no adiposo subcutâneo abdominal (Schiffelers *et al.*, 2003; Jocken *et al.*, 2008) possivelmente associada à ineficiência dos mecanismos lipolíticos intracelulares acionados pelas catecolaminas (Jocken & Blaak, 2008).

4 JUSTIFICATIVA DO PRESENTE ESTUDO

São muitos os fatores envolvidos na gênese da obesidade. Conforme já mencionado, alterações nutricionais, hormonais e ambientais no início do desenvolvimento são capazes de promover alterações na homeostase contribuindo assim para o desenvolvimento de futuros distúrbios cardiometabólicos (Gluckman & Hanson, 2007).

Em diferentes modelos experimentais de programação observa-se obesidade e hiperfagia, decorrentes de importantes alterações endócrino-metabólicas em períodos de alta susceptibilidade morfo-funcional. Sabe-se ainda, que um dos possíveis fatores coadjuvantes para o desenvolvimento de obesidade nesses modelos, é a disfunção do eixo simpatoadrenal e do eixo HHA na vida adulta. Tanto em seres humanos (Basu *et al.*, 2009) quanto em roedores (Masuzaki *et al.*, 2001), os hormônios do estresse (glicocorticoides e catecolaminas) têm sido amplamente citados como importantes contribuidores para o excesso de adiposidade, que podem estar estimulando a ingestão alimentar ou promovendo o armazenamento de ácidos graxos e glicose, seja pela modulação da secreção e/ou ação de outros hormônios, ou por sua ação direta (Peckett *et al.*, 2011). Distúrbios na sensibilidade a esses hormônios também podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da obesidade (Nakayama *et al.*, 2011).

A superalimentação neonatal causada pela redução do tamanho da ninhada leva ao desenvolvimento de hiperfagia e obesidade (Plagemann *et al.*, 1992; Cunha *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2011). Torna-se, portanto, interessante investigar a possível contribuição de modificações no metabolismo dos GC e das catecolaminas no acúmulo de tecido adiposo. Bem como a compreensão das surpreendentemente inalteradas glicemia e insulinemia neste modelo de obesidade (Rodrigues *et al.*, 2011), tendo como alvo de estudo da sensibilidade hepática as catecolaminas, principalmente pelo fato do fígado ser o órgão mais importante na controle da glicemia (Lin & Accili *et al.*, 2011).

Desta forma, buscamos ampliar o conhecimento sobre os prováveis distúrbios endócrinos que podem contribuir para o desenvolvimento da síndrome metabólica em um modelo experimental que mimetiza um importante subgrupo de obesos, a obesidade neonatal, uma vez que se torna cada vez maior a incidência de obesidade infantil.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da obesidade programada pela superalimentação neonatal sobre a função adrenal e hepática em ratos adultos.

5.2 Objetivos Específicos

Nas proles aos 180 dias de idade nos modelos experimentais de obesidade pela superalimentação causada pela redução do tamanho da ninhada, estudar:

- Massa corporal e ingestão alimentar
- Massa de gordura visceral
- Conteúdo de CRH hipotalâmico
- Conteúdo de ACTH hipofisário
- As concentrações séricas de ACTH e corticosterona
- O conteúdo de catecolaminas adrenais totais
- A secreção *in vitro* de catecolamina
- Expressão das enzimas de síntese das catecolaminas na medula adrenal
- Conteúdo de receptores teciduais de catecolaminas (ADRB3 e ADRB2) em TAV e fígado
- O conteúdo de glicogênio hepático
- O conteúdo de triglicerídeos hepático
- A morfologia hepática

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Modelo experimental

Nosso desenho experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia da UERJ (CEUA/184/2007; CEUA/006/2009), estando de acordo com a Lei n^o. 11.794 sancionada em 2008 (Marques *et al.*, 2009).

Para o desenvolvimento do nosso modelo experimental de obesidade, utilizamos ratas Wistar (3 meses), nulíparas, mantidas em biotério com temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (7:00-19:00 h) controlados que foram acasaladas (2 fêmeas:1 macho) e receberam água e ração *ad libitum*. As fêmeas grávidas foram então colocadas em gaiolas individuais. Após o nascimento, os neonatos foram distribuídos na proporção de 10 recém nascidos por fêmea lactante. Para induzir a superalimentação, no terceiro dia de lactação, o tamanho da ninhada foi reduzido para 3 filhotes machos por mãe (grupo SA). O grupo controle (C) permaneceu com 10 filhotes por fêmea lactante até o desmame (Figura 1). Para a realização de todos os experimentos foram utilizadas 7 ninhadas para ambos os grupos.

Aos 180 dias de idade, os animais de ambos os grupos foram sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado e centrifugado ($133 \text{ xg} / 25 \text{ min} / 4^{\circ}\text{C}$) para obtenção do soro, que foi armazenado a -20°C para posterior dosagem de corticosterona e ACTH.

Amostras do tecido adiposo retroperitoneal (visceral), fígado, hipotálamo e hipófise foram armazenados à -20°C para quantificar o conteúdo de proteínas e análises histológicas. As glândulas adrenais direitas foram pesadas e utilizadas para o experimento de secreção, em seguida foi quantificado seu conteúdo protéico. As glândulas adrenais esquerdas foram pesadas, armazenadas em ácido acético (10%) à -20°C para quantificação do conteúdo de catecolaminas.

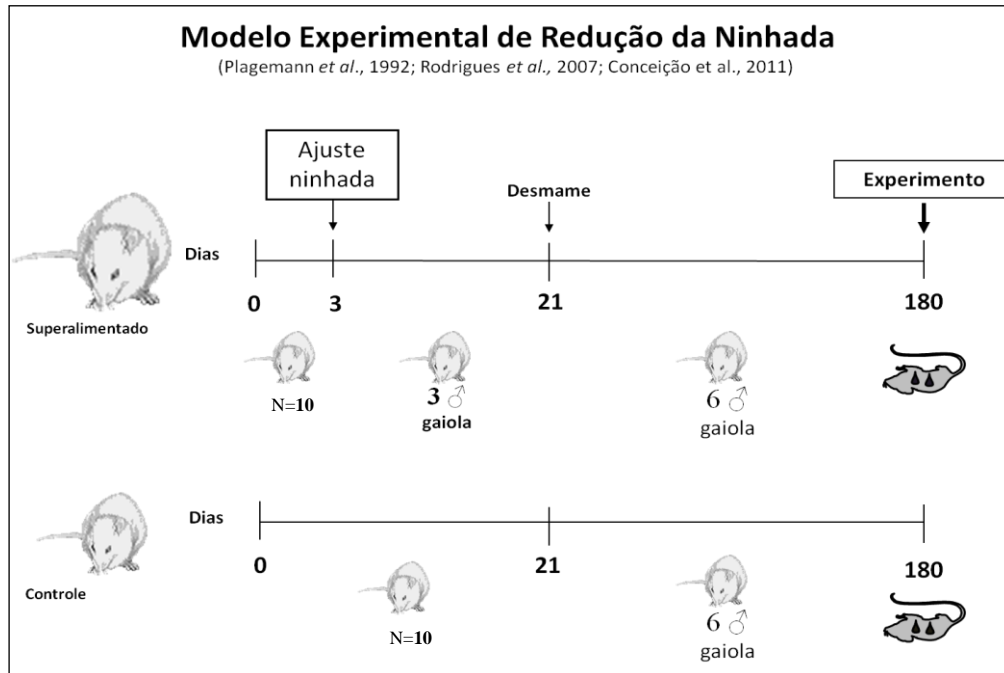


Figura 2: Esquema do modelo experimental de redução da ninhada.

6.2 Avaliação do estado nutricional

Massa corporal: durante os 21 dias da lactação, a massa corporal dos filhotes foi avaliada diariamente, e após o desmame, foi monitorada de 4 em 4 dias até os 180 dias de idade.

Ingestão de ração: após o desmame, a ingestão alimentar foi acompanhada de 4 em 4 dias até 180 dias de idade. A quantidade de ração ingerida foi estimada pela diferença entre o peso da ração que restou na gaiola (R_f) e a quantidade total colocada 4 dias antes (R_i), de acordo com a fórmula:

$$\text{Ingestão de ração (g)} = \left[\frac{R_i - R_f}{n} \right] 4$$

onde, “n” corresponde ao número de animais em cada gaiola, e “4” é o número de dias.

Massa de Gordura Visceral (MGV): Para avaliar adiposidade central, dissecamos e pesamos a MGV, que consiste na soma dos depósitos de gordura do retroperitônio, mesentério e epidídimo (Figueiredo *et al.*, 2011). Após a pesagem, esta foi fotografada.

6.3 Determinação das concentrações séricas hormonais

Amostras de soro das proles foram utilizadas para as dosagens de corticosterona e ACTH. Cada hormônio foi analisado em ensaio único, dispensando a avaliação do coeficiente de variação interensaio.

A corticosteronemia total foi avaliada utilizando o kit específico para murinos (ImmuChem™ ^{125}I , duplo anticorpo, ICN Biomedicals, Inc Cleveland, OH, EUA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi 7%, sendo o limite mínimo de detecção de 50ng/mL.

A concentração sérica de ACTH foi quantificada utilizando o kit de imunoensaio enzimático específico para ratos de acordo com as instruções do fabricante (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, EUA) com limite de detecção entre 0,04-25 ng/ml e variação intra-ensaio de 2,05%.

6.4 Imunohistoquímica

Perfusão e processamento histológico: Ratos de P180 foram anestesiados com Avertin® (0,3mg/kg i.p.) e perfundidos via intracardíaca com solução salina 0,9% e paraformaldeído 4%; seguido de paraformaldeído e sacarose (10%). Os cérebros e hipófises foram retirados e armazenados em solução de sacarose (20%). Após crioproteção, foi realizada a inclusão em OCT para a criotomia. Os cortes, com espessura de 20 μm , em plano coronal, foram obtidos em criótomo e montados em lâminas cobertas com gelatina-alúmen de cromo 2%. As regiões de interesse hipotalâmicas foram coletadas segundo as coordenadas obtidas do Atlas estereotáxico (Paxinos e Watson, 1998). As lâminas foram mantidas a -20°C até o processamento imunohistoquímico.

Imunohistoquímica: Os anticorpos utilizados foram: anti-CRH (1:100, produzido em coelho, Abcam, MA, EUA) e anti-ACTH (1:100, produzido em camundongo, Santa Cruz, CA, EUA), revelados com o anticorpo secundários IgG anti-coelho, produzido em burro conjugado com ALEXA FLUOR 488 (Molecollar Probes, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). As lâminas foram lavadas 6 vezes em PBS + Triton 0,3% (salina tamponada com fosfato: KCl 2,7mM; KH_2PO_4 1,47mM; NaCl 136mM e Na_2HPO_4 8mM; pH 7,4). Após as lavagens, as lâminas foram incubadas com albumina sérica bovina (BSA) diluída em PBS (5%) por 1 h a 25°C. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS-BSA (1%)

por 2 h a 25°C, e overnight a 4°C. As lâminas foram então lavadas com PBS e incubadas com anticorpos secundários apropriados por 2 h a 25°C e mantidas no escuro. Após lavagens, as lâminas foram contra-coradas com o marcador de núcleo DAPI (Sigma, St. Louis, MO, EUA, diluição 1:5.000 em água destilada) por 2 min. Seguido de lavagens com PBS e após, com água destilada. As lâminas foram montadas com Pro-long Gold Antifade (Molecular Probes, Invitrogen Grand Island, NY, EUA) e guardadas a -20°C protegidas da luz.

Análise e aquisição de imagens: As análises foram feitas a partir de imagens obtidas por microscópio confocal LSM 510 META ZEISS (Carl Zeiss Inc., Jena, Germany). As imagens utilizadas para a quantificação foram capturadas no microscópio de epifluorescência (Olympus BX51, Tokyo, Japan), acoplado à câmera digital (Olympus DP72).

Quantificação: O anticorpo anti-CRH marca especialmente as fibras neuronais. Para as análises de quantificação nós utilizamos a ferramenta de segmentação do Programa Image-Pro Plus (versão 4.5; Media Cybernetic, Inc, Silver Spring, MD, EUA), o qual extrai somente o que é marcação e representa em uma nova máscara (outra imagem) em escala de preto e branco, excluindo dessa forma toda a marcação de fundo (background). Após, o programa fornece dados em histograma com a quantidade total de pixels presentes na imagem (unidade relativa). Este procedimento é repetido três vezes para cada imagem, e a média das três repetições foram usadas como referência. Para a quantificação de ACTH nas hipófises, foram analisados 4 cortes de cada animal, e em cada corte foram capturadas 2 imagens, totalizando 8 imagens de cada animal. Para as análises de quantificação, foram contadas as células positivas para cada marcador, em cortes contra-corados com DAPI.

6.5 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting:

Glândulas adrenais direitas foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato (pH 7.4), contendo 1 µl de coquetel inibidor de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e centrifugados (1.920 xg, 4°C por 5 min).

O tecido adiposo retroperitoneal (100 mg) foram homogeneizados em 700 µL de tampão de lise (20 mM Tris-HCl, 10 mM NaF, 150 mM, 5 mM and 0,1% SDS, pH 7.4) com 1 µl de coquetel de inibidores de proteases e centrifugados (3.596 xg, 4°C por 25 min).

Hipotálamo e hipófise foram homogeneizados com 200 μ L de tampão de lise (50 mM HEPES, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM EDTA, Triton X-100 1%, pH 6.4) com 1 μ l de coquetel inibidor de proteases e centrifugados (3.596 xg, 4°C for 25 min).

A concentração protéica foi determinada usando ensaio colorimétrico kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Inc., Barrington, IL, EUA) seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostras (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0.001% bromofenol azul) e aquecidas a 95 °C por 5 min. As amostras foram analisadas pelo método SDS-PAGE. Foram pipetados 10 μ g de proteína dos homogenatos em poços no gel de 10% de poliacrilamida para eletro-separação de acordo com o tamanho e carga da proteína. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA).

Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em T-TBS acrescido de albumina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpo primário específico para cada proteína (*overnight*, a 5°C): anti-CRH (1:100) para homogenato de hipotálamo; anti-ACTH (1:100) para o homogenato de hipófise; anti-TH, anti-DOPA-d, anti-D β H, anti-FNMT (both at 1:1.000) para o homogenato de glândula adrenal; anti-ADRB3 (1:1.000) para o homogenato de tecido adiposo retroperitoneal; anti-ADRB2 (1:1.000) para o homogenato de fígado; e anti- β actina (1:100) para os homogenatos de todos os tecidos (com anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA, EUA). Após este período, as membranas foram lavadas e incubadas com 2º anticorpo conjugado à biotina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 1 h (25°C) sob agitação constante. Após mais uma sequência de lavagens, as membranas foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase (Zymed, South San Francisco, CA, EUA), na mesma concentração do anticorpo secundário utilizado (1 h, 25°C). As membranas foram lavadas novamente com T-TBS e tratadas com kit de quimioluminescência (ECL-plus; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA) e exposto a filme de raio-X.

As imagens das bandas foram analisadas e quantificadas com auxílio do programa Image J 1.34s (Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MA, EUA). Utilizamos a actina como controle interno.

6.6 Determinação de catecolaminas totais (adrenalina e noradrenalina) na adrenal

Dosamos o conteúdo de catecolaminas totais na adrenal pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol, descrito anteriormente (Trevenzoli *et al.*, 2007). As glândulas adrenais esquerdas foram cuidadosamente dissecadas, pesadas em balança de precisão, mantidas em ácido acético 10% e armazenadas a -20°C até o processamento do tecido. Para extrair as catecolaminas, as adrenais foram homogeneizadas manualmente em 500 µl de ácido acético 10% e centrifugadas (10.000 xg /1 min), para utilização do sobrenadante. No ensaio fluorimétrico, utilizamos padrões de adrenalina (Adren®, Hipolabor, BH, Brasil) diluída em ácido acético 10%. Em 50 µL de cada padrão ou amostra, adicionamos 250 µL de tampão fosfato 0,5 M, pH 7,0 e 25 µL de ferricianeto de potássio 0,5%. A solução foi homogeneizada, incubada por 20 minutos e paralisada com 500 µl de ácido ascórbico (60mg/mL)/NaOH 10M, na proporção 1:19. Adicionamos 2 mL de água destilada, sendo a solução novamente homogeneizada e submetida à leitura em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland). Os comprimentos de onda para a leitura foram 420 nm de excitação e 510 nm de emissão. As dosagens foram feitas em duplicata, com os tubos de ensaio sob refrigeração durante todo o procedimento. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

6.7 Secreção in vitro de catecolaminas

A secreção de catecolaminas basal e estimulada por cafeína foi avaliada em medulas adrenais direitas isoladas, sendo estas dissecadas, com auxílio de pinças, tesoura e lupa. Posteriormente, mantivemos as medulas em solução salina Krebs-Hepes com 0,5% de albumina, composta por (em mM): Cl⁻ 154,26; Na⁺ 143,4; Ca²⁺ 2,5; Mg²⁺ 1,18; SO₄²⁻ 1,2; K⁺ 5,9 e Hepes 25. A glicose foi acrescentada na concentração de 85 mg/dL, de acordo com as médias glicêmicas dos grupos experimentais de onde as medulas foram originadas. O pH da solução salina foi 7,2. As medulas foram incubadas por 5 min em 200 µl de solução Krebs para avaliar a secreção basal. Depois, as medulas foram estimuladas com 25 µM de cafeína por 5 min. Ao final da estimulação, as soluções de incubação foram acrescidas de 20 µl de ácido acético absoluto para conservação das catecolaminas e armazenadas (-20°C) para posterior dosagem pelo método fluorimétrico do trihidroxiindol.

6.8 Normalização do peso do fígado

A hipertrofia hepática foi estimada através da normalização da massa do fígado pelo comprimento da tíbia. Resumidamente, a massa do fígado foi obtida por pesagem hidrostática (em NaCl 0,09%) e o comprimento da tíbia esquerda foi obtido com um paquímetro, como descrito por Xu *et al.*, (2009).

6.9 Glicogênio hepático

A glicose produzida pela hidrólise do glicogênio hepático foi avaliada com kit comercial (Doles, Goiânia, GO, BR) em método previamente descrito por Trevenzoli e colaboradores (2010b). As amostras de fígado foram pesadas e homogeneizadas com 4 mL de TCA (10%). Após a centrifugação (1.000xg, 10 min, 4°C) foram adicionados a 5 mL de etanol absoluto (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) a 2 mL do sobrenadante. Após 12 horas de incubação à -20°C a mistura foi centrifugada (1.000xg, 10 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. O glicogênio foi hidrolisado pela incubação do *pellet* com 1 M HCl (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) por 30 minutos. Adicionou-se 1 mL de 1 M NaOH (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) para neutralizar a mistura. A glicose foi quantificada em 200 µL do sobrenadante a 510 nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland).

6.10 Triglicerídeo hepático

O conteúdo total de triglicerídeo hepático avaliado por adaptação de metodologia previamente descrita por Folch e colaboradores (1957). Resumidamente, 50 mg de fígado foram homogeneizados em 1 mL de isopropanol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) e centrifugados (740 xg, 10 min, 4°C). O conteúdo de triglicerídeo em 20 µL do sobrenadante foi quantificado com kit colorimétrico de acordo com as especificações do fabricante (Bioclin, BH, MG, Brasil). A leitura foi realizada a 490–540 nm em espectrofluorímetro (Hidex, Turku, Finland).

6.11 Histologia do fígado

Amostras do fígado de 5 ratos foram impregnadas em OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e seccionadas com criostato a 10 μm para a coloração por Oil Red O para avaliação histológica do volume da esteatose hepática (Vv[esteatose,fígado]) (Catta-Preta *et al.*, 2011). Amostras de fígado dos mesmos ratos foram fixadas em formalina (1.27 mol/L formaldeído 0.1 M tampão fosfato-salina, pH 7.2) e embebidos em parafina para realização de cortes não seriados de 5 μm . Os cortes foram alocados em lâminas histológicas para a coloração com hepatoxilina/eosina a fim de identificar a arquitetura do fígado (Bancroft e Stevens, 1990). Foram tiradas 10 fotografias aleatórias por animal para avaliar a esteatose e a arquitetura do fígado. Todas as imagens foram escolhidas ao acaso (formato TIFF, cor 36-bit, 1360x1024 pixels) com câmera Olympus DP71 e com Olympus BX40 microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japão). As análises foram realizadas com o programa Image-Pro Plus versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

6.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). O programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad softwares, Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado para as análises estatísticas e para obtenção dos gráficos. Os conteúdos protéicos e as concentrações hormonais foram analisados utilizando teste T não-paramétrico não pareado, seguido de Mann-Whitney *U* como posteste. Os demais dados foram analisados através de teste T Student não-pareado. Os dados experimentais foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Avaliação da massa corporal e ingestão alimentar

Os animais do grupo superalimentado apresentaram maior massa corporal desde o 7º dia, atingindo um aumento de 41% no período do desmame (Figura 3A). Os animais continuaram apresentando sobrepeso até os 180 dias de vida (+15% aos 180 dias, Figura 3B). O grupo SA apresentou maior ingestão alimentar do desmame até o sacrifício, (+15% aos 180 dias de vida, Figura 3C).

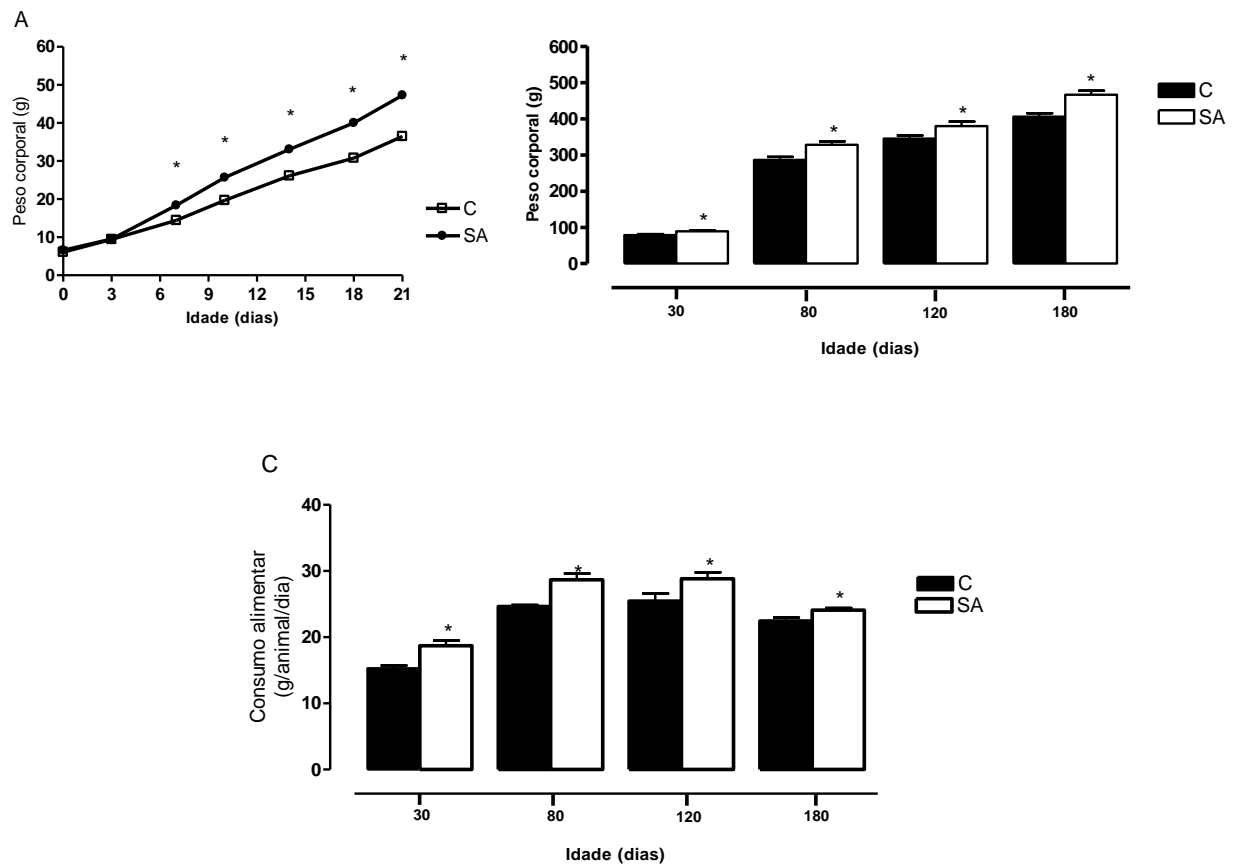


Figura 3: Efeito da superalimentação pós-natal sobre a massa corporal das proles dos grupos C (□) e SA (●) (A), massa corporal (B) e consumo alimentar das proles C e SA na idade adulta aos 30, 80, 120 e 180 dias de idade. Os valores são representados como média ± EPM. * $P < 0,05$ (N=7 por grupo). Análise realizada pelo teste *t* de Student não pareado.

7.2 Massa de Gordura Visceral

Aos 180 dias, os animais do grupo SA apresentaram aumento da adiposidade central (+79%, Figura 4A), decorrente do aumento no compartimento de tecido adiposo epididimal (+77%, Figura 4B), retroperitoneal de (+92%, Figura 4C) e mesentérico (+93%, Figura 4D).

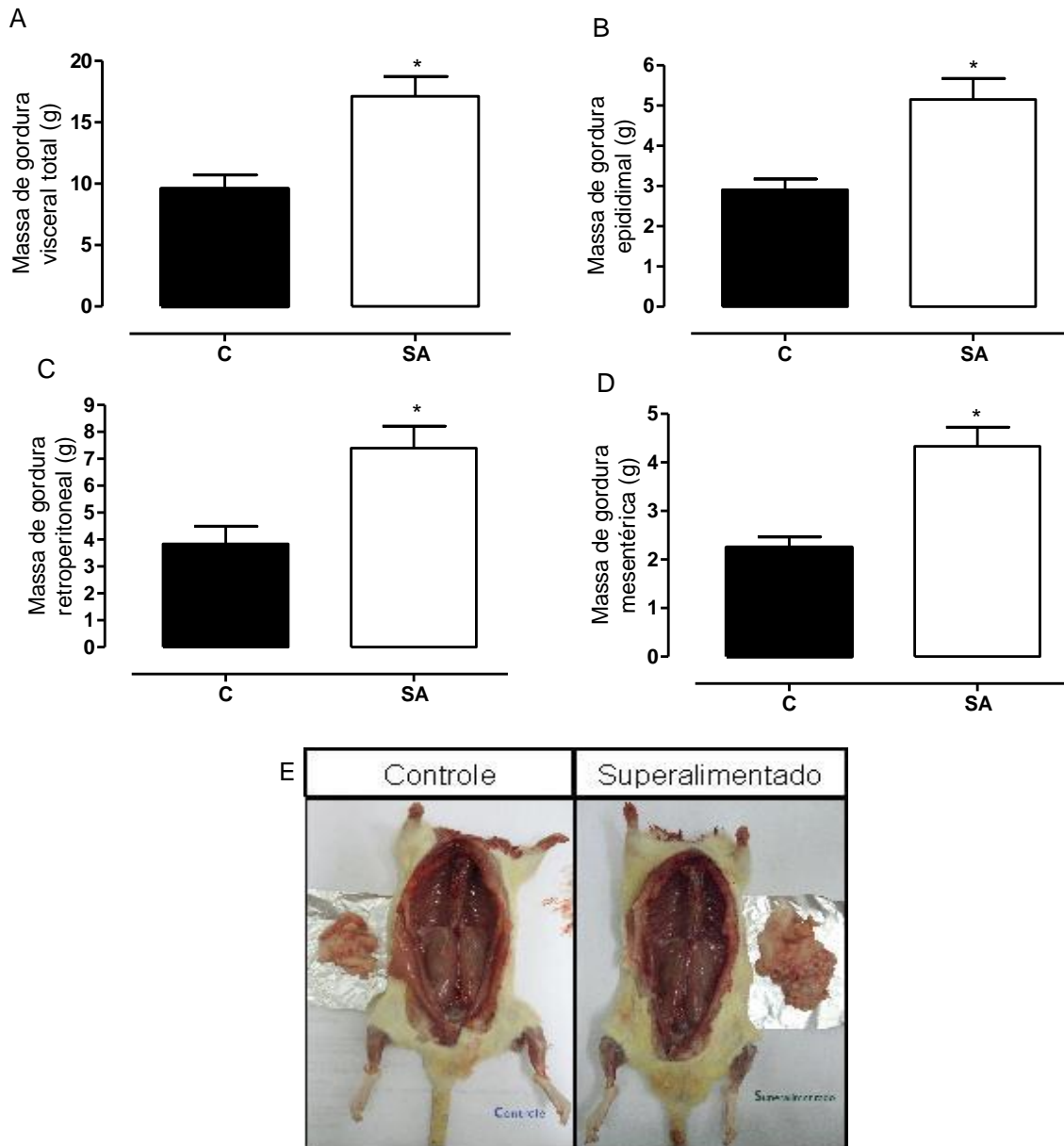


Figura 4: Efeito da superalimentação pós-natal sobre massa de gordura visceral total (A), epididimal (B), retroperitoneal (C) e mesentérica (D), fotografia representando a adiposidade central (E) nos grupos C e SA aos 180 dias de idade. Os valores são representados como média \pm EPM. * P < 0,05 (N=7 por grupo). Análise realizada pelo teste t de Student não pareado.

7.3 Avaliação de CRH e ACTH

Como demonstrado na figura 3, aos 180 dias de idade, o grupo SA não apresentou diferença no conteúdo de CRH hipotalâmico e na imunoreatividade para CRH na região parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo. Também não foi observada diferença entre os grupos na avaliação do conteúdo hipofisário de ACTH ou no número de células ACTH-positivas na hipófise.

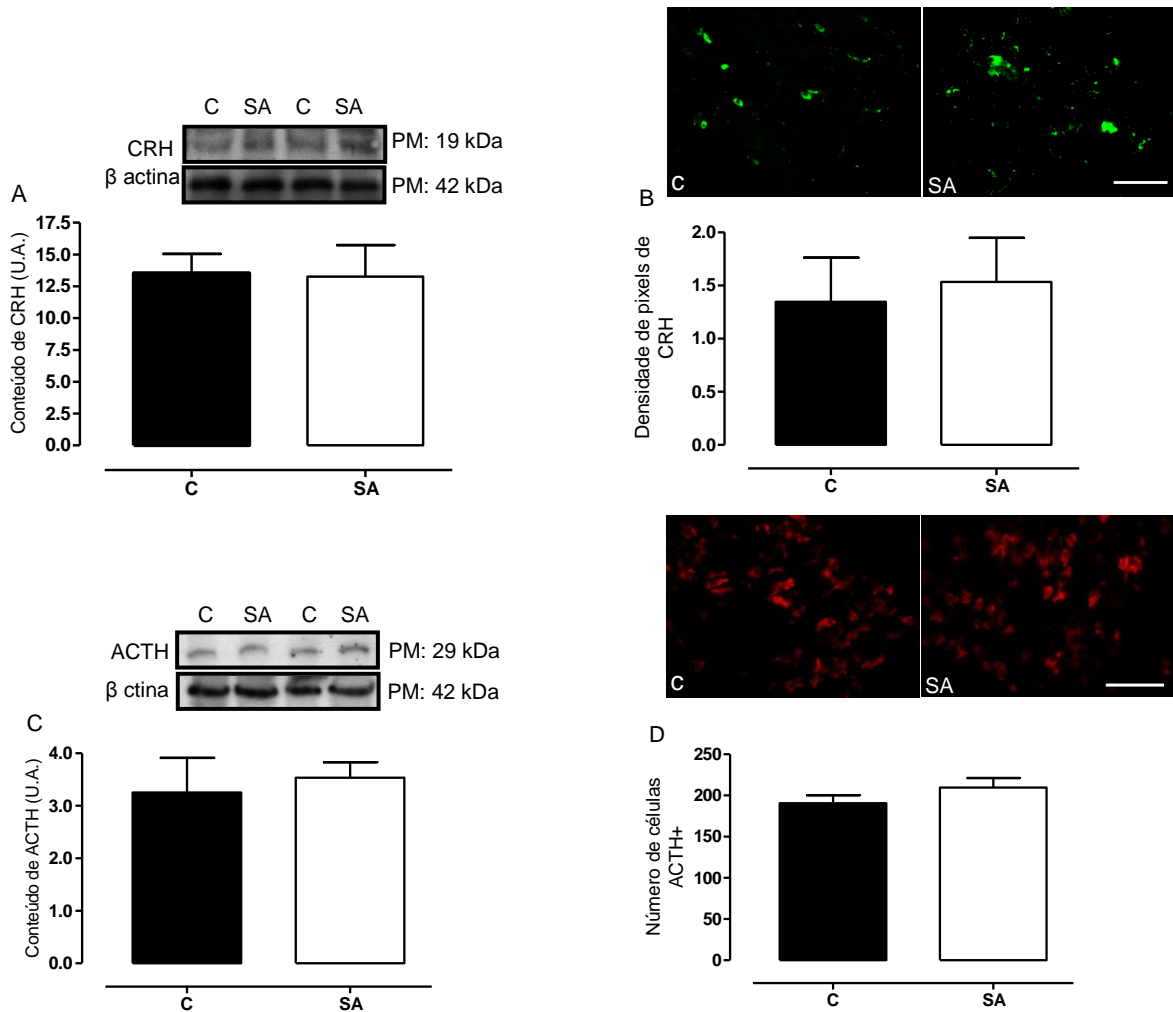


Figura 5: Efeito da superalimentação pós-natal sobre o conteúdo hipotalâmico de CRH (A) e imunoreatividade neuronal para CRH (B), conteúdo de ACTH hipofisário (C) e número de células ACTH-positivas (D) nos grupos C e SA aos 180 dias de idade. As bandas representam o conteúdo de cada proteína analisada. Os conteúdos de CRH e ACTH foram avaliados pela densidade de pixel das bandas [unidades arbitrárias (UA)]; conteúdo de actina foi utilizado como controle. Os gráficos representam um pool de duas corridas independentes de Western blot. Os valores são representados como média ± EPM. * $P < 0,05$ ($N = 7$ por grupo). Análise realizada pelo teste de Mann-Whitney.

7.4 Avaliação das concentrações séricas hormonais

Os níveis séricos de ACTH e corticosterona do grupo SA não diferiram do grupo C aos 180 dias de idade (Figura 6).

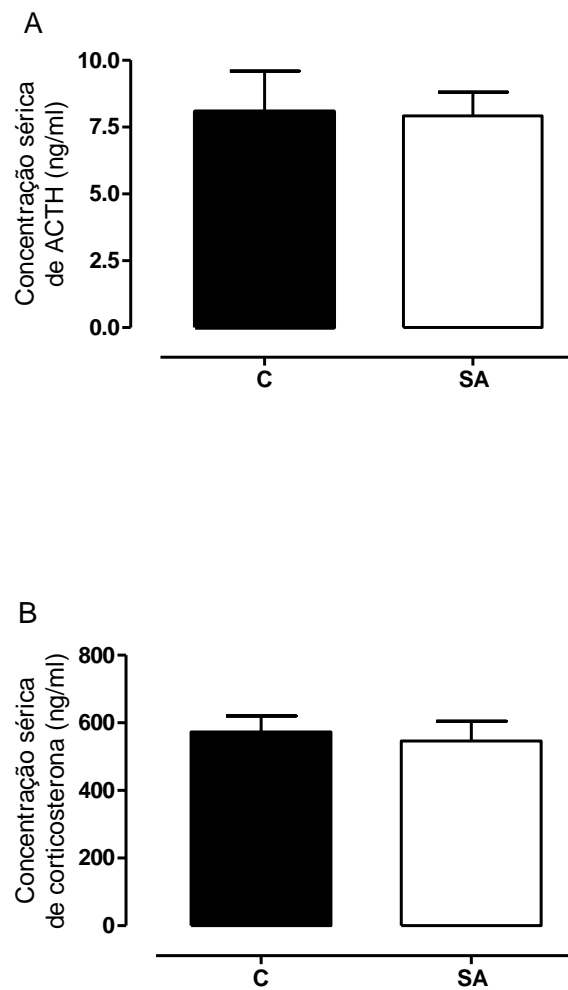


Figura 6: Efeito da superalimentação pós-natal sobre a concentração sérica de ACTH (A) e corticosterona (B) nos grupos C e SA aos 180 dias de idade. Os valores são representados como média \pm EPM (N = 7 por grupo). Análise realizada pelo teste de U Mann-Whitney.

7.5 Determinação de catecolaminas totais

Não observamos alteração da massa da glândula adrenal (Figura 7A) no grupo SA. Entretanto a superalimentação pós-natal resultou em maior conteúdo absoluto de catecolaminas adrenais (+35%, Figura 7B) assim como maior conteúdo relativo (+40%, Figura 7C) aos 180 dias de idade.

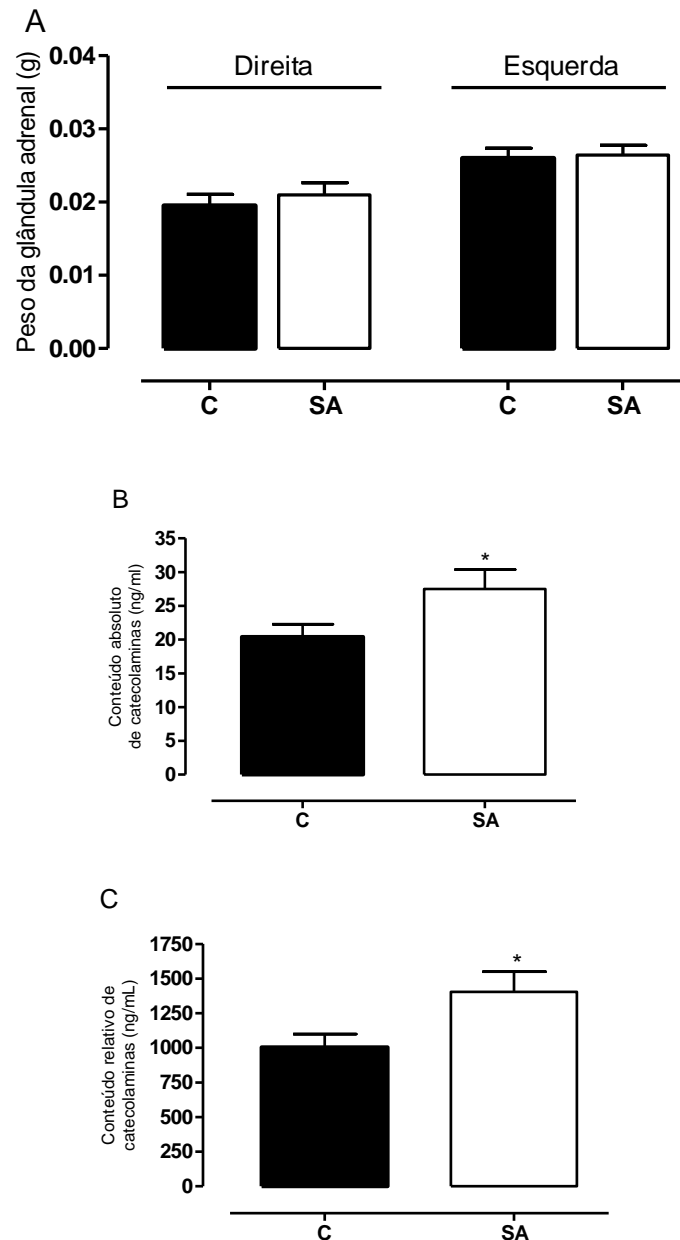


Figura 7: Efeito da superalimentação pós-natal sobre o peso da glândula adrenal (A), conteúdo absoluto (B) e relativo (C) de catecolaminas adrenais os grupos C e SA aos 180 dias de idade. Os valores são representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$ (N = 7 por grupo). Análise realizada pelo teste t de Student não pareado.

7.6 Secreção *in vitro* de catecolaminas

Como demonstrado na figura 8, o grupo SA apresentou maior secreção *in vitro* basal (+53%) e estimulada por cafeína (+43%) de catecolaminas adrenais aos 180 dias de vida.

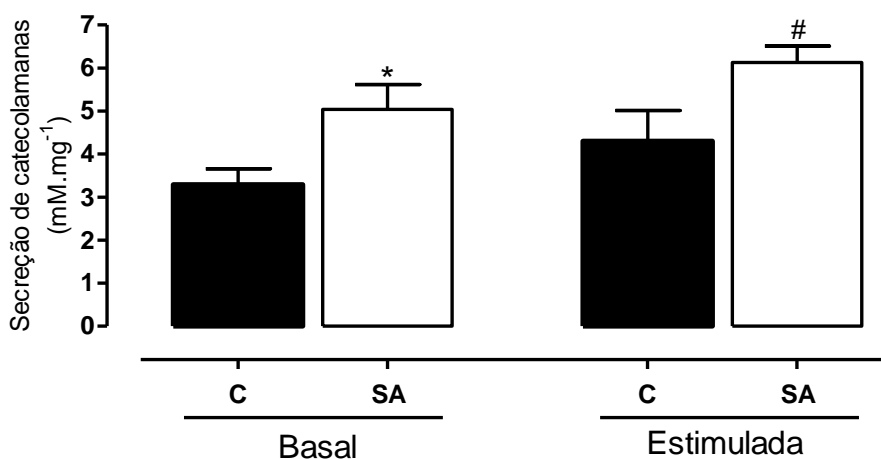


Figura 8: Efeito da superalimentação pós-natal sobre a secreção de catecolaminas pela medula adrenal. Secreção *in vitro* basal e estimulada por cafeína de catecolaminas nos grupos C e SA aos 180 dias de idade. Os valores são representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$ ($N = 7$ por grupo). Análise realizada pelo teste t de Student não pareado.

7.7 Avaliação da via de síntese das catecolaminas

Aos 180 dias de vida, os ratos SA apresentaram maior conteúdo adrenal de tirosina hidroxilase (+31%, Figura 9A) e de DOPA descarboxilase (+90%, Figura 9B), entretanto não houve alteração no conteúdo das enzimas dopamina β hidroxilase (Figura 9C) e feniletanolamina N metiltransferase (Figura 9D).

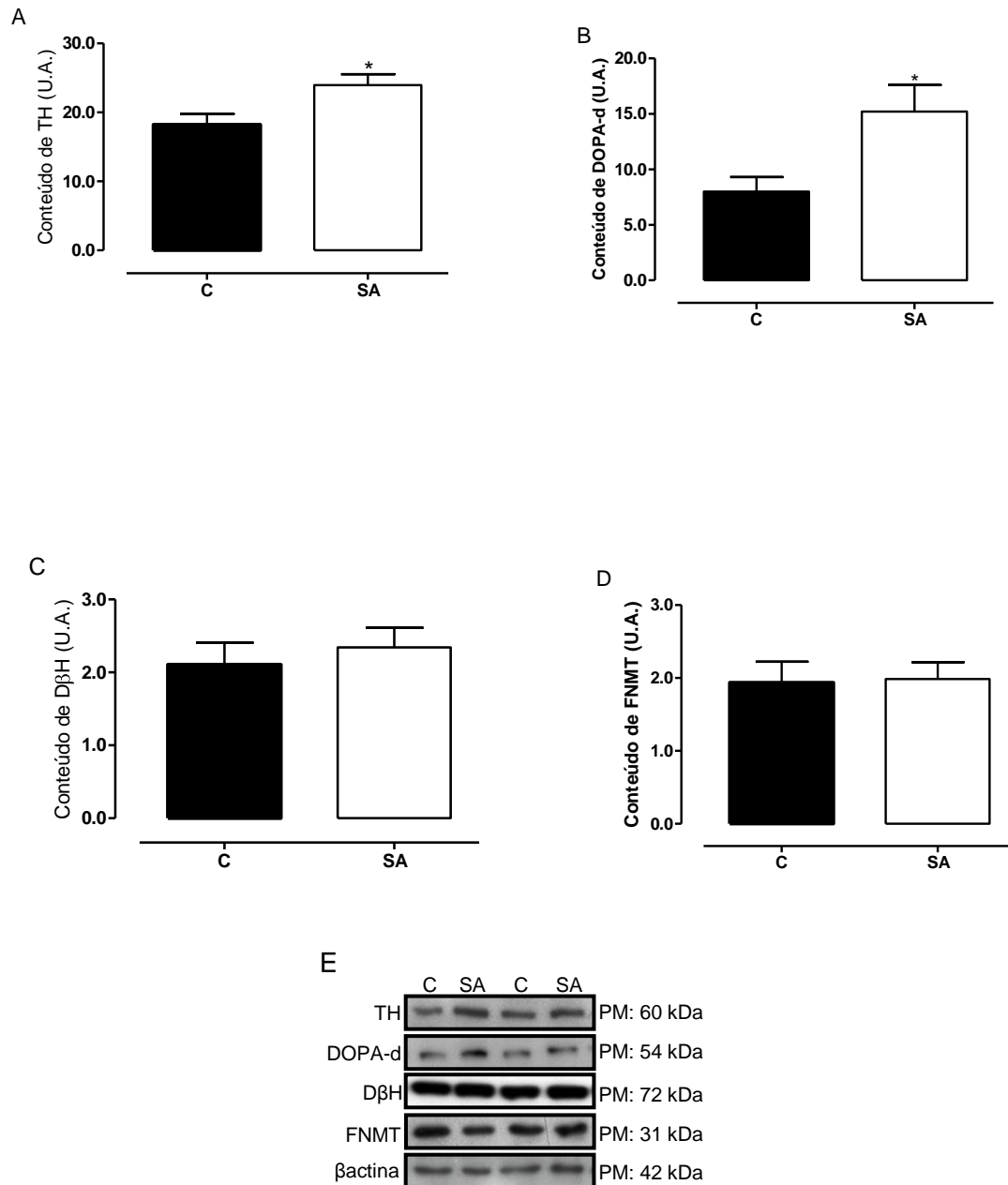


Figura 9: Efeito da superalimentação pós-natal sobre o conteúdo de TH (A), de DOPA-d (B), de dopamina β-hidroxilase (C) e de feniletanolamina N metiltransferase (D) em homogenatos de medulas adrenais de ratos dos grupos C e SA aos 180 dias de idade. As bandas representam o conteúdo de cada proteína analisada (E). O conteúdo das enzimas foi avaliado pela densidade de pixel das bandas [unidades arbitrárias (UA)]; conteúdo de actina foi utilizado como controle. Os gráficos representam um pool de duas corridas independentes de Western blot. Os valores são representados como média ± EPM. * P < 0,05 (N = 7 por grupo). Análise realizada pelo teste de Mann-Whitney.

7.8 Receptor de adrenalina no TAV e fígado

Como observado na figura 8, aos 180 dias, o grupo SA não apresentou alteração do conteúdo de ADRB3 no tecido adiposo retroperitoneal (figura 10A). Entretanto, apresentaram redução do conteúdo de ADRB2 no fígado (-45%, Figura 10A).

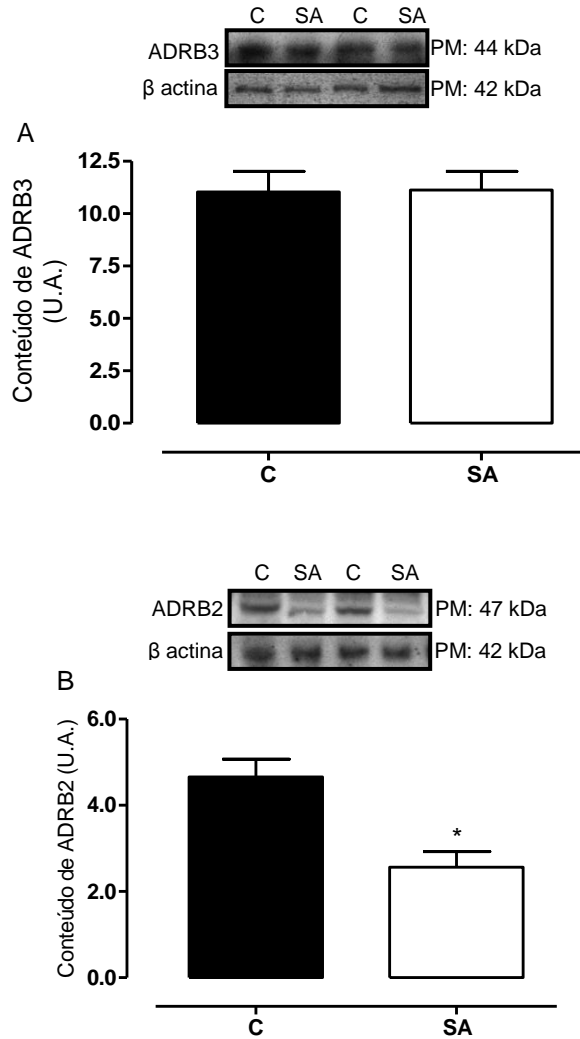


Figura 10: Efeito da superalimentação pós-natal sobre o conteúdo do receptor β 3-adrenérgicos (ADRB3) no tecido adiposo retroperitoneal (A) e do receptor β 2-adrenérgicos (ADRB2) no fígado (B) dos grupos C e SA aos 180 dias de idade. As bandas representam o conteúdo de cada proteína analisada. Os conteúdos de ADRB3 e ADRB2 foram avaliados pela densidade de pixel das bandas [unidades arbitrárias (UA)]; conteúdo de actina foi utilizado como controle. Os gráficos representam um pool de duas corridas independentes de Western blot. Os valores são média \pm EPM. * $P < 0,05$ ($N = 7$ por grupo). Análise realizada pelo teste de Mann-Whitney.

7.9 Alterações bioquímicas hepáticas

Os ratos adultos SA apresentaram, aos 180 dias de vida, maior peso tecidual, assim como maior conteúdo hepático de glicogênio e de triglicérideo (+18%, +79%, +49%, Figuras 11A, 11B e 11C, respectivamente).

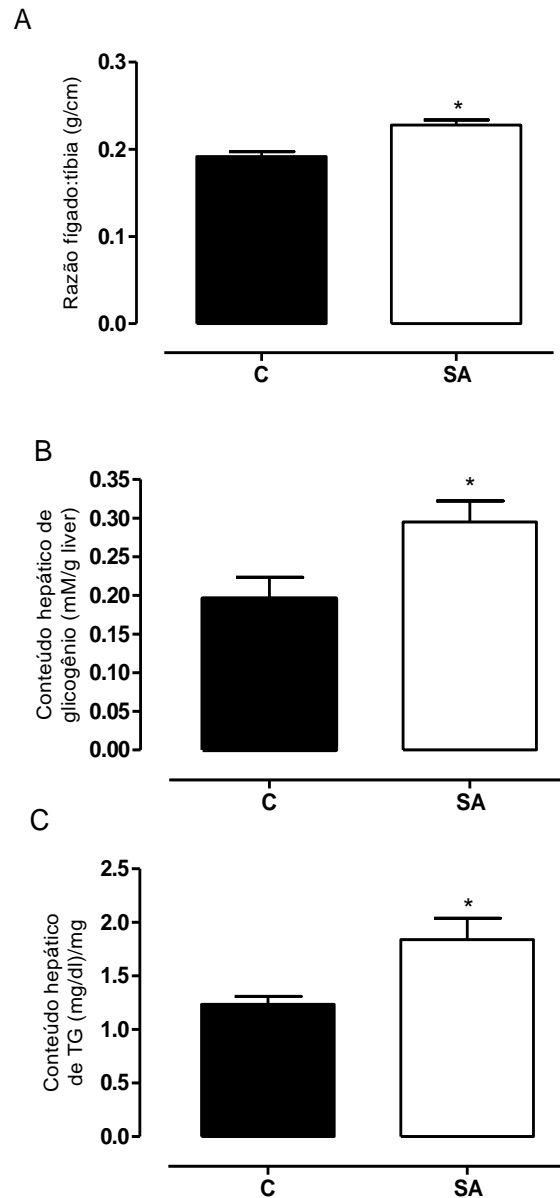


Figura 11: Efeito da superalimentação pós-natal sobre a razão peso do fígado pelo comprimento da tíbia (A), conteúdo de glicogênio (B) e triglicérides (C) no fígado de ratos dos grupos C e AS aos 180 dias de idade. Os valores são representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$ (N = 5-7 por grupo). Análise realizada pelo teste *t* de Student não pareado.

7.10 Histologia do fígado

Como verificado na figura 12, a análise histológica do fígado, tanto pelo método de Oil Red O quanto por hematoxilina/eosina, evidenciou maior densidade de gotículas de lipídios nos hepatócitos no grupo SA aos 180 dias de vida (+13 vezes, $P < 0,05$), caracterizando um quadro de microesteatose hepática.

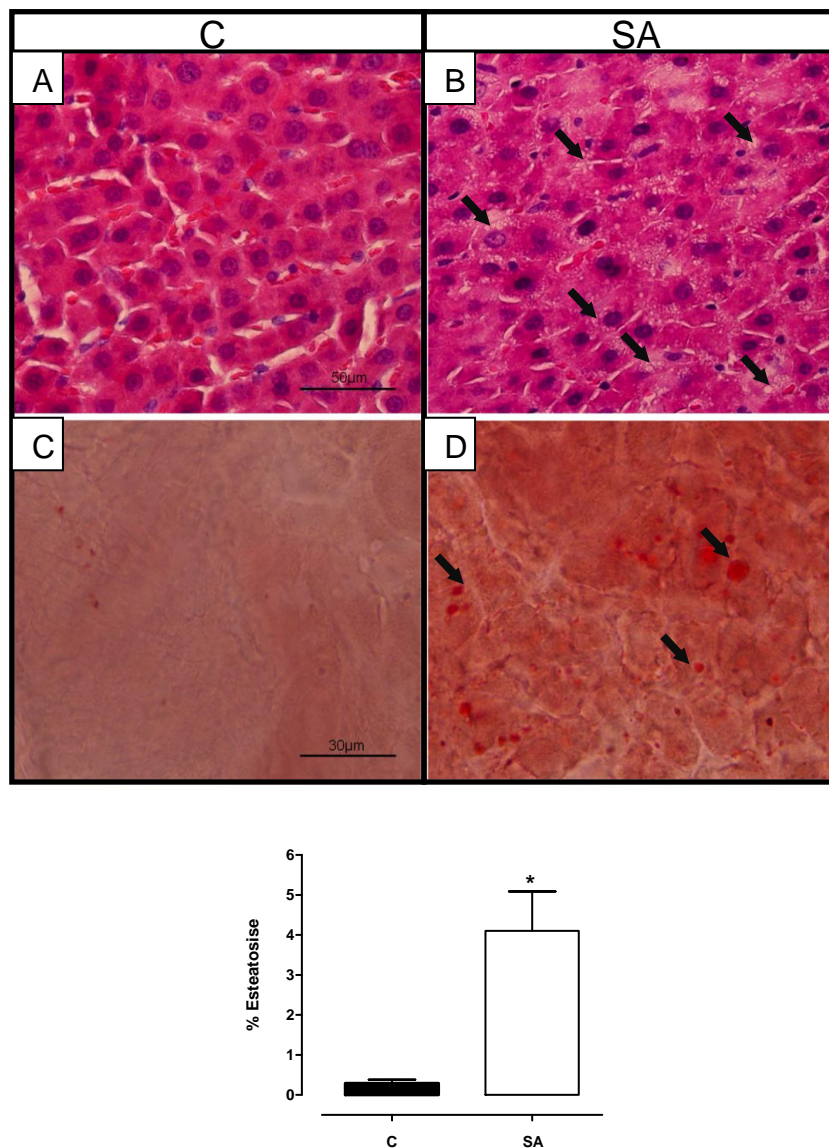


Figura 12: Efeito da superalimentação pós-natal sobre características morfométricas hepáticas. Fotomicrografias de fígado observado em objetiva de 60x para coloração por H & E (A; B) e objetiva de 100x para coloração por Oil Red O (C; D) em cortes histológicos dos grupos C e SA aos 180 de idade. Gotículas lipídicas são indicadas por setas em ambas as fotografias do grupo SA. Análise da porcentagem de esteatose (E). Os valores são representados como média \pm EPM. * $P < 0,05$ ($N = 5$ por grupo). Análise realizada pelo teste *t* de Student não pareado.

Tabela 2: Resumo dos principais achados do modelo experimental de obesidade neonatal por redução do tamanho da ninhada

Massa corporal adulto	↑	15%
Ingestão alimentar adulto	↑	15%
Massa de gordura visceral total	↑	79%
Massa de gordura epididimal	↑	77%
Massa de gordura retroperitoneal	↑	92%
Massa de gordura mesentérica	↑	93%
Conteúdo e quantificação de CRH	=	-
Conteúdo e quantificação de ACTH	=	-
ACTH e corticosterona no soro	=	-
Peso da glândula adrenal	=	-
Conteúdo absoluto de catecolaminas totais	↑	35%
Conteúdo relativo de catecolaminas totais	↑	40%
Secreção basal <i>in vitro</i> de catecolaminas	↑	53%
Secreção estimulada <i>in vitro</i> de catecolaminas	↑	43%
Conteúdo de TH na medula adrenal	↑	31%
Conteúdo de DOPA-descarboxilase na medula adrenal	↑	90%
Conteúdo de DβH e FNMT na medula adrenal	=	-
Conteúdo de ADRβ3 no TAV	=	-
Conteúdo de ADRβ2 no fígado	↓	45%
Peso do fígado	↑	18%
Conteúdo de glicogênio hepático	↑	79%
Conteúdo de triglicérideo hepático	↑	49%
Porcentagem de esteatose	↑	13x

8 DISCUSSÃO

Os hormônios do estresse, GC e catecolaminas, são importantes reguladores do metabolismo do tecido adiposo. Além disto, são amplamente associados à obesidade, seja por estimular a ingestão alimentar ou por modular o armazenamento de ácidos graxos (Dallman *et al.*, 2001; Epel *et al.*, 2001; Tentolouris *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2011; Peckett *et al.*, 2011), tornando-se importante a compreensão dos seus efeitos sobre a regulação do metabolismo energético.

No presente estudo, a redução do tamanho da ninhada durante a lactação resultou, dentre outras alterações, em hiperfagia e obesidade da prole por toda vida, corroborando resultados anteriores realizados em nosso laboratório (Rodrigues *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2011; Conceição *et al.*, 2011) e por outros grupos (Plagemann *et al.*, 1992; Velkoska & Cole, 2005; Moreira *et al.*, 2009; Ferreti *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012). Esse modelo de programação resulta também na redução da sensibilidade ao efeito anorexígeno tanto à leptina (Rodrigues *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011) quanto à insulina (Plagemann *et al.*, 2010) e está associada a redução da termogênese no tecido adiposo marrom (Xiao *et al.*, 2007). Estudos sugerem que esse perfil esteja associado aos elevados níveis séricos de insulina, leptina e glicose durante o período crítico da lactação, que podem alterar, por toda vida, os padrões de expressão gênica das cascatas de sinalização envolvidas no gerenciamento dos estoques energéticos (Plagemann *et al.*, 1999a, 1999d e 2010).

Alguns trabalhos sugerem que a obesidade visceral está associada a elevados níveis séricos de GC, semelhante ao que ocorre na síndrome de Cushing (Livingstone *et al.*, 2000; Plagemann, 2004; Peckett *et al.*, 2011; Gathercole *et al.*, 2011; Baudrand *et al.*, 2011; Shah e Lila, 2011). Entretanto, a obesidade sem alteração neste parâmetro também é descrita (Andrew *et al.*, 1998; Jessop *et al.*, 2001; Boullu-ciocca *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2011). Os ratos SA apresentam maturação precoce do eixo HHA, caracterizada por maior expressão de CRH no hipotálamo, maior peso da glândula adrenal, elevado ACTH sérico e corticosterona ao desmame (Boullu-ciocca *et al.*, 2005). Entretanto, ao avaliarmos uma possível disfunção persistente do eixo HHA nos animais SA adultos, observamos que os níveis basais de CRH hipotalâmico, de ACTH hipofisário e sérico e a corticosteronemia não apresentaram alteração significativa, sugerindo uma normalização do eixo HHA, com o envelhecimento. Esta normalização do eixo HHA também foi observada em camundongos transgênicos (C57Bl6/DBA2) aos 190 dias, criados em ninhadas reduzidas (Ferreti *et al.*, 2011).

Corroborando o estudo de Spencer & Tilbrook, (2009), verificamos normocorticosteronemia aos 180 dias, apesar da elevada massa de tecido adiposo visceral. A literatura aponta que além da hiperatividade do eixo HHA, a obesidade pode estar relacionada a alterações no conteúdo tecidual de GC, bem como da atividade de enzimas que regulam seu metabolismo local (aumento da enzima 11β HSD1, do receptor de glicocorticóide e redução de 5α redutase tipo 1 e 5β redutase). Essas modificações teciduais podem levar a maior sensibilidade tecidual aos GC e consequente favorecimento ao aumento do estoque de substratos energéticos na forma de lipídios e glicogênio (Cooper & Stewart, 2009; Masuzaki *et al.*, 2003; Paterson *et al.*, 2004; Walker, 2007).

A 11β -HSD1 é uma enzima que converte a forma inativa do GC, 11 dehidrocorticosterona, a sua forma ativa corticosterona (em roedores), resultando em maior geração local de GC. Velkoska e Cole (2005), utilizando o modelo de programação pela superalimentação neonatal, atribuíram a maior adiposidade ao aumento na produção tecidual de GC devido ao elevado conteúdo de 11β -HSD1 no tecido adiposo aos 120 dias, que também foi confirmado pela maior expressão e atividade desta enzima aos 112 dias (Hou *et al.*, 2011). Assim, um maior conteúdo de GC no tecido adiposo resulta em aumento da adipogênese, mediada por maior expressão da lipase de triglicerídeos no tecido adiposo e maturação dos pré-adipócitos (Xu & Björntorp, 1990). Assim, supomos que nossos ratos SA apresentem maior conteúdo de 11β -HSD1 no tecido adiposo aos 180 dias, conferindo maior produção local de GC.

Outro sistema neuro-hormonal que apresenta capacidade de interferir na modulação das reservas energéticas é o SNS e medula adrenal. A ativação desse sistema não ocorre de forma generalizada, mas sim de forma seletiva (Macdonald *et al.*, 1995). Um exemplo que merece destaque são os indivíduos obesos e hipertensos, que algumas vezes apresentam maior atividade simpatoadrenal associada à menor sensibilidade tecidual a atividade catabólica das catecolaminas (Davy & Hall, 2004). Outra possibilidade é uma inibição mais abrangente do sistema simpatoadrenal. De fato, ratos obesos que foram tratados com MSG na lactação apresentam redução do tônus simpático e da secreção basal de catecolaminas pela medula adrenal (Andreazzi *et al.*, 2011).

Interferências nutricionais na janela crítica da lactação estão relacionadas às alterações no padrão de funcionamento do sistema simpatoadrenal em longo prazo (Young, 2002; Fagundes *et al.*, 2007; Laborie *et al.*, 2011). O modelo de indução de obesidade pela redução do tamanho da ninhada na lactação está associado à menor atividade das terminações

simpáticas do tecido adiposo marrom, rim e coração mediante estímulo por sacarose (Young, 2002) e menor atividade lipolítica mediada pelas catecolaminas no tecido adiposo marrom na idade adulta (Xiao *et al.*, 2007). Estes resultados refletem a redução da capacidade termogênica do tecido adiposo marrom favorecendo o desenvolvimento da obesidade.

Apesar da menor sensibilidade demonstrada em estudos anteriores, o presente estudo apresenta, pela primeira vez, o elevado conteúdo tecidual de catecolaminas no grupo SA aos 180 dias, provavelmente devido ao aumento do conteúdo das enzimas TH e DOPA descarboxilase na medula da glândula adrenal. Anteriormente, Lau e colaboradores (1988) identificaram um aumento transitório (da lactação ao início da puberdade) da atividade das enzimas TH e FNMT em ratos Sprague-Dawley submetidos ao mesmo modelo experimental. Além da maior síntese adrenal de catecolaminas, nossos animais também apresentaram maior secreção basal e estimulada por cafeína, sugerindo uma maior concentração sérica de catecolaminas. Tal fato poderia estar funcionando como um fator contribuinte para o desenvolvimento da hipertensão arterial apresentada por esses animais na idade adulta (Plagemann *et al.*, 1992; Peng *et al.*, 2006).

Modelos de programação metabólica que apresentam obesidade materna ou da prole durante a lactação apresentam também hiperleptinemia neonatal (Plagemann *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2009; Oben *et al.*, 2011). Esse fato assume grande relevância para a compreensão da hiperfunção adrenomedular apresentada por ratos na idade adulta tanto no modelo SA quanto no modelo de obesidade materna (Oben *et al.*, 2011). Nosso grupo demonstrou que isoladamente a hiperleptinemia durante a lactação é capaz de promover a hiperfunção adrenomedular na idade adulta (Trevenzoli *et al.*, 2007; Fraga-Marques *et al.*, 2009; Trevenzoli *et al.*, 2010a). A ação estimulatória da leptina sobre a atividade simpática pode ocorrer tanto a nível central (Baltatzi *et al.*, 2008), quanto diretamente sobre as células cromafins (Takekoshi *et al.*, 1999). No modelo de hiperleptinemia neonatal, ao que parece o estímulo para maior produção de catecolaminas pela medula da adrenal é central, através do estímulo que a leptina exerce no sistema nervoso simpático a nível central, pois a administração de leptina em medulas adrenais isoladas, resultou em menor secreção de catecolaminas no grupo programado pela hiperleptinemia neonatal. Ademais, a via de sinalização da leptina apresentou menor OBR e JAK2 nas medulas dos animais programados (Trevenzoli *et al.*, 2010). Sugerindo que a hiperleptinemia neonatal produz alterações a nível central que elevam a atividade adrenomedular da prole na idade adulta, mas que a resposta da medula ao efeito estimulatório da leptina é menor nestes animais programados.

Em outro modelo de programação estudado em nosso laboratório (Pinheiro *et al.*, 2011), em que as mães são tratadas com nicotina durante os 15 primeiros dias de lactação, estes animais também desenvolvem hiperleptinemia ao final do tratamento, porém ao contrário do modelo SA, em que a leptinemia é normalizada na idade adulta, no modelo da programação por nicotina, os animais são hiperleptinemicos. Provavelmente, em função desta diferença, estes animais apresentam fenótipo diferente dos animais SA, quando adultos. No modelo de programação por nicotina, ocorre maior expressão de CRH no hipotálamo, maior marcação de ACTH na hipófise, maior corticosteronemia, e assim como no nosso modelo de SA, maior expressão de TH e conteúdo de catecolaminas, porém a secreção basal ou estimulada de catecolaminas *in vitro* não foi aumentada. Outra diferença importante, é que o ADRB3 no tecido adiposo visceral foi aumentado no modelo de programação por nicotina, enquanto apresentou alteração no modelo SA. Como estes animais apresentam em comum hiperleptinemia neonatal, as similaridades como o aumento do conteúdo de catecolaminas na medula, podem ser devido a este *imprinting*. Entretanto, as alterações no eixo HHA no grupo nicotina podem ser causada pela hiperleptinemia do animal adulto. Como a leptina estimula o CRH (Peckett *et al.*, 2011), o aumento observado pode estar associado a hiperleptinemia. Desta forma, a ausência de alteração no eixo HHA do modelo SA, ressalta a importância da normoleptinemia na função normal deste eixo.

Considerando que os animais SA apresentam obesidade visceral, seria esperada uma redução da sensibilidade à lipólise mediada pelas catecolaminas, conforme já descrito em outros modelos de obesidade (Collins *et al.*, 1999; Dos Santos *et al.*, 2012). Contudo, a superalimentação pós-natal não está associada à redução do conteúdo de ADRB3 no tecido adiposo retroperitoneal. É pouco provável que haja alteração no subcutâneo, pois não há relatos desta associação na obesidade. Por outro lado, uma limitação deste estudo é não termos feito também o ADRB2 no tecido visceral. Lembramos que no modelo de programação por administração materna de nicotina na lactação o ADRB3 visceral está aumentado, mas a secreção de catecolamina está diminuída, sugerindo um menor estímulo catecolaminérgico neste tecido e daí a desinibição da expressão deste receptor, explicando então a obesidade nos animais programados por nicotina neonatal (Pinheiro *et al.*, 2011). Estudos anteriores demonstraram que os ratos SA apresentam aumento de ácidos graxos livres, triglicerídeo e colesterol aos 120 dias (Boullu-ciocca *et al.*, 2005), porém não apresentam alteração nos níveis séricos de triglicerídeo e LDL-c aos 180 dias, que apesar da redução do HDL-c sugere uma normalização do perfil lipídico nesta idade mais avançada

(Martins *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2011). No presente trabalho não avaliamos a isoforma $\alpha 2$ de receptores adrenérgico no tecido adiposo. Sua contribuição para a manutenção da massa de tecido adiposo não pode ser menosprezada, uma vez que maior expressão deste receptor é descrita em modelos de obesidade, mediando o efeito antilipolítico exercido pelas catecolaminas (Jocken & Blaak, 2008). Em conjunto, tais resultados sugerem uma taxa lipolítica dentro de padrões de normalidade, sugerindo que a hipertrofia dos adipócitos dos ratos SA (Conceição *et al.*, 2011) não esteja associada a redução da taxa lipolítica.

O fígado é um órgão que desempenha importante papel no metabolismo energético. Entre outras funções, é responsável pelo armazenamento de substratos energéticos que são mobilizados em resposta a curtos períodos de jejum e estresse (Raddatz e Ramadori, 2007). O fígado é o principal reservatório de glicose para os outros tecidos. O armazenamento da glicose sob a forma de glicogênio é estimulado pela concentração sérica de nutrientes como glicose, frutose e aminoácidos gliconeogênicos, de hormônios como a insulina e GC, e pelo estímulo do sistema parassimpático (Bollen *et al.*, 1998). Já a degradação do glicogênio à glicose é estimulada pelo glucagon, hormônio tireoidiano, sistema simpatoadrenérgico e prostaglandinas (Bollen *et al.*, 1998). Considerando a importância das catecolaminas (principalmente da adrenalina) para a glicogenólise e β -oxidação de ácidos graxos no fígado, quantificamos o conteúdo hepático de ADRB2 para avaliar a sensibilidade hepática às catecolaminas em ratos SA aos 180 dias. Constatamos menor conteúdo de ADRB2 nestes animais, o que sugere que a menor sensibilidade às catecolaminas no fígado, provavelmente por inibição na síntese de receptores exercida pelo excesso de catecolaminas séricas, fenômeno conhecido como *downregulation*.

Outra explicação para menor sensibilidade hepática às catecolaminas seria que a superalimentação neonatal e/ou a persistente hiperfagia induzisse o desenvolvimento de um mecanismo hepático de tamponamento dos níveis séricos de substratos energéticos, por um mecanismo de retenção de glicose sob a forma de glicogênio. Tal hipótese ajudaria a compreender a normoglicemia e normoinsulinemia de jejum observada por Rodrigues e colaboradores (2011) no mesmo modelo de redução de ninhada, aos 180 dias de vida.

Além disto, recentemente evidenciamos que o fígado dos ratos SA também apresenta menor conteúdo de nitrito que está diretamente relacionado a um menor conteúdo de óxido nítrico (Conceição & Franco, artigo submetido), que tem sua produção proporcional a glicogenólise hepática mediada pela ativação do ADRB2 (Hodis *et al.*, 2007), reforçando a hipótese de menor efeito catabólico das catecolaminas no fígado desses animais.

O maior conteúdo de glicogênio hepático nos animais SA contribui para a normoglicemia de jejum descrita previamente neste modelo (Rinaldi et al., 2008; Rodrigues *et al.*, 2011). Além da menor sensibilidade aos efeitos catabólicos das catecolaminas, o modelo SA apresenta outras importantes alterações hormonais que favorecem o acúmulo de glicogênio no fígado. Rodrigues *et al.*, 2009 menor concentração sérica de hormônios tireoidianos nos ratos SA aos 180 dias de vida. Como o T3 estimula a glicogenólise pelo aumento da concentração intracelular de cálcio e consequente ativação da enzima glicogênio fosforilase quinase α (Daza *et al.*, 1997), o hipotireoidismo observado neste modelo, pode estar contribuindo para a maior deposição hepática de glicogênio (Pickard *et al.*, 2003). Outra possibilidade seria uma maior sensibilidade hepática a corticosterona (Paterson *et al.*, 2004; Edgerton *et al.*, 2010) nos animais SA, uma vez que os glicocorticóides promovem a inativação da enzima glicogênio fosforilase α e ativação da glicogênio sintase favorecendo a formação de glicogênio (Moore *et al.*, 1998). De fato, já foi caracterizado maior expressão e atividade da 11 β HSD1 e menor expressão de 5 β redutase hepáticas no modelo de programação por redução de ninhada (Hou *et al.*, 2011).

Ainda considerando a importância do fígado para a modulação dos substratos energéticos evidenciamos pela primeira vez neste modelo, um quadro de esteatose hepática não alcoólica, que é considerada uma importante manifestação da síndrome metabólica e que está relacionada ao declínio de sua capacidade hepática de lidar com a glicemia e com o fluxo de ácidos graxos livres (Pietiläinen *et al.*, 2005). Estudos demonstram a relação entre a programação fetal e neonatal e comprometimento do metabolismo de lipídios no fígado e consequente desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica (Hogg *et al.*, 2011; Trevenzoli *et al.*, 2010b). Souza-Mello *et al.*, (2007) encontraram resultados semelhantes em ratos adultos programados pela restrição protéica durante a gestação associada a oferta de dieta hiperlipídica na lactação. Modelos experimentais de obesidade materna também estão relacionados ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica na prole. A oferta de uma dieta de cafeteria durante a gravidez e lactação resulta no desenvolvimento de esteatose hepática na prole aos 3 meses de idade, associado a maior lipogênese e à menor β -oxidação (Bouanane *et al.*, 2010). Isoladamente a oferta de dieta materna hiperlipídica na lactação também é capaz de induzir alterações estruturais e metabólicas do fígado da prole (Oben *et al.*, 2010).

Frequentemente a obesidade está associada à elevada deposição de triglicerídeos no fígado (Jakobsen *et al.*, 2007) e a resistência hepática a insulina (Pietiläinen *et al.*, 2005).

Curiosamente os ratos superalimentados durante a lactação não apresentam hipertrigliceridemia, hipoadiponectinemia, hiperleptinemia ou hiperinsulinemia (Rodrigues *et al.*, 2011) que são alterações consideradas necessárias para indução a esteatose hepática não alcoólica em outros modelos (Souza-Mello *et al.*, 2007; Bouanane *et al.*, 2010; Trevenzoli *et al.*, 2010b). Entretanto, é importante ressaltar que os ratos SA apresentaram resistência à insulina (Conceição & Franco, artigo submetido), outro importante fator envolvido no acúmulo de substratos energéticos no fígado. Em um estudo realizado para avaliar o efeito de uma dieta hipercalórica sobre o acúmulo de lipídios e a sensibilidade hepática à insulina, excluindo o efeito da resistência a insulina nos demais tecidos, ratos adultos foram alimentados com dieta hiperlipídica por apenas 3 dias. Como resultado, esses ratos apresentaram esteatose hepática e resistência à insulina caracterizada pela menor fosforilação de IRS1 e IRS2 por aumento da atividade de JNK1 e conteúdo de PKC γ no fígado (Samuel *et al.*, 2004). Demonstramos recentemente que os ratos SA apresentam resistência insulínica hepática caracterizada pela redução dos conteúdos da isoforma β do receptor de insulina, do IRS1 e fosfo-IRS1, da PI3K e da Akt aos 180 dias (Conceição & Franco, artigo submetido). Além disso, os ratos SA apresentam aumento da atividade de enzimas lipogênicas hepáticas aos 140 dias, a ácido graxo sintase, ATP citrato liase, enzima málica e glicose-6-fosfato desidrogenase (Duff & Snell, 1982), que também contribuem para o acúmulo de triglicerídeos no fígado, encontrado no presente estudo.

Nosso estudo demonstra que mesmo sem oferta de dieta rica em gorduras, a programação pela SA leva ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica na idade adulta. Isto provavelmente resulta da menor sensibilidade hepática às catecolaminas e a insulina e da maior sensibilidade aos GC.

Em conjunto, nossos resultados indicam que o estado nutricional durante a lactação é de extrema importância para o desenvolvimento adequado dos sistemas metabólicos responsáveis pela manutenção dos estoques energéticos. Demonstramos que a função da medula adrenal é sensível à superalimentação pós-natal, resultando na sua hiperativação na idade adulta, embora associada à menor sensibilidade tecidual. Além disso, os ratos SA apresentam alterações metabólicas que favorecem o armazenamento de lipídios no fígado e no tecido adiposo. Portanto, nossos achados contribuem para um melhor entendimento a respeito de como alterações no eixo adrenal podem contribuir para o estabelecimento de esteatose hepática, hipertensão e outras doenças crônicas relacionadas a obesidade, e que essas

alterações podem ser estabelecidas por modificações no padrão nutricional e endócrino em estágios onde ocorrem maior plasticidade.

9 CONCLUSÃO

A superalimentação neonatal causada pela redução do tamanho da ninhada leva ao desenvolvimento de hiperfagia e obesidade. Nossos resultados indicam que a regulação central do eixo hipotálamo-hipófise-córtex adrenal aparentemente encontra-se normal. Entretanto, há uma hiper-ativação adrenomedular caracterizada pela maior síntese, conteúdo e secreção de catecolaminas. Aparentemente, a sensibilidade às catecolaminas do tecido adiposo visceral está preservada. Entretanto, sugerimos que o maior conteúdo de glicogênio e triglicérides do fígado seja devido a uma menor sensibilidade as catecolaminas, pois o receptor ADRB2 está menos expresso no fígado. Embora a superalimentação neonatal resulte em hiperfunção adrenomedular, sua sensibilidade periférica é tecido-específica. Desta forma a menor sensibilidade hepática a catecolaminas pode contribuir para a microesteatose hepática observada neste modelo e a maior secreção de catecolaminas pode induzir a hipertensão arterial relatada por outros autores neste modelo.

REFERÊNCIAS

- Aiston S, Agius L. Leptin enhances glycogen storage in hepatocytes by inhibition of phosphorylase and exerts an additive effect with insulin. *Diabetes*. 1999; 48:15-20.
- Andreazzi AE, Grassioli S, Marangon PB, Martins AG, de Oliveira JC, Torrezan R et al. Impaired sympathoadrenal axis function contributes to enhanced insulin secretion in prediabetic obese rats. *Experimental diabetes research*. 2011. doi:10.1155/2011/947917
- Andrew R, Phillips DI, Walker BR. Obesity and gender influence cortisol secretion and metabolism in man. *Journal of clinical endocrinology & metabolism*. 1998; 83:1806-9.
- Baltatzi M, Hatzitolios A, Tziomalos K, Iliadis F, Zamboulis Ch. Neuropeptide Y and alpha-melanocyte-stimulating hormone: interaction in obesity and possible role in the development of hypertension. *International journal of clinical practice*. 2008; 62:1432-40.
- Bannister R. Introduction and classification. In *Autonomic Failure: a Textbook of Clinical Disorders of the Autonomic Nervous System*. R.Bannister, Eds.: 3–13. Oxford Medical Publications. Oxford, UK, 1982.
- Barbe P, Millet L, Galitzky J, Lafontan M, Berlan M. In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *British journal of pharmacology*. 1996; 117:907–13.
- Barker DJP. The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 2004; 23:588S-595S.
- Basu R, Basu A, Grudzien M, Jung P, Jacobson P, Johnson M, Singh R, Sarr M et al., Liver is the site of splanchnic cortisol production in obese nondiabetic humans. *Diabetes*. 2009; 58:39–45.
- Batsis JA, Romero-Corral A, Collazo-Clavell ML et al. Effect of weight loss on predicted cardiovascular risk: Change in cardiac risk after bariatric surgery. *Obesity*. 2007; 15:772–84.
- Baudrand R, Campino C, Carvajal CA, Olivieri O, Guidi G, Faccini G et al., Increased urinary glucocorticoid metabolites are associated with metabolic syndrome, hypoadiponectinemia, insulin resistance and β cell dysfunction. *Steroids*. 2011; 76:1575-81.
- Beilin L, Huang R-C. Childhood obesity, hypertension, the metabolic syndrome and adult cardiovascular disease. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2008; 35:409-11.
- Bernardis L. L., Bellinger L. L. The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 1993; 17:141-193.
- Björntorp P, Rosmond R: Obesity and cortisol. *Nutrition*. 2000; 16:924–936.

Blaak EE, Van Baak MA, Kemerink GJ, Pakbiers MT, Heidendal GA, Saris WH. beta-Adrenergic stimulation of skeletal muscle metabolism in relation to weight reduction in obese men. *The American journal of physiology*. 1994; 267: E316–22.

Bobrovskaya L., Cheah T. B., Bunn S. J. and Dunkley P. R. Tyrosine hydroxylase in bovine adrenal chromaffin cells: angiotensin II-stimulated activity and phosphorylation of Ser19, Ser31, and Ser40. *Journal of neurochemistry*. 1998; 70, 2565–2573.

Bobrovskaya L., Odell A., Leal R. B. and Dunkley P. R. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells: the role of MAPKs after angiotensin II stimulation. *Journal of neurochemistry*. 2001; 78, 490–498.

Bollen, M., Keppens, S., & Stalmans, W. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *The Biochemical journal*. 1998; 336:19–31.

Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Pazos-Moura CC, Reis AM, Moura EG. Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Hormone and metabolic research*. 2005; 37:220–225.

Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *The Journal of endocrinology*. 2007; 192:339-44.

Bouanane S, Merzouk H, Benkalfat NB, Soulimane N, Merzouk SA, Gresti J et al., Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. *Metabolism*. 2010; 59:1701-9.

Bougneres P, Stunff CL, Pecqueur C, Pinglier E, Adnot P, Ricquier D. In vivo resistance of lipolysis to epinephrine. A new feature of childhood onset obesity. *The Journal of clinical investigation*. 1997; 99:2568–73.

Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. 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*. 2005; 54:197-203.

Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*. 2004; 304:108-10.

Bouret SG, Simerly RB. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. *Clinical genetics*. 2006; 70:295-301.

Bouret SG. Development of hypothalamic neural networks controlling appetite. *Forum of nutrition*. 2010; 63:84-93.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*. 1976; 72:248–25.

Brasaemle DL, Subramanian V, Garcia A, Marcinkiewicz A, Rothenberg A: Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism. *Molecular Cell Biochemistry*. 2009; 326:15-21.

Bray GA, Fisler J, York DA. Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front Neuroendocrinol*. 1990; 11:128-181.

Bujalska IJ, Kumar S, Hewison M, Stewart PM. Differentiation of adipose stromal cells: the roles of glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*. 1999; 140:3188-96.

Campbell JE, Peckett AJ, D'souza AM, Hawke TJ, Riddell MC. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *American journal of physiology*. 2011; 300:C198-209.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annual review of physiology*. 2005; 67: 259–284.

Choudhury, M. & Friedman, J. E. Childhood obesity - methylate now, pay later? *Nature reviews. Endocrinology*. 2011; 7:439–440.

Collins S, Daniel KW, Rohlfes EM. Depressed expression of adipocyte beta-adrenergic receptors is a common feature of congenital and diet-induced obesity in rodents. *International journal of obesity and related metabolic disorders*. 1999; 23:669-77.

Conceição EP, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento-Saba CC et al., Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Hormone and metabolic research*. 2011; 43:513–516.

Cooper MS & Stewart PM. 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009; 94:4645-54.

Corbitt J, Vivekananda J, Wang SS, Strong R. Transcriptional and posttranscriptional control of tyrosine hydroxylase gene expression during persistent stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors on PC12 cells: regulation by protein kinase A-dependent and protein kinase A-independent pathways. *Journal of neurochemistry*. 1998; 7:478–486.

Cummings DE, Frayo RS, Marmonier C, Aubert R, Chapelot D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *American journal of physiology*. 2004; 287: E297–304.

Cunha AC, Pereira RO, Pereira MJ, Soares Vde M, Martins MR, Teixeira MT et al., Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2009; 20:435-42.

Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain, behavior, and immunity*. 2005; 19:275-80.

Davidowa H & Plagemann A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. *Neuroreport*. 2001; 12:3201–3204.

Davidowa H and Plagemann A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. *Neuroreport*, 2000; 11: 2795–2798.

Davidowa H, Li Y, Plagemann A. Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. *The European journal of neuroscience*. 2003; 18:613–621.

Davidowa H, Li Y, Plagemann A. Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. *Regulatory peptides*. 2002; 108:103–111.

Davy KP, Hall JE. Obesity and hypertension: two epidemics or one? *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004; 286:R803-13.

Daza FJ, Parrilla R, Martín-Requero A. Influence of thyroid status on hepatic alpha 1-adrenoreceptor responsiveness. *The American journal of physiology*. 1997; 273:E1065-72.

de Assis MAA, Rolland-Cachera MF, Grosseman S, de Vasconcelos FAG, Luna MEP, Calvo MCM et al., Obesity, overweight and thinness in schoolchildren of the city of Florianópolis, Southern Brazil. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2005; 59: 1015 – 1021.

de Diego AM, Gandía L, García AG. A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiology (Oxf)*. 2008; 192:287-301.

de Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM et al., Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *The Journal of physiology*. 2009; 587:4919-29.

de Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation - role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15:176-88.

de Oliveira Cravo C, Teixeira CV, Passos MC, Dutra SC, de Moura EG, Ramos C. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Hormone and metabolic research*. 2002; 34:400-5.

Dietz WH. Critical periods in childhood for the development of obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 1994; 59:955–9.

Dóda, M. “Role of different subtypes of adrenoceptors in pressor responses to catecholamines released from sympathetic nerve endings,” *Brain Research Bulletin*. 1996; 42: 51–57.

Dos Santos MP, de França SA, Dos Santos JT, Buzelle SL, Bertolini GL, Garófalo MA et al., A low-protein, high-carbohydrate diet increases fatty acid uptake and reduces norepinephrine-induced lipolysis in rat retroperitoneal white adipose tissue. *Lipids*. 2012; DOI 10.1007/s11745-011-3648-8.

Douglas WW & Poisner AM. On the mode of action of acetylcholine in evoking adrenal medullary secretion: increased uptake of calcium during the secretory response. *Journal Physiology*. 1962; 162: 385–392.

Douglas WW & Poisner AM. Stimulation of uptake of calcium-45 in the adrenal gland by acetylcholine. *Nature*. 1961; 192:1299.

Duff DA, Snell K. Effect of altered neonatal nutrition on the development of enzymes of lipid and carbohydrate metabolism in the rat. *Journal Nutrition*. 1982; 112:1057-66.

Dutra SC, Moura EG, Rodrigues AL, Lisboa PC, Bonomo I, Toste FP et al., Cold exposure restores the decrease in leptin receptors (OB-Rb) caused by neonatal leptin treatment in 30-day-old rats. *The Journal of endocrinology*. 2007; 195:351-8.

Edgerton DS, Basu R, Ramnanan CJ, Farmer TD, Neal D, Scott M et al., Effect of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 inhibition on hepatic glucose metabolism in the conscious dog. *The American journal of physiology Endocrinology and Metabolism*. 2010; 298:E1019-26.

Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos Jr MC, Londos C. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992; 89:8537–41.

Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *The American journal of physiology*. 1991; 260:R328–R334.

Enoksson S, Talbot M, Rife F, Tamborlane WV, Sherwin RS, Caprio S. Impaired in vivo stimulation of lipolysis in adipose tissue by selective beta2-adrenergic agonist in obese adolescent girls. *Diabetes*. 2000; 49:2149–53.

Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2001; 26:37-49.

Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT et al., Maternal low protein diet during lactation programmes the body composition and the glucose homeostasis in the adult rat offspring. *The British journal of nutrition*. 2007; 98: 922 – 928.

Feldberg W, Minz B, Tsudzimura H.. The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *Journal of physiology*. 1934; 81, 286–304.

Ferretti S, Fornari A, Pedrazzi P, Pellegrini M, Zoli M. Developmental overfeeding alters hypothalamic neuropeptide mRNA levels and response to a high-fat diet in adult mice. *Peptides*. 2011; 32:1371–1383.

Figueiredo MS, da Fonseca Passos MC, Trevenzoli IH, Troina AA, Carlos AS, Alves Nascimento-Saba CC et al., Adipocyte morphology and leptin signaling in rat offspring from mothers supplemented with flaxseed during lactation. *Nutrition*. 2012; 28:307-15.

Figueiredo MS, de Moura EG, Lisboa PC, Troina AA, Trevenzoli IH, Oliveira E et al., Flaxseed supplementation of rats during lactation changes the adiposity and glucose homeostasis of their offspring. *Life Sciences*. 2009; 85:365-71.

Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957; 226:497- 509.

Gathercole LL, Morgan SA, Bujalska IJ, Hauton D, Stewart PM, Tomlinson JW. Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. *PLoS One*. 2011; 6:e26223.

Gentile CL, Orr JS, Davy BM, Davy KP. Modest weight gain is associated with sympathetic neural activation in nonobese humans. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007; 292:R1834–8.

George SA, Khan S, Briggs H, Abelson JL. CRH-stimulated cortisol release and food intake in healthy, non-obese adults. *Psychoneuroendocrinology*. 2010; 35:607-12.

Gluckman PD, Hanson MA Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004; 305:1733–1736.

Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *Journal of internal medicine*. 2007; 261:461-71.

Gluckman PD. Editorial: nutrition, glucocorticoids, birth size, and adult disease. *Endocrinology*. 2001; 142: 1689–691.

Granneman JG, Moore HP, Granneman RL, Greenberg AS, Obin MS, Zhu Z. Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2007; 282:5726–35.

Grassi G. Sympathetic neural activity in hypertension and related diseases. *American journal of Hypertension*. 2010; 23:1052–60.

Greenfield JR, Miller JW, Keogh JM, et al. Modulation of blood pressure by central melanocortineric pathways. *The New England journal of medicine*. 2009; 360:44–52.

Grouzmann E, Fathi M, Gillet M, Torrente A D, Cavadas C, Brunner H et al., Disappearance rate of catecholamines , total metanephrines , and neuropeptide y from the plasma of patients after resection of pheochromocytoma. *Clinical chemistry*. 2001; 47:1075-82.

Habib KE, Weld KP, Rice KC, Pushkas J, Champoux M, Listwak S, et al., Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97: 6079–6084.

- Hadcock, J R and Malbon, C C. Regulation of beta-adrenergic receptors by "permissive" hormones: glucocorticoids increase steady-state levels of receptor mRNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1988; 85:8415–8419.
- Haemmerle G, Zimmermann R, Strauss JG, Schoiswohl G, Birner- Gruenberger R, Riederer M et al., Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. Science. 2004; 306:1383-1386.
- Hall JE, Hildebrandt DA, Kuo J. Obesity hypertension: Role of leptin and sympathetic nervous system. American journal of hypertension. 2001; 14: 103S– 15S.
- Heggeness FW, Diliberto J, and DiStefano V. Effect of growth velocity on cardiac norepinephrine content in infant rats. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1970; 133: 1413–1416.
- Heiman, M. L., Ahima, R. S., Craft, L. S., Schonert, B., Stephens, T W. and Flier J. S. Leptin Inhibition of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Response to Stress. Endocrinology. 1997; 138: 3859– 3863.
- Hodel A Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. Journal of neuroendocrinology, 2001; 13:216–220,.
- Hodis J, Kutinová-Canová N, Potmesil P, Kameníková L, Kmoníčková E, Zídek Z et al., The role of adrenergic agonists on glycogenolysis in rat hepatocyte cultures and possible involvement of NO. Physiological research. 2007; 56:419-25.
- Hoffman BB, Taylor P. Neurotransmission. In: A. Goodman, A. Gilman, J.G. Hardman & L.E. Limbird (eds) The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw- Hill, New York, 2001.
- Hogg K, Wood C, McNeilly AS, Duncan WC. The in utero programming effect of increased maternal androgens and a direct fetal intervention on liver and metabolic function in adult sheep. PLoS One. 2011; 6:e24877.
- Hosoda K, Yoshimasa Y, Nakao K. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus – Leptin-induced secretion increase in catecholamine. Diabetes. 1999; 48:1787–1793.
- Hou M, Liu Y, Zhu L, Sun B, Guo M, Burén J, Li X. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. PloS one. 2011; 6:e25726.
- International Association for the Study of Obesity & International Obesity TaskForce (2010). Obesity the Global Epidemic. Disponível em: <<http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>>. Acesso em: 06/06/2011.
- Jakobsen MU, Berentzen T, Sørensen TI, Overvad K. Abdominal obesity and fatty liver. Epidemiologic reviews. 2007; 29:77-87.

Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, Bernlohr DA. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278: 47636–43.

Jessop DS, Dallman MF, Fleming D, Lightman SL: Resistance to glucocorticoid feedback in obesity. *Journal of clinical endocrinology & metabolism*. 2001; 86:4109–4114.

Jocken JW, Goossens GH, van Hees AM, Frayn KN, van Baak M, Stegen J, et al. Effect of beta-adrenergic stimulation on whole-body and abdominal subcutaneous adipose tissue lipolysis in lean and obese men. *Diabetologia*. 2008; 51:320–7.

Jocken JWE, Blaak EE. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiology and Behavior*. 2008; 94: 219–230.

Kalil GZ, Haynes WG. Sympathetic nervous system in obesity-related hypertension: mechanisms and clinical implications. *Hypertension research*. 2012; 35:4-16.

Krizanova O, Micutkova L, Jelokova J, Filipenko M, Sabban EL, Kvetnansky R. Existence of cardiac PNMT mRNA in adult rats: elevation by stress in a glucocorticoid-dependent manner. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2001; 281:1372–1379.

Kuhar M J, Couceyro P R, Lambert P D, Catecholamines, In *Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Lippincott Williams and Wilkins, 1999.

Kumer SC e Vrana KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *Journal of Neurochemistry*. 1996; 67:443–462.

Laborie C, Molendi-Coste O, Breton C, Montel V, Vandebulcke F, Grumolato L et al., Maternal perinatal undernutrition has long-term consequences on morphology, function and gene expression of the adrenal medulla in the adult male rat. *Journal of neuroendocrinology*. 2011; 23:711-24.

Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in lipid research*. 2009; 48:275–97.

Lau C, Seidler FJ, Cameron AM, Navarro HA, Bell JM, Bartolome J et al. Nutritional influences on adrenal chromaffin cell development: comparison with central neurons. *Pediatric research*. 1988; 24:583-7.

Levy-Costa RB, Sichieri R, Pontes Ndos S, Monteiro CA. Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003). *Revista de saúde pública*. 2005; 39:530-40.

Li Y, Plagemann A, Davidowa H. Increased inhibition by agouti-related peptide of ventromedial hypothalamic neurons in rats overweight due to early postnatal overfeeding. *Neuroscience letters*. 2002; 330: 33–36.

- Lima Nda S, de Moura EG, Passos MC, Nogueira Neto FJ, Reis AM, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *The British journal of nutrition*. 2011; 105:1405-13.
- Lin HV & Accili D. Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metabolism*. 2011; 14:9-19.
- Lisboa PC, Fagundes AT, Denolato AT, Oliveira E, Bonomo IT, Alves SB et al., Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats. *Experimental biology and medicine*. 2008; 233:57– 63.
- Lisboa PC, Passos MC, Dutra SC, Santos RS, Bonomo IT, Cabanelas AP et al., Increased 5²-iodothyronine deiodinase activity is a maternal adaptive mechanism in response to protein restriction during lactation. *The Journal of endocrinology*. 2003; 177: 261-7.
- Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ et al., Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. *Endocrinology*. 2000; 141:560–563.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Foundation symposium*. 1991; 156, 38–50.
- Ma Y, Nyman JS, Tao H, Moss HH, Yang X, Eleftheriou F. Beta2-adrenergic receptor signaling in osteoblasts contributes to the catabolic effect of glucocorticoids on bone. *Endocrinology*. 2011; 152:1412-22.
- Macdonald IA. Advances in our understanding of the role of the sympathetic nervous system in obesity. *International journal of obesity and related metabolic disorders*. 1995; 7:S2-S7.
- Marsh AJ, Fontes MA, Killinger S, Pawlak DB, Polson JW & Dampney RA. Cardiovascular responses evoked by leptin acting on neurons in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus. *Hypertension*. 2003; 42:488–493.
- Martins AC, Souza KL, Shio MT, Mathias PC, Lelkes PI, Garcia RM. Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. *Life sciences*. 2004; 74: 3211–3222.
- Martins MR, Vieira AK, de Souza EP, Moura AS. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *Journal of Endocrinology*. 2008; 198:591-598.
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*. 2001; 294:2166-70.
- Masuzaki H, Yamamoto H, Kenyon CJ, Elmquist JK, Morton NM, Paterson JM et al., Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 112:83-90.
- Monder C & White PC. 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitamins and hormones*. 1993; 47:187–271.

Monteiro CA, Benicio MH, Conde WL, Popkin BM. Shifting obesity trends in Brazil. *European journal of clinical nutrition*. 2000; 54:342-6.

Moore MC, Connolly CC, Cherrington AD. Autoregulation of hepatic glucose production. *European journal of Endocrinology*. 1998; 138:240-8.

Moreira AS, Teixeira M, da Silveira Osso F, Pereira RO, de Oliveira Silva-Junior G et al., Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*. 2009; 19:805-10.

Morris MJ, Hastings JA, Pavia JM. Central interactions between noradrenaline and neuropeptide Y in the rat: implications for blood pressure control. *Clinical and experimental hypertension*. 1997; 19:619–630.

Morris MJ. Cardiovascular and metabolic effects of obesity. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2008; 35:416-9.

Moura AS, Carpinelli AR, Barbosa FB, Gravena C, Mathias PC. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. *Research communications in molecular pathology and pharmacology*. 1996; 92:73-84.

Muntzel MS, Morgan DA, Mark AL, Johnson AK. Intracerebroventricular insulin produces nonuniform regional increases in sympathetic nerve activity. *American Journal of Physiology*. 1994; 267: R1350–R1355.

Nakayama S, Nishiyama M, Iwasaki Y, Shinahara M, Okada Y, Tsuda M, et al. Corticotropin-releasing hormone (CRH) transgenic mice display hyperphagia with increased agouti-related protein mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocrine journal*. 2011; 58:279-86.

Nemecz M, Preininger K, Englisch R, Fürnsinn C, Schneider B, Waldhäusl W et al., Acute effect of leptin on hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis in perfused rat liver. *Hepatology*. 1999; 29:166-72.

Ni XP, Butler AA, Cone RD, Humphreys MH. Central receptors mediating the cardiovascular actions of melanocyte stimulating hormones. *Journal of Hypertension*. 2006; 24: 2239–46.

O' Doherty RM , Anderson PR , Zhao AZ , Bornfeldt KE , Newgard CB . Spar- ing effect of leptin on liver glycogen stores in rats during the fed-to- fasted transition. *American Journal of Physiology*, 1999; 277:E544 – E550.

Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry*. 2011; 286:3177-84.

Oben JA, Mouralidarane A, Samuelsson AM, Matthews PJ, Morgan ML, McKee C, et al., Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Journal of Hepatology*. 2010; 52:913-20.

Oliveira E, Pinheiro CR, Santos-Silva AP, Trevenzoli IH, Abreu-Villaça Y, Nogueira Neto JF et al., Nicotine exposure affects mother's and pup's nutritional, biochemical, and hormonal profiles during lactation in rats. *The Journal of endocrinology*. 2010; 205:159-70.

Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*. 1969; 164:719–721.

Park YS, Ha Choi Y, Park CH, Kim KT. Nongenomic glucocorticoid effects on activity-dependent potentiation of catecholamine release in chromaffin cells. *Endocrinology*, 2008; 149:4921-7.

Passos M, Ramos CF & Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition research*. 2000; 20:1603– 1612.

Passos MC, Vicente LL, Lisboa PC, de Moura EG. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. *Hormone Metabolism Research*. 2004; 36:625– 629.

Passos MCF, Ramos CF, Mouco T, Moura EG. Increase of T3 secreted through the milk in protein restricted lactating rats. *Nutrition research*. 2001; 21: 917–924.

Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B et al., 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*. 2004; 101: 7088–7093.

Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC. The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*. 2011; 60:1500-10.

Pekary AE, Sattin A, Blood J. Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide release in rat brain and peripheral tissues by leptin. *Brain research*. 2010; 1345:9-18.

Peng YX, Shan J, Qi XY, Zhang SJ, Ma SP, Wang N et al., The catecholamine-beta-adrenoreceptor-cAMP system and prediction of cardiovascular events in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2006; 33: 227-231.

Pereira RO, Moreira AS, de Carvalho L, Moura AS. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signalling cascade in rats heart's. *Regulatory Peptides*. 2006; 136: 117-121.

Pickard MR, Leonard AJ, Ogilvie LM, Edwards PR, Evans IM, Sinha AK, Ekins RP. Maternal hypothyroidism in the rat influences placental and liver glycogen stores: fetal growth retardation near term is unrelated to maternal and placental glucose metabolic compromise. *Journal of Endocrinology*. 2003 176:247-55.

Pietiläinen KH, Rissanen A, Kaprio J, Mäkimattila S, Häkkinen AM, Westerbacka J et al., Acquired obesity is associated with increased liver fat, intra-abdominal fat, and insulin resistance in young adult monozygotic twins. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2005; 288:E768-74.

Pinheiro CR, Oliveira E, Trevenzoli IH, Manhães AC, Santos-Silva AP, Younes-Rapozo V, et al., Developmental plasticity in adrenal function and leptin production primed by nicotine exposure during lactation: gender differences in rats. *Hormone and metabolic research*. 2011; 43:693-701.

Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X et al., Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*. 2004; 304:110-5.

Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T et al., Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 1999a; 11:541–546.

Plagemann A, Heidrich I, Gotz F, Rohde W, Dörner G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Experimental and clinical endocrinology*. 1992; 99:154–158.

Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M et al., Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *Journal of perinatal medicine*. 2010; 38:393-400.

Plagemann A, Harder T, Janert U, Rake A, Rittel F, Rohde W & Dörner G. Malformations of hypothalamic nuclei in hyperinsulinemic offspring of rats with gestational diabetes. *Developmental neuroscience*. 1999b; 21:58–67.

Plagemann A. “Fetal programming” and “functional teratogenesis”: on epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. *Journal of perinatal medicine*. 2004; 32:297-305.

Plotsky PM, Cunningham Jr ET, Widmaier EP. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology Review*. 1989; 10:437–458.

Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX et al., Obesity and cardiovascular disease: Pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: An update of the American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*. 2006; 113:898-918.

Raddatz D, Ramadori G. Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from physiology and disease. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2007; 45:51-62.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 6ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2004. p. 185.

Ravelli GP, Stein Z, Susser M: Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *The New England journal of medicine*. 1976; 295:349–353.

Rayner DV, Trayhurn P. Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions. *Journal of Molecular Medicine*. 2001; 79:8-20.

Reilly JJ, Kelly J. Long-term impact of overweight and obesity in childhood and adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *International Journal of Obesity (Lond)*. 2011; 35:891-8.

Rinaldi W, Gomes RM, Dias MJ, Marques AS, Scomparin DX, Martins AG et al., Glycemic control is impaired in obese rats from small litters. *Endocrinologia & Diabetes Clínica e Experimental*. 2008; 8:911-914,.

Rödel HG, Meyer S, Prager G, Stefanski V, Hudson R. Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats. *Physiology & behavior*. 2010; 99:644-50.

Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Trevenzoli IH, da Conceição EP, Bonono IT et al., Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2011; 22:109-17.

Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MCF, Dutra SCP, Lisboa PC. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *The Journal of physiology*. 2009; 587: 2647–2661.

Rodrigues AL, De Souza EP, Da Silva SV, Rodrigues DS, Nascimento AB, Barja-Fidalgo C, et al., Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *The Journal of endocrinology*. 2007; 195: 485–494.

Rumantir MS, Vaz M, Jennings GL et al. Neural mechanisms in human obesity-related hypertension. *Journal of Hypertension*. 1999; 17: 1125–33.

Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al., Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279:32345–32353.

Santos-Silva AP, Moura EG, Pinheiro CR, Rios AS, Abreu-Villaça Y, Passos MC, et al., Neonatal nicotine exposure alters leptin signaling in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the late postnatal period and adulthood in rats. *Life sciences*. 2010; 87:187-95.

Scheurink a J, Balkan B, Strubbe JH, van Dijk G, Steffens a B. Overfeeding, autonomic regulation and metabolic consequences. *Cardiovascular drugs and therapy*. 1996; 1:263-73.

Schiffelers SL, Akkermans JA, Saris WH, Blaak EE. Lipolytic and nutritive blood flow response to beta-adrenoceptor stimulation in situ in subcutaneous abdominal adipose tissue in obese men. *International journal of obesity and related metabolic disorders*. 2003; 27:227–31.

Seckl JR, Morton NM, Chapman KE, Walker BR. Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent progress in hormone research*. 2004; 59:359-93.

Shah NS, Lila A. Childhood Cushing disease: a challenge in diagnosis and management. *Hormone research in pediatrics*. 2011; 76:65-70.

Sierra-Johnson J, Romero-Corral A, Lopez-Jimenez F, Gami AS, Sert Kuniyoshi FH, Wolk R et al., Relation of increased leptin concentrations to history of myocardial infarction and stroke in the United States population. *The American journal of cardiology*. 2007; 100: 234–9.

Slyper AH. The pediatric obesity epidemic: causes and controversies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004; 89:2540–2547.

Smith BW, Adams LA. Não-alcoólicas doença do fígado gorduroso. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2011; 48:97-113.

Soares VM, Garcia-Souza EP, Lacerda-Miranda G, Moura AS. Early life overfeeding decreases acylated ghrelin circulating levels and upregulates GHSR1a signaling pathway in white adipose tissue of obese young mice. *Regulatory peptides*. 2012; 174:6-11.

Son GH, Chung S, Kim K. The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system. *Front Neuroendocrinology*. 2011; 32:451-65.

Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet. *The British journal of nutrition*. 2007; 98:1159-69.

Spencer SJ & Tilbrook A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34:1133-43.

Spraul M, Ravussin E, Fontvieille AM, Rising R, Larson DE, Anderson EA. Reduced sympathetic nervous activity. A potential mechanism predisposing to body weight gain. *Journal of Clinical Investigation*. 1993; 92:1730–1735.

Stanner SA, Bulmer K, Andrès C, Lantseva OE, Borodina V, Poteen VV et al., Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *British medical journal*. 1997; 315:1342-8.

Stewart PM, Krozowski, ZS. 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitamine and Hormones*. 1999; 57: 249–324.

Stimson RH, Andersson J, Andrew R, Redhead DN, Karpe F, Hayes PC et al., Cortisol release from adipose tissue by 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in humans. *Diabetes*. 2009; 58:46–53.

Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N et al., Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nature structural & molecular biology*. 2009; 16:564-571.

Symonds ME, Sebert SP, Hyatt MA, Budge H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. *Nature reviews. Endocrinology*. 2009; 5:604–10.

Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y. Effects of ventromedial hypothalamus stimulation on glycogenolysis in rat liver using in vivo microdialysis. *Metabolism*. 1997; 46:897-901.

Takekoshi K, Motooka M, Isobe K, Nomura F, Manmoku T, Ishii K et al., Leptin directly stimulates catecholamine secretion and synthesis in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999; 261:426-31.

Teff KL. Visceral nerves: vagal and sympathetic innervations. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2008; 32:569–571.

Tentolouris T, Argyrakopoulou G, Katsilambros N. Perturbed autonomic nervous system function in metabolic syndrome. *Neuro Molecular Medicine*. 2008; 10:169–178.

Thompson NM, Norman AM, Donkin SS, Shankar RR, Vickers MH, Miles JL et al., Prenatal and postnatal pathways to obesity: different underlying mechanisms, different metabolic outcomes. *Endocrinology*. 2007; 148: 2345–2354.

Tomlinson JW, Finney J, Gay C, Hughes BA, Hughes SV, Stewart PM. Impaired glucose tolerance and insulin resistance are associated with increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and elevated hepatic 5alpha-reductase activity. *Diabetes*. 2008; 57: 2652–2660.

Torrecilla E, Fernández-Vázquez G, Vicent D, Sánchez-Franco F, Barabash A, Cabrerizo L et al., Liver upregulation of genes involved in cortisol production and action is associated with metabolic syndrome in morbidly obese patients. *Obesity surgery*, 2011; DOI 10.1007/s11695-011-0524- 9.

Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, Fagundes AT, de Oliveira E, Passos MC. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *The British journal of nutrition*. 2006; 95:830-7.

Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. *Biochemistry and Biophysics Acta*. 2010; 1801:299-310.

Trevenzoli IH, Pinheiro CR, Conceição EP, Oliveira E, Passos MC, Lisboa PC et al., . Programming of rat adrenal medulla by neonatal hyperleptinemia: adrenal morphology, catecholamine secretion, and leptin signaling pathway. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2010a; 298:E941-92010.

Trevenzoli IH, Rodrigues AL, Oliveira E, Thole AA, Carvalho L, Figueiredo MS et al., Leptin treatment during lactation programs leptin synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats. *Hormone and metabolic research*. 2010b; 42:483-90.

Trevenzoli IH, Valle MMR, Machado FB, Garcia RMG, Passos MCF, Lisboa PC et al., Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *The Journal of physiology*. 2007; 580:629-37.

Troina AA, Figueiredo MS, Moura EG, Boaventura GT, Soares LL, Cardozo LF et al., Maternal flaxseed diet during lactation alters milk composition and programs the offspring body composition, lipid profile and sexual function. *Food Chemistry Toxicology*. 2010; 48:697-703.

Velkoska E, Cole TJ, Morris MJ. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *The American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*. 2005; 288:E1236-43.

Velloso LA. The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*. 2006; 50:165-76.

Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A et al., The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy. *Endocrinology*. 2008; 149:1906-13.

Villanueva EC, Myers MG Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *The International Journal of Obesity (London)*. 2008; 32:S8-12.

Walker BR. Extra-adrenal regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: physiological regulator and pharmacological target for energy partitioning. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2007; 66:1-8.

Wang SP, Laurin N, Himms-Hagen J, Rudnicki MA, Levy E, Robert MF et al., The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obesity Research*. 2001; 9:119-128.

Westerbacka J, Yki-Järvinen H, Vehkavaara S, Häkkinen AM, Andrew R, Wake DJ et al., Body fat distribution and cortisol metabolism in healthy men: enhanced 5beta-reductase and lower cortisol/cortisone metabolite ratios in men with fatty liver. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003; 88: 4924-4931.

World Health Organization (2007). Fact sheet: Obesity and overweight. Disponível em: <<http://www.who.int/hpr/gf/fs.obesity.shtml>>. Acesso em: 12/12/2011.

World Health Organization (2008a). Obesity and overweight. Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en/print/html>>. Acesso em: 10/10/2011.

World Health Organization (2008b). Waist Circumference and Waist-Hip Ratio Report of a WHO Expert Consultation GENEVA. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501491_eng.pdf>. Acesso em: 08/02/2012.

Xiao XQ, Williams SM, Grayson BE, Glavas MM, Cowley MA, Smith MS et al., Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. *Endocrinology*. 2007; 148:4150-9.

- Xu KZ, Zhu C, Kim MS, Yamahara J, Li Y. Pomegranate flower ameliorates fatty liver in an animal model of type 2 diabetes and obesity. *Journal of ethnopharmacology*. 2009; 22:123(2):280-7.
- Xu XF, Björntorp P. The effects of steroid hormones on adipocyte development. *International journal of obesity*. 1990; 14:159-63.
- Young JB, Landsberg L. Impaired suppression of sympathetic activity during fasting in the gold thioglucose-treated mouse. *The Journal of clinical investigation*. 1980; 65:1086–1094.
- Young JB, Macdonald IA. Sympathoadrenal activity in human obesity: heterogeneity of findings since 1980. *International journal of obesity and related metabolic disorders*. 1992; 16:959-67.
- Young JB, Saville E, Rothwell NJ, Stock MJ, Landsberg L. Effect of diet and cold exposure on norepinephrine turnover in brown adipose tissue in the rat. *The Journal of clinical investigation*. 1982; 69:1061–1071.
- Young JB. Effects of litter size on sympathetic activity in young adult rats. *American journal of physiology*. 2002; 82:R1113-21.
- Young JB. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2000; 279:R1745-52.
- Young, J B. “Developmental origins of obesity: a sympathoadrenal perspective,” *International Journal of Obesity*. 2006; 30:S41–S49.
- Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K et al., Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell metabolism*. 2005; 1:371-8.
- Zhang Y, Kerman IA, Laque A, Nguyen P, Faouzi M, Louis GW et al., Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *The Journal of neuroscience*. 2011; 31:1873-84.

APÊNDICE - Developmental plasticity in adrenal function and liver tissue primed by neonatal overfeeding in rats

DEVELOPMENTAL PLASTICITY IN ADRENAL FUNCTION AND LIVER TISSUE PRIMED BY NEONATAL OVERFEEDING IN RATS

Manuscript submitted for review to Journal of Endocrinology



DEVELOPMENTAL PLASTICITY IN ADRENAL FUNCTION AND LIVER TISSUE PRIMED BY NEONATAL OVERFEEDING IN RATS

Journal:	<i>Journal of Endocrinology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Conceição, Ellen; State University of Rio de Janeiro, Physiological Sciences Moura, Egberto; State University of Rio de Janeiro, Department of Physiological Sciences Trevenzoli, Isis; Federal University of Rio de Janeiro, Biophysics Institute Peixoto-Silva, Nayara; State University of Rio de Janeiro, Department of Physiological Sciences Pinheiro, Cintia; State University of Rio de Janeiro, Department of Physiological Sciences Franco, Juliana; State University of Rio de Janeiro, Department of Physiological Sciences Younes-Rapozo, Viviane; State University of Rio de Janeiro, Department of Physiological Sciences de Oliveira, Elaine; State University of Rio de Janeiro, Department of Physiological Sciences Lisboa, Patricia; State University of Rio de Janeiro, Physiology Sciences
Keywords:	catecholamine, corticosterone, adrenergic receptor , Glycoqen, Rat

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **DEVELOPMENTAL PLASTICITY IN ADRENAL FUNCTION AND LIVER TISSUE**
2 **PRIMED BY NEONATAL OVERFEEDING IN RATS**

3 ¹Conceição EPS; ¹Moura EG; ²Trevenzoli IH, ¹Peixoto-Silva N; ¹Pinheiro CR; ¹Franco JG; ¹Younes-
4 Rapozo V; ¹Oliveira E; ¹Lisboa PC.

5

6 ¹Laboratory of Endocrine Physiology, Roberto Alcantara Gomes Biology Institute, State University
7 of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

8 ²Laboratory of Molecular Endocrinology, Carlos Chagas Filho Biophysics Institute, Federal
9 University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

10

11 Corresponding author:

12 Dr. Patricia Cristina Lisboa

13 Departamento de Ciências Fisiológicas – 5th floor

14 Instituto de Biologia - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

15 Av. 28 de setembro, 87- Rio de Janeiro, RJ, 20551-030 – Brazil

16 Phone: (5521) 28688334, FAX: (5521) 28688029

17 e-mail: pclisboa@uerj.br or patricialisboa@pq.cnpq.br

18

19 Short title: neonatal overfeeding programs of adrenal medullary

20 Key words: catecholamine, corticosterone, adrenergic receptor, glycogen, rat.

1 **Abstract**

2 Nutritional and hormonal status at early phases of development are related to epigenetic changes,
3 promoting disease development. Childhood overweight is related with late obesity, insulin resistance
4 and higher cardiometabolic risk. Rats overfed during lactation show higher visceral adiposity,
5 hyperphagia, leptin resistance and hypertension in adulthood. Previously, we demonstrated that
6 neonatal hyperleptinemia is associated with adrenal medullary hyperfunction and liver steatosis at
7 adulthood. Here, we evaluated the adrenal function and liver tissue of adult obese rats that were
8 overfed during lactation. To induce early overfeeding, the litter size was reduced from ten to three
9 male pups at the third day of lactation until weaning (SL). Control group had ten rats per litter (NL).
10 After weaning, rats had free access to standard diet and water until 180 days old (1 animal from each
11 litter, n=7). Significant differences had $p < 0.05$. The SL group presented higher adrenal
12 catecholamine content (absolute: +35% and relative: +40%), tyrosine hydroxylase (+31%), DOPA
13 decarboxylase (+90%) protein contents, basal and caffeine-induced catecholamine *in vitro* secretion
14 (+35% and +43%, respectively). However, hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal cortex
15 axis were unchanged. The β_3 -adrenergic receptor content in visceral adipose tissue was unchanged in
16 SL rats, but the β_2 -adrenergic receptor in the liver was lower (-45%). SL group showed higher
17 glycogen and triglycerides contents in liver (+79% and +49%, respectively), which showed
18 microsteatosis. Although the neonatal overfeeding leads to higher adrenomedullary function, adult
19 obese SL rats have a dysfunction in hepatic β_2 -adrenergic receptor, which can contribute for the
20 hepatic dysfunction characteristic of liver obesity complications.

21

22

23

24

1 Introduction

2 Epidemiological studies have demonstrated an increased prevalence of obesity in many
3 countries in all age groups (Formiguera and Canton, 2004). The obesity is related with increased
4 incidence of co-morbidities, such as hypertension, dyslipidemia, type II diabetes and nonalcoholic fat
5 liver disease (NAFLD) and muscle steatosis (Zelber-Sagi zelv *et al.*, 2011). Clinical, epidemiological
6 and experimental studies show that childhood obesity is associated with early nutritional status and
7 long-term consequences upon energy balance, feeding behavior and body composition (Barker,
8 2004; de Moura *et al.*, 2008). First this phenomenon was named as programming however nowadays
9 it has been called developmental plasticity, due its more probabilistic than deterministic nature
10 (Gluckman and Hanson, 2007).

11 Overnutrition in rats may be induced by reducing litter size and it causes increase of body fat
12 content, triglycerides, insulin, leptin and glucose serum levels at weaning (Plagemann *et al.*, 1999;
13 Rodrigues *et al.*, 2009). Moreover, the early overfed rats present structural and functional
14 hypothalamic changes (Plagemann *et al.*, 1999a; Rodrigues *et al.*, 2011; Ferretti *et al.*, 2011). In this
15 model, it was showed the increased number of hypothalamic immunopositive neurons to NPY and
16 galanin (Plagemann *et al.*, 1999a; 1999b) and leptin and insulin resistance to the anorexigenic effect
17 (Davidowa and Plagemann, 2000; Davidowa and Plagemann, 2001, Rodrigues *et al.* 2011). These
18 changes may have an important role during the organ and system development involved in food
19 intake and body weight regulation, and may contribute to a higher risk of diseases related to obesity
20 at adulthood (Reilly and Kelly, 2011).

21 Early overfed rats had hyperleptinemia at weaning (Rodrigues *et al.*, 2011) and in our model
22 of experimental neonatal hyperleptinemia, we suggest that the increased level of leptin during this
23 developmental plasticity window is an important stimulator of adrenal sympathetic function, which
24 persist through adulthood. Also, in this programming model, we showed hypertension,
25 hypertriglyceridemia and microsteatosis (Trevanzoli *et al.*, 2007; Trevanzoli *et al.*, 2010b).

1 However, in the early overfeeding model it was demonstrated in adult rats, a lower sympathetic
2 activity stimulated by dietary sucrose in heart and lower sympathetic activity in brown adipose
3 tissue, contributing to reduction of thermogenesis and energy expenditure, which explain, at least in
4 part, the obese phenotype (Young, 2002). Thus, the autonomic function that is involved in the
5 regulation of glucose and lipid metabolism may also be affected by early overnutrition, contributing
6 to late metabolic disorders, such as obesity, insulin resistance and hypertension at adulthood
7 (Plageman *et al.*, 1992; Peng *et al.*, 2006).

8 It is well known that adrenal catecholamines are involved in energetic homeostasis
9 (Nonogaki, 2000). It promotes a global catabolic response, increasing the liver glucose release and
10 lipolysis. Catecholamines bind to β_2 and β_3 adrenergic receptors at hepatocytes and adipocytes,
11 respectively (Blaak *et al.*, 1993) In the liver, this activates glycogen phosphorylase and glucose-6-
12 phosphatase resulting in glycogen breakdown (Yorek *et al.*, 1980). In adipocytes, catecholamines
13 induce the hormone sensitive lipase (HSL) activation, which hydrolyzes triglycerides (Djouder *et al.*,
14 2010).

15 It has been shown that glucocorticoids (GC) may influence fat and glucose depots affecting
16 adipogenesis, lipogenesis/lipolysis as well as glycogenesis/neoglycogenesis (Campbell *et al.*, 2011).
17 Furthermore, GC are involved in chromaffin cell differentiation and upregulate the
18 phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) expression, increasing the conversion of
19 norepinephrine to epinephrine (Ross *et al.*, 1990). Also, CG increases liver catecholamine sensitivity,
20 through stimulation of the β_2 adrenergic receptors mRNA expression (Comett *et al.*, 1998).

21 There are some reports that suggest an alteration of the hypothalamic-pituitary-adrenal cortex
22 (HPA) axis associated with obesity and metabolic disorders (Pasquali *et al.*, 1993; Mastorakos &
23 Zapanti, 2004). Concerning early overfeeding model, it was demonstrated that overfed rats had an
24 anticipation of maturation of the HPA axis and higher serum ACTH and corticosterone at weaning
25 (Boullu-Ciocca *et al.*, 2005). When adult, females that were early overfed showed increased HPA

1 response to immobilization stress while males had normal response (Spencer and Tilbrook, 2009).
2 Thus, it is possible that a HPA axis dysfunction could be obesogenic in early overfed rats.

3 The aim of this study was to evaluate the influence of early overfeeding on adrenal function
4 and its contribution to energetic homeostasis, especially in liver tissue, at adulthood. Here we
5 measured the hormonal status of the HPA axis (tissue CRH-ACTH and serum ACTH-
6 corticosterone), the adrenal catecholamine, the medullary *in vitro* catecholamine release and the
7 catecholamine synthesizing enzymes content in adrenal glands. We also evaluated the sensitivity to
8 catecholamines through quantification of $\beta 2$ and $\beta 3$ adrenergic receptors content (ADRB2 e
9 ADRB3) in liver and adipocyte, glycogen and triglycerides liver storages as well as morphological
10 liver analyses in adult animals raised in small litter.

11 **Materials and Methods**

12 **Experimental model**

13 The use of the animals according to our experimental design was approved by the Animal
14 Care and Use Committee of the Biology Institute of the State University of Rio de Janeiro
15 (CEUA/184/2007; CEUA/006/2009). Wistar rats were housed in a temperature-controlled room ($25 \pm$
16 1°C) with artificial dark–light cycles (lights on at 07:00h, lights off at 19:00h). Adult virgin female
17 rats were caged with male rats. After mating, each female was placed in an individual cage with free
18 access to water and food until delivery. To induce postnatal early overfeeding, 3 days after birth the
19 litter size was adjusted to 3 male pups per litter (group SL) (Plagemann *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*,
20 2009). Litters containing 10 rats per dam were used as controls (group NL). The animals analyzed in
21 this study were from 7 litters per group. After weaning, groups had free access to water and a
22 standard diet. Body weight gain was daily monitored during lactation. From weaning until the
23 postnatal day 180 (PN 180), body weight and food intake (g/100g BW) were monitored every 4 days.
24 One rat from each litter was killed in PN 180 by rapid decapitation. Blood samples, adrenal glands,

1 visceral adipose tissue (VAT) and liver samples were collected and stored at - 20°C until the
2 experiments. Left adrenal glands were collected for *in vitro* assay using isolated freshly medullae as
3 described below. The ratio of liver mass/tibia length was estimated by the Scherle method (Scherle,
4 1970). The hydrostatic livers weights were normalized by the right tibia length, from the condyles to
5 the tip of the medial malleolus.

6 Hormone measurements

7 Blood samples were centrifuged (1,000xg, 4°C for 20 min), and the serum was kept
8 separately at -20°C. The total serum corticosterone was measured using a specific commercial
9 radioimmunoassay kit for rats (ICN Biomedicals Inc., Cleveland, OH, USA) with an assay
10 sensitivity of 50 ng/mL and an intra assay variation coefficient of 7%. The serum ACTH
11 concentration was determined using enzyme immunoassay kit for rats according to manufacturer
12 instructions (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, USA) with range of detection from 0
13 to 25 ng/ml and intra assay variation of 2,05%.

14 Immunohistochemistry

15 The corticotrophin-releasing hormone (CRH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) were
16 analyzed by immunohistochemistry. Rats (5 animals per group from different litters) were
17 anaesthetized with avertin^(R) (0.3 mg/kg i.p.) and submitted to intracardial perfusion with 0.9% saline
18 solution followed by 4% paraformaldehyde in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) and then by 4%
19 paraformaldehyde plus 10% sucrose for cryoprotection. Tissues were immersed in 100mM
20 phosphate buffer containing 20% sucrose overnight at 4°C. Hypothalamus and pituitary were
21 sectioned at 20 µm on a cryotome at -20°C and collected in gelatinized slides. Hypothalamus
22 sections containing the paraventricular nucleus were collected according to Paxinos and Watson
23 (1998), starting from Bregma -1.88mm.

1 For immunostaining, sections were treated with a 0.3% PBS-Triton X-100 solution, followed
2 by incubation with the blocking solution Image-iT(R) FX signal enhancer (Invitrogen, Grand Island,
3 NY, USA) for 30 min at room temperature. Hypothalamus sections were incubated with anti-CRH
4 (rabbit polyclonal antibody, diluted 1:100 from Abcam Inc., MA, USA), and pituitaries were
5 incubated with anti-ACTH (mouse monoclonal antibody, diluted 1:100 from Santa Cruz
6 Biotechnology Inc.; CA, USA) overnight at 4°C. Immunoreaction was visualized by incubation with
7 the appropriated secondary antibody for 1 h at room temperature: donkey anti-rabbit conjugated with
8 Alexa Fluor 488 or donkey anti-mouse conjugated with Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Grand Island,
9 NY, USA). In control procedures, omission of the primary antibodies with inclusion of the secondary
10 antibody produced no labeling. After rinses with PBS, sections were counterstained with DAPI
11 (Sigma, St. Louis, MO, USA – diluted 1:5.000). Slides were rinsed and mounted in ProLong Gold
12 anti-fading reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA).

13 Image capturing was performed with a Microscope Confocal LSM 510 META (Carl Zeiss Inc.,
14 Jena, Germany). For quantification procedures we used captured images of four slices per animal. In
15 hypothalamus sections, we analysed the paraventricular nucleus (PVN), in the parvocellular region.
16 We used the antero-posterior coordinates from Paxinos and Watson Atlas (1998) as guides to select
17 the appropriate histological sections and equated the levels of hypothalamus in both groups.

18 We quantified the number of pixels labeled by anti-CRH antibody, since this antibody labels
19 specially neuron fibers. For this, we used the Image-Pro Plus (version 4.5; Media Cybernetic, Inc,
20 Silver Spring, MD, USA), in which the segmentation tool was used in order to better differentiate the
21 background from CRH staining of the fibers. The program create a new mask, in gray-scale image
22 (brighter pixels indicating stronger labelling), in which is calculated the average pixel intensity.
23 Since the cut-off point was selected by the experimenter, we decided to repeat this procedure three
24 times and the average results were used as the datum.

1 For ACTH quantification in pituitary, images from two fields of each pituitary (four slices per
2 animal) were captured. The positive cells labeled by ACTH antibody were counted and images were
3 counterstained with DAPI. Anti-ACTH antibody labels the perinuclear region, so individual cells can
4 be easily identified with this labelling.

5 Adrenal catecholamine quantification

6 The total catecholamines (epinephrine and norepinephrine) were quantified by the
7 trihydroxyindole method (Trevenzoli *et al.*, 2010a; Oliveira *et al.*, 2010). Right adrenal glands were
8 homogenized in 10% acetic acid and centrifuged (1,120xg, 5 min) and supernatants were kept frozen
9 for later analysis. We used 50 μ L of the supernatant to quantify catecholamine concentration.
10 Epinephrine was used as the standard. Briefly, 50 μ L of the standard and the supernatant were mixed
11 with 250 μ L of 0.5 M buffer phosphate, pH 7.0, and 25 μ L of 0.5% potassium ferricyanate, followed
12 by incubation (20 min; ice bath). The reaction was stopped with 500 μ L of 60 mg/ml ascorbic acid/
13 5N NaOH (1:19 proportion), after which the samples were diluted with 2 mL of water. The
14 parameters used in the fluorometer (Victor³; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) were 420 nm to
15 excitation and 510 nm to emission.

16 In vitro Catecholamine release assay

17 The experiment was performed in culture cell plates (96 wells) at 25°C as previously
18 described (Trevenzoli *et al.*, 2010a). After sacrifice, left adrenal glands were immediately collected
19 and weighed; adrenal medullae were dissected out and maintained in standard Krebs-HEPES
20 solution, pH 7.2, for 1 h. This solution contained (in mM): 154.26 Cl⁻, 143.4 Na⁺, 2.5 Ca²⁺, 1.18
21 Mg²⁺, 1.2 SO₄²⁻, 5.9 K⁺, 25 HEPES, 0.5% BSA and glucose (85 mg/dL). Medullae were incubated
22 for 5 min in 200 μ l of Krebs solution to evaluate basal secretion. Next, medullae were stimulated by
23 25 μ M caffeine for 5 min (200 μ L/well; Preprotech, Rocky Hill, NJ, USA). To maintain the same
24 osmolarity of the standard Krebs-Hepes solution, an equivalent concentration of Na⁺ (25mM) was

1 removed from the solution containing caffeine. Then we added 20 μ L of concentrated acetic acid in
2 the wells for improved catecholamine conservation. Medium aliquots were collected and kept at -
3 20°C until catecholamine measurement by fluorimetry.

4 Western blotting analysis

5 Left adrenal glands were homogenized in 1 mL phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 μ
6 protease inhibitor cocktail (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA-free, Santa Cruz
7 Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and centrifuged (13,000 rpm, 4°C for 5 min). VAT samples
8 (100mg) were homogenized in 700 μ L lyses buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM NaF, 150 mM, 5 mM
9 and 0.1% SDS, pH 7.4) with inhibitors cocktail and centrifuged (13,000 rpm, 4°C for 25 min).
10 Samples of hypothalamus and pituitary gland were homogenized on the lyses buffer (50 mM
11 HEPES, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, Triton X-100 1%, pH 6.4) containing protease inhibitors
12 cocktail and centrifuged (13,000 rpm, 4°C for 25 min). Protein concentration was determined using
13 the BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Inc., Barrington, IL, USA), and samples were
14 denatured in the sample buffer (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10%
15 glycerol, and 0.001% bromophenol blue) and heated at 95 °C for 5 min.

16 The samples were analyzed by the SDS-PAGE method. Homogenates were carried on 10%
17 polyacrylamide gel with 10 μ g of total proteins in each slot of gel, and electroblotted in a
18 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Membranes were
19 incubated with TBS containing 2% of albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 90 min.
20 Next, membranes were washed with TBS and incubated overnight with the following primary
21 antibodies: anti-CRH (1:100) in the hypothalamus; anti-ACTH (1:100) in the pituitary gland; anti-
22 TH, anti-DOPA decarboxylase, anti-D β H, anti-PNMT (both at 1:1.000) in the adrenal gland; anti-
23 ADRB3 (1:1.000) in the TAB; anti-ADRB2 (1:1.000) in the liver, and anti- β actin (1:100) in all
24 tissues. Furthermore, membranes were washed and incubated with appropriate secondary antibodies

1 conjugated to biotin for 1 h. Membranes were washed and incubated for 1 h with streptavidin
2 horseradish peroxidase (HRP) conjugated (Zymed, South San Francisco, CA, USA) at the same
3 secondary antibody concentration. Immunoreactive proteins were visualized by HRP substrate
4 (ECL-plus; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) and exposed to X-ray film. Both
5 area and density of protein bands were quantified by Image J 1.34s software (Wayne Rasband
6 National Institute of Health, Bethesda, MA, USA).

7 **Liver triglyceride content**

8 Total triglyceride was extracted from the liver following the adapted Folch Method *et al.*
9 (1957). Briefly, 50 mg of liver was homogenized in 1 mL of isopropanol (Vetec, Duque de Caxias,
10 RJ, Brazil) and centrifuged (5,900 rpm, 10 min, at 4°C). The triglyceride content was measured by
11 colorimetric assay with commercial kits (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brazil).

12 **Liver glycogen content**

13 The glucose produced by glycogen hydrolysis was measured using a commercial kit (Glucos,
14 Doles, Goiânia, GO, Brazil) as described before (Trevenzoli *et al.*, 2010b). Liver was weighed and
15 homogenized with 4 mL of TCA (10%). After centrifugation (1,000xg, 4°C, 10 min), 2 mL of
16 supernatant was added to 5 mL of absolute ethanol and frozen. After 24 h, the mixture was
17 centrifuged (1,000xg, 4°C, 10 min) and the supernatant discarded. The glycogen was hydrolyzed
18 boiling the pellet for 30 min with 1M HCl. After the addition of 1 mL of 1 M NaOH to neutralize the
19 mixture, glucose was measured in 200 µL of supernatant.

20 **Liver histology**

21 Liver samples were embedded in OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) and
22 sectioned into 10 µm using a cryostat to Oil Red O staining for histological evaluation of volume
23 density of steatosis ($V_v[\text{steatosis, liver}]$) by image analysis method (Catta-Preta *et al.*, 2011). Other

1 liver samples from the same rats were fixed in formalin (freshly prepared 1.27 mol/L formaldehyde,
2 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.2) and embedded in paraffin to non-serial sections of 5 μ m.
3 The sections were placed into glass slides to stain in hematoxylin/eosin for evaluation of architecture
4 of liver (Bancroft and Stevens, 1990). At least 10 photomicrographs per animal were randomly
5 measured to evaluate the percentage of steatosis and the liver architecture. We used 5 animals per
6 group for these analyses. All digital images were acquired at random (TIFF format, 36-bit color,
7 1360x1024 pixels) with an Olympus DP71 camera and an Olympus BX40 epifluorescence
8 microscope (Olympus, Tokyo, Japan), and analyzed with the software Image-Pro Plus version 5.0
9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

10 Statistical analysis

11 Data are expressed as mean \pm SEM. The GraphPad Prism 5 program (GraphPad softwares,
12 Inc., San Diego, CA, USA) was used for statistical analyses and graphics. Protein content and serum
13 hormones were analysed using the non-parametric Mann-Whitney *U* test. Other experimental data
14 were determined by Student's unpaired *t* - test, with the level of significance set at $p < 0.05$. For
15 morphological analyses we used 5 animals per group because this number is satisfactory for obtain
16 significance representation.

17 **Results**

18 Corroborating previous findings, offspring overfed during lactation had higher body mass
19 from PN 7 until the end of lactation (NL: 34.8 ± 1.0 g vs SL: 48.9 ± 0.6 g; $p < 0.0001$) and they
20 remained with overweight until PN 180 (NL: 405.8 ± 9.5 g vs SL: 466.2 ± 11.4 g; $p < 0.001$). SL
21 group presented a higher cumulative food intake from weaning until adulthood (NL: 676.7 ± 4.3 g vs
22 SL: 777.5 ± 8.3 g; $p < 0.0001$). They also presented higher VAT weight (NL: 11.34 ± 0.7 g vs SL:
23 21.8 ± 1.9 g; $p < 0.001$).

1 SL group did not show any change in hypothalamic CRH content (Fig.1A), in CRH
2 immunoreactivity in the parvocellular region of the paraventricular nucleus in the hypothalamus
3 (Fig.1B), in pituitary ACTH content (Fig.1C) or in ACTH positive cell number (Fig.1D) by
4 immunohistochemistry. Also, serum ACTH (Fig.1E) and corticosterone (Fig.1F) levels were
5 unchanged in these animals.

6 Concerning adrenal gland, no change in adrenal mass (Fig.2A) was found in SL group at 180
7 days old. However, early overfeeding caused higher total adrenal catecholamine content (absolute:
8 +35%, $p<0.05$, Fig.2B and relative: +40%, $p<0.05$, Fig.2C). Figure 2D represents the adrenal
9 medullary secretion of catecholamine *in vitro* from normal fed and overfed neonates, before and after
10 the caffeine stimulus. SL group showed higher basal (+53%, $p<0.05$), and stimulated (+43%,
11 $p<0.05$) catecholamine release. Also, this group had higher adrenal tyrosine hydroxylase and DOPA
12 decarboxylase contents (+31% Fig.3A and 90% Fig.3B, respectively $p<0.05$), but without changes in
13 other catecholamines synthesizing enzymes: dopamine β hydroxylase (Fig.3C) or
14 phenylethanolamine N methyltransferase (Fig.3D).

15 In PN 180, SL rats did not present any alteration of the ADRB3 in VAT protein content
16 (Fig.4A), however, they had lower ADRB2 protein content in liver (-45%, $p<0.05$, Fig.4B).

17 Concerning the liver tissue, adult SL rats showed important alterations, such as higher mass
18 (+18%, $p<0.05$, Fig.5A), glycogen content (+79%, $p<0.05$, Fig.5B) and triglyceride content (+49%,
19 $p<0.05$, Fig.5C). The SL group also showed many drops of lipids in the hepatocytes evidenced by
20 Oil Red O or HE staining, characterizing a microsteatosis (NL: 0.29 ± 0.09 % vs SL: 4.10 ± 0.99
21 0.6 %; $p<0.05$).

22 Discussion

23 In the present study, the litter size reduction programmed for hyperphagia and overweight at
24 adulthood, corroborating previous data from our laboratory (Rodrigues *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*,

1 2011; Conceição *et al.*, 2011) and others authors (Plageman *et al.*, 1992; Boullu-Ciocca *et al.*, 2005;
2 Ferretti *et al.*, 2011). Several studies attribute this profile to neonatal hyperleptinemia,
3 hyperinsulinemia, and hyperglycemia at weaning, which may cause a malprogramming of the
4 energetic manager systems and stress pathways throughout life, mainly through hypothalamic
5 modifications (Plagemann *et al.*, 1999a and 2010).

6 In Cushing's syndrome, visceral obesity is associated with the high glucocorticoid levels,
7 (Shah and Lila, 2011). However, obesity without changes in serum cortisol have been described
8 (Rosmond *et al.*, 1998; Salehi *et al.*, 2005), similarly what we have found in our experimental model.
9 Despite the higher VAT mass exhibited by the SL rats, they did not show changes in basal serum
10 corticosterone in PN 180, corroborating other authors (Spencer and Tilbrook, 2009). Velkoska and
11 Cole (2005) using the same model attributed the high visceral adiposity to increased GC sensitivity
12 due to a higher content of 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) in adipose tissue
13 at 120 days old. This enzyme converts 11-dehydrocorticosterone in the active hormone
14 corticosterone to supply the local tissue demand promoting adipogenesis (Campbell *et al.*, 2011).
15 Also higher 11 β -HSD1 levels in liver (Edgerton *et al.*, 2010) and adipocyte (Boullu-Ciocca *et al.*,
16 2005) contribute to an increase in fat and glycogen liver content and visceral fat deposition. Thus,
17 although unchanged serum corticosterone, we cannot discard a possible higher 11 β -HSD1 in obese
18 SL rats in PN 180, increasing the peripheral GC action.

19 In order to evaluate a possible hypothalamic-pituitary axis dysfunction in obese SL rats as
20 well as the central corticosterone responsiveness, we studied the CRH-ACTH status. We did not find
21 changes in hypothalamic CRH content by Western blotting and immunohistochemistry analysis.
22 Likewise, Ferretti *et al.* (2011) found no alterations in CRH mRNA at 190 days of age in
23 C57Bl6/DBA2 mice submitted to reduce litter size. In our study, also the pituitary ACTH content
24 and serum levels were not altered. Therefore, in our model the central GC action was preserved.

1 The sympathoadrenal system, which is composed of the sympathetic nervous system and the
2 adrenal medulla, can be programmed by nutritional, environmental and hormonal influences during
3 pregnancy and/or lactation (Trevenzoli *et al.*, 2007; Spencer and Tilbrook, 2009; Trevenzoli *et al.*,
4 2010a) and these changes are related to the development of cardiac and other metabolic diseases
5 (Barker, 2004; de Moura *et al.*, 2008). Although the litter size reduction was previously associated
6 with lower sympathetic activity (Young, 2002), we observed a higher adrenal catecholamine content
7 in SL group at 180 days old, probably due to the increased adrenal medullary TH and DOPA
8 decarboxylase expressions. Lau *et al.*, (1988) found higher TH and PNMT activities during the
9 lactation in Sprague-Dawley rats reared with 5 pups per dam at birth. Moreover, in our study, SL rats
10 showed both higher *in vitro* basal and caffeine stimulated catecholamine release at adulthood. These
11 findings suggest a higher serum catecholamine consistent with the hypertension and other
12 cardiovascular disturbances observed in early overfed rats (Plaggeman *et al.*, 1992; Peng *et al.*,
13 2006).

14 Catecholamines are important regulators of lipolysis, mainly stimulating the β 3- and
15 inhibiting the α 2- adrenoreceptor subtypes in adipose tissue during fasting (Blaak *et al.*, 1993).
16 Therefore, in our experimental model, it would be expected a reduced lipolysis induced by
17 catecholamines. However, the early overnutrition was not able to cause long lasting changes in the
18 catecholamine sensitivity through ADRB3 protein content in retroperitoneal adipose tissue, as would
19 be expected in an obesity model (Collins *et al.*, 1999). Previously, in EO model, Rodrigues *et al.*
20 (2011) reported unchanged serum triglyceride and LDL-c as well as Boullu-Ciocca *et al.* (2005)
21 showed normal serum free fatty acid in SL rats at adulthood. Thus, this lipid profile is in agreement
22 with a normal lipolysis rate. However, it has been reported that SL rats have higher GC receptor and
23 11 β -HSD1 mRNA in visceral adipocyte at 112 days old (Boullu-Ciocca *et al.*, 2005). This higher GC
24 sensitivity is related to adipocyte differentiation (Xu and Björntorp, 1990) and triglyceride

1 accumulation in the adipocyte by stimulating lipoprotein lipase (Fried *et al.*, 1993). Thus, this
2 explanation can contribute to the higher visceral adipose tissue mass observed in early overfed rats.

3 Concerning energy metabolism, the liver is one of the most important organs for this issue.
4 Among other functions, it is responsible for gluconeogenesis, glycogenolysis beyond storing
5 glycogen and triglycerides (Raddatz and Ramadori, 2007), which are influenced by plasma glucose,
6 neurotransmitters and hormones, such as catecholamines and GC levels. Considering the importance
7 of catecholamine to glycogenolysis and fatty acid oxidation, we measured the liver ADRB2 content
8 in adult SL rats, which was lower compared with the controls. This profile may be due to a down
9 regulation of the ADRB2 expression due to a possible higher serum catecholamine. Interestingly, the
10 SL liver also presented decreased nitric oxide content (Conceição EP & Franco JG, 2011 unpublished
11 observations) that is produced during liver glycogenolysis mediated by ADRB2 activation (Hodis *et*
12 *al.*, 2007). Thus, a reduction of the catabolic effect of catecholamines may contribute to the glycogen
13 and triglyceride accumulation found in liver of adult SL rats.

14 The increased liver glycogen content in SL rats contributes to normal basal serum glucose
15 observed in a previous study (Rodrigues *et al.*, 2009). We suppose that hyperleptinemia during
16 lactation (Rodrigues *et al.*, 2009) may program the liver of SL rats to maintain a higher glycogen
17 content, considering that the neonatal exogenous hyperleptinemia also causes an increase in liver
18 glycogen content at 150 days old (Trevenzoli *et al.*, 2010b). Since hypothyroidism is associated with
19 higher liver glycogen (Pickard *et al.*, 2003), another glycogenic contributing factor is the lower
20 triiodothyronine levels of SL rats (Rodrigues *et al.*, 2009). In addition, SL rats had elevated hepatic
21 11 β -HSD1 activity at 21 and 112 days old (Hou *et al.*, 2011), which is in agreement with a recent
22 study in obese humans that showed the contribution of higher liver 11 β -HSD1 expression to
23 increased local corticosterone production (Baudrand *et al.*, 2011) and therefore to a higher glycogen
24 depots in the liver (Edgerton *et al.*, 2010).

1 Moreover, the liver of SL rats showed triglyceride deposition, revealing one more liver
2 anabolic profile, as is found in other obesity models. Duff and Snell (1982) found an increase in
3 lipogenic enzymes activities, such as fatty acid synthetase (FAS), ATP citrate lyase, malic enzyme
4 and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the liver of small litter reared rats at 140 days old. These
5 contribute to the liver fat deposition, which is known as steatosis or nonalcoholic fat liver disease
6 (NAFLD). In fact, some studies correlate higher central adiposity deposition to lipid accumulation in
7 the liver (Jakobsen *et al.*, 2007) and insulin resistance (Pietiläinen *et al.*, 2005), which was observed
8 in EO model at 180 days old (Conceição EP & Franco JG, 2011 unpublished observations). Samuel
9 *et al.* (2004) submitted rats to a high fat diet during 3 days to study the repercussions on liver fat
10 accumulation and liver insulin resistance, without confounding the effect of insulin resistance on
11 other tissues, confirming data previously reported by Kraegen *et al.* (1991). Their data showed
12 NAFLD associated to liver insulin resistance, which was attributed to a decrease in IRS1 and IRS2
13 tyrosine phosphorylation due to high JNK1 activity and PKC-epsilon content in the liver (Samuel *et*
14 *al.*, 2004).

15 The NAFLD is an important liver manifestation of metabolic syndrome, which is related to
16 decline in glucose body management. There are some studies showing the relation between fetal and
17 neonatal programming and the impairment of liver lipid metabolism and NAFLD development. The
18 maternal protein restriction during lactation is associated with a reduction of fatty acid oxidation and
19 impairment of very low-density lipoprotein (VLDL) secretion as well as an increase in lipogenesis,
20 which induces liver steatosis and steatohepatitis (Kwon *et al.*, 2011). Souza-Mello *et al.*, (2007)
21 found similar results in adult rat offspring programmed by protein restricted during pregnancy and
22 high fat diet during lactation. Interestingly, the maternal overnourishment is able to induce structural
23 and metabolic liver alterations (Oben *et al.*, 2010) as well as maternal undernutrition also does. The
24 maternal cafeteria diet during pregnancy and lactation programmed for NAFLD in 3 months old rats
25 due to an increase of lipogenesis and a decrease of beta-oxidation (Bouanane *et al.*, 2010). Our study

1 also reproduces the programming for future NAFLD development but without high fat diet. Probably
2 this is associated with reduced catecholamine sensitivity and increased GC sensibility because SL
3 rats in PN 180 did not present higher liver triglyceride influx, hypoadiponectinemia, hyperleptinemia
4 or hyperinsulinemia as it was already described in other models (Souza-Mello *et al.*, 2007; Bouanane
5 *et al.*, 2010; Trevenzoli *et al.*, 2010b).

6 In conclusion, the early nutritional state is important to adequate development metabolic
7 systems, which may contribute to the establishment of obesity and other chronic diseases throughout
8 life. The SL sympathoadrenal system is sensitive to postnatal overnutrition, resulting in
9 hyperactivation. Moreover, these rats present metabolic changes, which are favorable to the storage
10 of energetic fuels in the liver and visceral adipocytes, such as decreased liver sensitivity to
11 catecholamine.

12

13 **Declaration of interest**

14 The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing
15 the impartiality of the research reported.

16 **Funding**

17 This research was supported by the “National Council for Scientific and Technological
18 Development” (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq), the
19 “Carlos Chagas Filho Research Foundation of the State of Rio de Janeiro” (Fundação Carlos Chagas
20 Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro-FAPERJ), Coordination for the
21 Enhancement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
22 Superior – CAPES). EPSC was recipient of FAPERJ fellowship. CRP was recipient of CNPq
23 fellowship. NPS, JGF, VYR and EO were recipient of CAPES fellowship.

1 Author contribution statement

2 EPSC, PCL, EGM and EO designed the study and wrote protocol. EPSC, CRP and IHT
3 characterized the catecholamines adrenal gland parameters. EPSC and NPS determined liver and
4 visceral adipose tissue histological and molecular parameters. VYR evaluated the HHP by
5 immunohistochemistry. EPSC and JGF were responsible for biochemical and molecular procedures.
6 EPSC, EGM, IHT, EO and PCL participated in the analysis and interpretation of data and wrote the
7 manuscript. All authors have approved the final version of the manuscript.

8 References

- 9 Bancroft JD, Stevens A 1990 *Theory and Practice of Histological Techniques*. Edn 3, pp 365-
10 369. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- 11 Barker DJ 2004 The developmental origins of adult disease. *Journal of the American College of*
12 *Nutrition* **23** 588S-595S.
- 13 Baudrand R, Domínguez JM, Carvajal CA, Riquelme A, Campino C, Macchiavello S, Bozinovic
14 M, Morales M, Pizarro M, Solis N *et al.* 2011 Overexpression of hepatic 5 α -reductase and 11 β -
15 hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in visceral adipose tissue is associated with
16 hyperinsulinemia in morbidly obese patients. *Metabolism*. **60** 1775-1780.
- 17 Blaak EE, van Baak, MA, Kempen KPG & Saris WHM 1993 Role of α - and β -adrenoceptors in
18 sympathetically mediated thermogenesis, *American Journal of Physiology* **264** E11-E17.
- 19 Bouanane S, Merzouk H, Benkalfat NB, Soulimane N, Merzouk SA, Gresti J, Tessier C & Narce
20 M 2010 Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams.
21 *Metabolism* **59** 1701-1709.

- 1 Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C & Grino M 2005 Postnatal diet-
2 induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during
3 development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes* **54** 197-
4 203.
- 5 Campbell JE, Peckett AJ, D'souza AM, Hawke TJ & Riddell MC 2011 Adipogenic and lipolytic
6 effects of chronic glucocorticoid exposure. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*
7 **300** 198-209.
- 8 Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB & Mandarim-de-Lacerda CA 2011
9 A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver
10 biopsies. *Virchows Arch* **459** 477-485.
- 11 Collins S, Daniel KW & Rohlf's EM 1999 Depressed expression of adipocyte beta-adrenergic
12 receptors is a common feature of congenital and diet-induced obesity in rodents. *International*
13 *Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* **23** 669-677.
- 14 Conceição EP, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, Moura
15 EG & Lisboa PC 2011 Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats
16 overfed during lactation. *Hormone and Metabolic Research* **43** 513-516.
- 17 Cornett LE, Hiller FC, Jacobi SE, Cao W & McGraw DW 1998 Identification of a glucocorticoid
18 response element in the rat beta2-adrenergic receptor gene. *Molecular Pharmacology* **54** 1016-
19 1023.
- 20 Davidowa H & Plagemann A 2000 Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate
21 neurons in neonatally overfed young rats. *Neuroreport*. **21** 2795-8.

- 1 Davidowa H & Plagemann A 2001 Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats
2 overweight due to postnatal overfeeding. *Neuroreport*. **29** 3201-3204.
- 3 de Moura EG, Lisboa PC & Passos MC 2008 Neonatal programming of
4 neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*
5 **15** 176-188.
- 6 Djouder N, Tuerk RD, Suter M, Salvioni P, Thali RF, Scholz R, Vaahtomeri K, Auchli Y,
7 Rechsteiner H, Brunisholz RA *et al.* 2010 PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to
8 promote efficient lipolysis. *The EMBO Journal* **29** 469-481.
- 9 Duff DA & Snell K 1982 Effect of altered neonatal nutrition on the development of enzymes of
10 lipid and carbohydrate metabolism in the rat. *Journal of Nutrition* **112** 1057-1066.
- 11 Edgerton DS, Basu R, Ramnanan CJ, Farmer TD, Neal D, Scott M, Jacobson P, Rizza RA &
12 Cherrington AD 2010 Effect of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 inhibition on hepatic
13 glucose metabolism in the conscious dog. *American Journal of Physiology - Endocrinology and*
14 *Metabolism* **298** 1019-1026.
- 15 Ferretti S, Fornari A, Pedrazzi P, Pellegrini M & Zoli M 2011 Developmental overfeeding alters
16 hypothalamic neuropeptide mRNA levels and response to a high-fat diet in adult mice. *Peptides*
17 **32** 1371-1383.
- 18 Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification
19 of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226** 497- 509
- 20 Formiguera X & Canton A 2004 Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Practice &*
21 *Research Clinical Gastroenterology* **18** 1125-1146

- 1 Fried SK, Russell CD, Grauso NL & Brodin RE 1993 Lipoprotein lipase regulation by insulin and
2 glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissue of obese women and men. *Journal of*
3 *Clinical Investigation* **92** 2191-2198.
- 4 Gluckman PD & Hanson MA 2007 Developmental plasticity and human disease: research
5 directions. *Journal of Internal Medicine* **261** 461-471.
- 6 Hodis J, Kutinová-Canová N, Potmesil P, Kameníková L, Kmoníčková E, Zídek Z & Farghali H
7 2007 The role of adrenergic agonists on glycogenolysis in rat hepatocyte cultures and possible
8 involvement of NO. *Physiological Research* **56** 419-425.
- 9 Hou M, Liu Y, Zhu L, Sun B, Guo M, Burén J & Li X 2011 Neonatal overfeeding induced by
10 small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *PLoS ONE* **6** e25726.
- 11 Jakobsen MU, Berentzen T, Sørensen TI & Overvad K 2007 Abdominal obesity and fatty
12 liver. *Epidemiologic Reviews* **29** 77-87.
- 13 Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ & Storlien LH 1991 Development
14 of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes* **40** 1397-
15 1403.
- 16 Kwon DH, Kang W, Nam YS, Lee MS, Lee IY, Kim HJ, Rajasekar P, Lee JH & Baik M 2011
17 Dietary protein restriction induces steatohepatitis and alters leptin/signal transducers and
18 activators of transcription 3 signaling in lactating rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry in*
19 *press* PMID: 21840192.
- 20 Lau C, Seidler FJ, Cameron AM, Navarro HA, Bell JM, Bartolome J & Slotkin TA 1988
21 Nutritional influences on adrenal chromaffin cell development: comparison with central neurons.
22 *Pediatric Research* **24** 583-587.

- 1 Mastorakos G & Zapanti E 2004 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neuroendocrine
2 regulation of food intake and obesity: the role of corticotropin releasing hormone. *Neuroscience*
3 *and Nutrition* **7** 271-280.
- 4 Nonogaki K 2000 New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism.
5 *Diabetologia* **43**, 533-549.
- 6 Oben JA, Muralidarane A, Samuelsson AM, Matthews PJ, Morgan ML, McKee C, Soeda J,
7 Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Ozanne SE *et al.* 2010 Maternal obesity during
8 pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease
9 in mice. *Journal of Hepatology* **52** 913-920.
- 10 Oliveira E, Pinheiro CR, Santos-Silva AP, Trevenzoli IH, Abreu-Villaça Y, Nogueira Neto JF,
11 Reis AM, Passos MC, Moura EG & Lisboa PC 2010 Nicotine exposure affects mother's and
12 pup's nutritional, biochemical, and hormonal profiles during lactation in rats. *Journal of*
13 *Endocrinology* **205** 159-170.
- 14 Pasquali R, Cantobelli S, Casimirri F, Capelli M, Bortoluzzi L, Flaminia R, Labate AMM,
15 Barbara L. 1993 The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in obese women with different patterns
16 of body fat distribution. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **77** 341-346.
- 17 Paxinos G & Watson C 1998 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Edn 4 New York:
18 Academic Press.
- 19 Peng YX, Shan J, Qi XY, Zhang SJ, Ma SP, Wang N, Li JP, Xue H & Wu M 2006 The
20 catecholamine-beta-adrenoreceptor-cAMP system and prediction of cardiovascular events in
21 hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **33** 227-231.

- 1 Pickard MR, Leonard AJ, Ogilvie LM, Edwards PR, Evans IM, Sinha AK & Ekins RP 2003
2 Maternal hypothyroidism in the rat influences placental and liver glycogen stores: fetal growth
3 retardation near term is unrelated to maternal and placental glucose metabolic compromise.
4 *Journal of Endocrinology* **176** 247-255.
- 5 Pietiläinen KH, Rissanen A, Kaprio J, Mäkimattila S, Häkkinen AM, Westerbacka J, Sutinen J,
6 Vehkavaara S & Yki-Järvinen H 2005 Acquired obesity is associated with increased liver fat,
7 intra-abdominal fat, and insulin resistance in young adult monozygotic twins. *American Journal*
8 *of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **288** 768-774.
- 9 Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W & Dörner G 1999a Perinatal
10 elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons,
11 and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Research* **836** 146-
12 155.
- 13 Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T, Rohde W & Dörner G 1999b
14 Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed
15 weanling rats. *Journal of Neuroendocrinology* **7** 541-546.
- 16 Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W & Dörner G 1992 Obesity and enhanced diabetes
17 and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Experimental and clinical*
18 *endocrinology* **99** 154-158.
- 19 Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong
20 K, Rodekamp E, Melchior K & Dudenhausen JW 2010 Epigenetic malprogramming of the
21 insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *Journal of Perinatal Medicine* **38**
22 393-400.

- 1 Raddatz D & Ramadori G 2007 Carbohydrate metabolism and the liver: actual aspects from
2 physiology and disease. *Zeitschrift für Gastroenterologie* **45** 51-62.
- 3 Reilly JJ & Kelly J 2011 Long-term impact of overweight and obesity in childhood and
4 adolescence on morbidity and premature mortality in adulthood: systematic review. *International*
5 *journal of obesity* **35** 891-898.
- 6 Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Dutra SC & Lisboa PC 2009 Postnatal early
7 overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of
8 young and adult rats. *The Journal of Physiology* **587** 2647-2661.
- 9 Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Trevenzoli IH, da Conceição EP, Bonono IT, Neto JF
10 & Lisboa PC 2011 Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression
11 and lower STAT3 activity in adult rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **22** 109-117.
- 12 Rosmond R, Dallman MF & Björntorp P 1998 Stress-related cortisol secretion in men:
13 relationship with abdominal obesity and endocrine, metabolic and hemodynamic abnormalities.
14 *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 1853-1859.
- 15 Ross ME, Evinger MJ, Hyman SE, Carroll JM, Mucke L, Comb M, Reis DJ, Joh TH &
16 Goodman HM 1990 Identification of a functional glucocorticoid response element in the
17 phenylethanolamine N-methyltransferase promoter using fusion genes introduced into
18 chromaffin cells in primary cultures. *The Journal of Neuroscience* **10** 520-530.
- 19 Salehi M, Ferenczi A & Zumoff B 2005 Obesity and cortisol status. *Hormone and Metabolic*
20 *Research* **37** 193-197

- 1 Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ & Shulman GI 2004
2 Mechanism of hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of*
3 *Biological Chemistry* **279** 32345–32353.
- 4 Scherle W 1970 A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology.
5 *Mikroskopie* **26** 57-60.
- 6 Shah NS & Lila A 2011 Childhood cushing disease: a challenge in diagnosis and management.
7 *Hormone Research in Paediatrics* **76** 65-70.
- 8 Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA & Aguilá MB 2007 Hepatic structural alteration in
9 adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning
10 high-fat diet. *British Journal of Nutrition* **98** 1159-1169.
- 11 Spencer SJ & Tilbrook A 2009 Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress
12 responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* **34** 1133-1143.
- 13 Trevenzoli IH, Pinheiro CR, Conceição EPS, Oliveira E, Passos MCF, Lisboa PC & Moura EG
14 2010a Programming of rat adrenal medulla by neonatal hyperleptinemia: adrenal morphology,
15 catecholamine secretion, and leptin signaling pathway. *American journal of physiology -*
16 *Endocrinology and metabolism* **298** 941-949.
- 17 Trevenzoli IH, Rodrigues AL, Oliveira E, Thole AA, Carvalho L, Figueiredo MS, Toste FP, Neto
18 JF, Passos MC, Lisboa PC et al. 2010 Leptin treatment during lactation programs leptin
19 synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats. *Hormone and*
20 *Metabolic Research* **42** 483-490.

- 1 Trevenzoli IH, Valle MM, Machado FB, Garcia RM, Passos MC, Lisboa PC & Moura EG 2007
2 Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on
3 cardiovascular parameters. *The Journal of Physiology* **580** 629-637.
- 4 Velkoska E, Cole TJ & Morris MJ 2005 Early dietary intervention: long-term effects on blood
5 pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *American Journal of Physiology -
6 Endocrinology and Metabolism* **288** 1236-1243.
- 7 Yorek MA, Rufo GA Jr & Ray PD 1980 Gluconeogenesis in rabbit liver. III. The influences of
8 glucagon, epinephrine, alpha- and beta-adrenergic agents on gluconeogenesis in isolated
9 hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* **632** 517-526.
- 10 Young JB 2002 Effects of litter size on sympathetic activity in young adult rats. *American
11 Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **282** 1113-1121.
- 12 Zelber-Sagi S, Ratziu V & Oren R 2011 Nutrition and physical activity in NAFLD: an overview
13 of the epidemiological evidence. *World Journal of Gastroenterology* **17** 3377-3389.

Figure 1

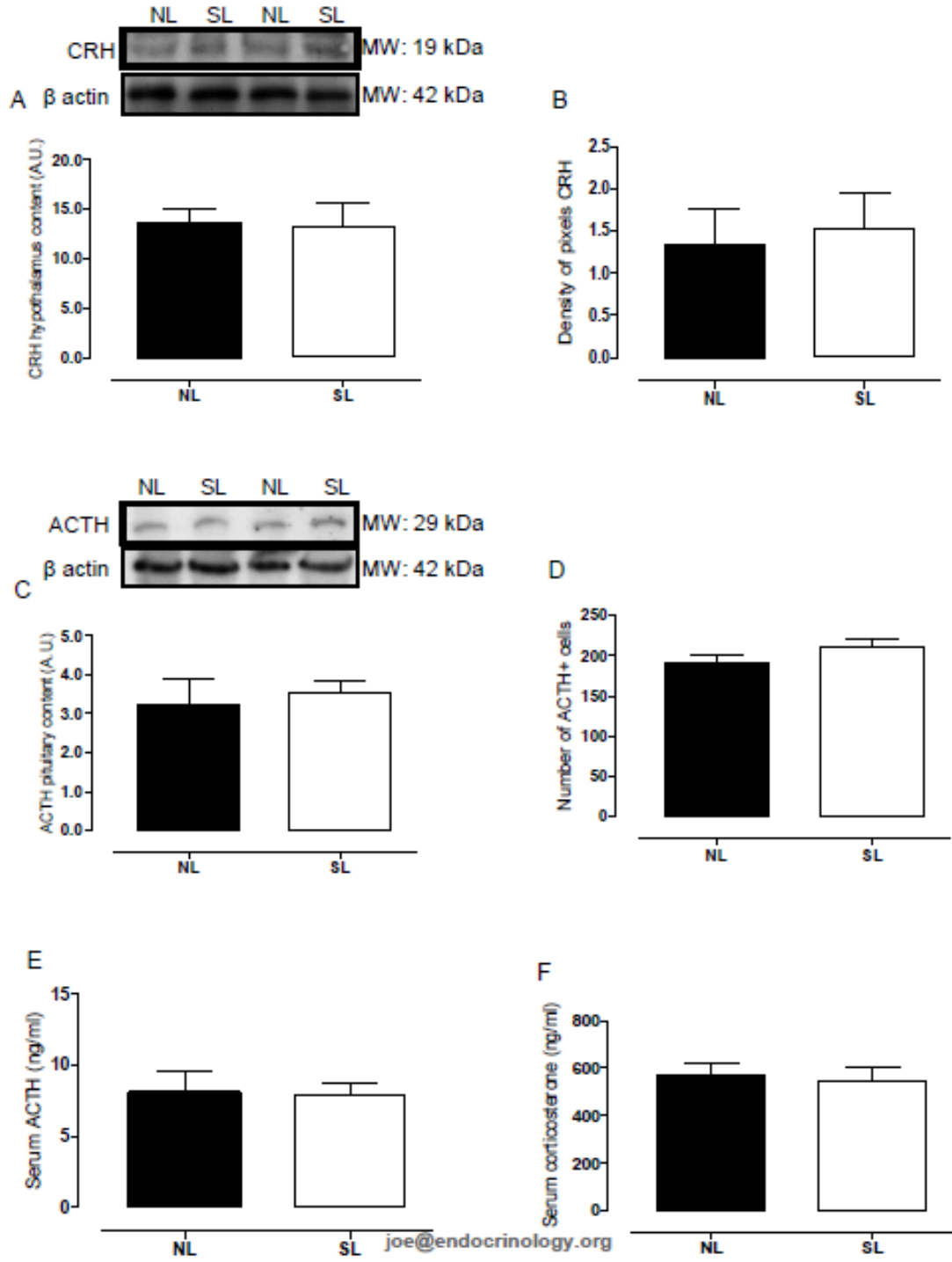


Figure 2

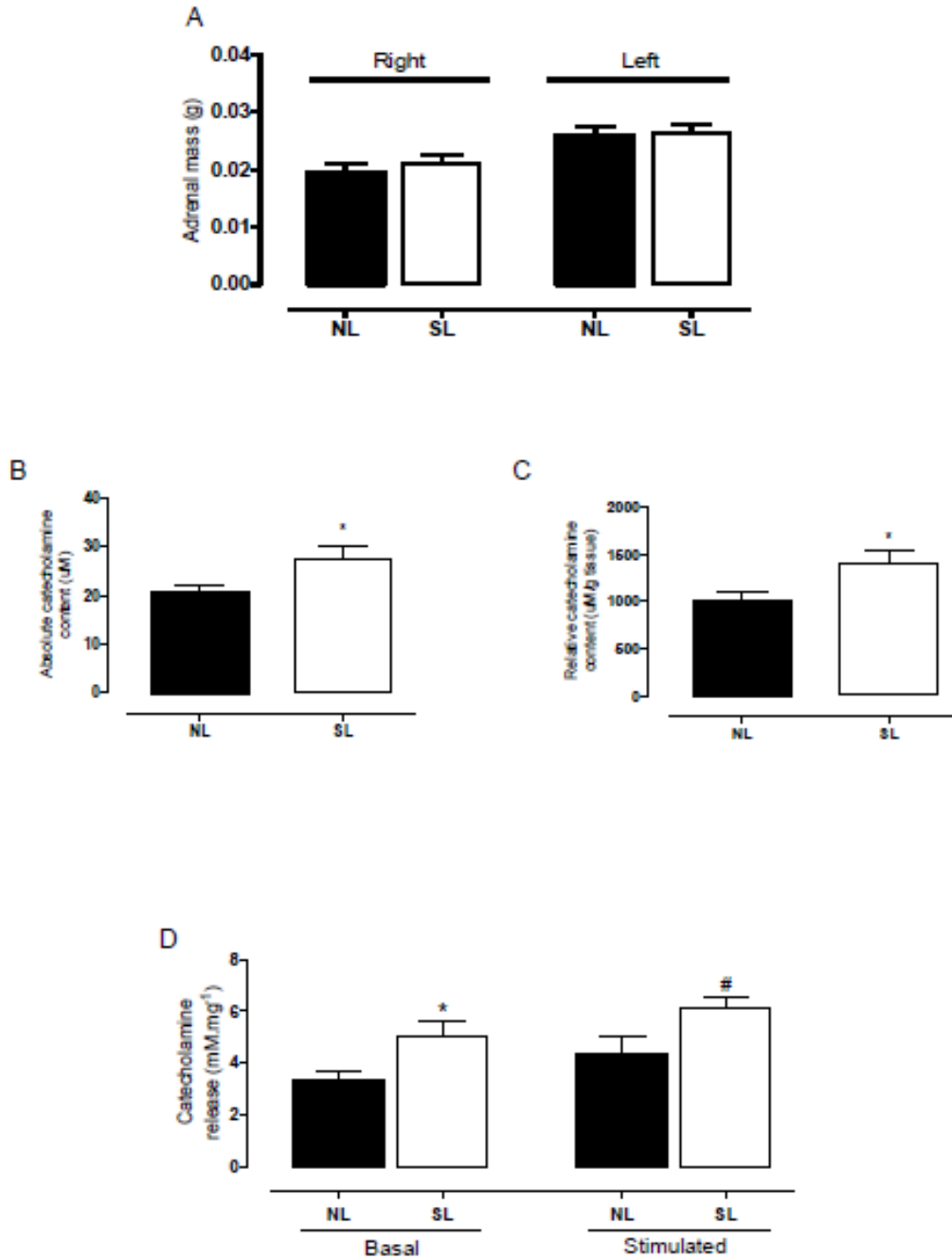


Figure 3

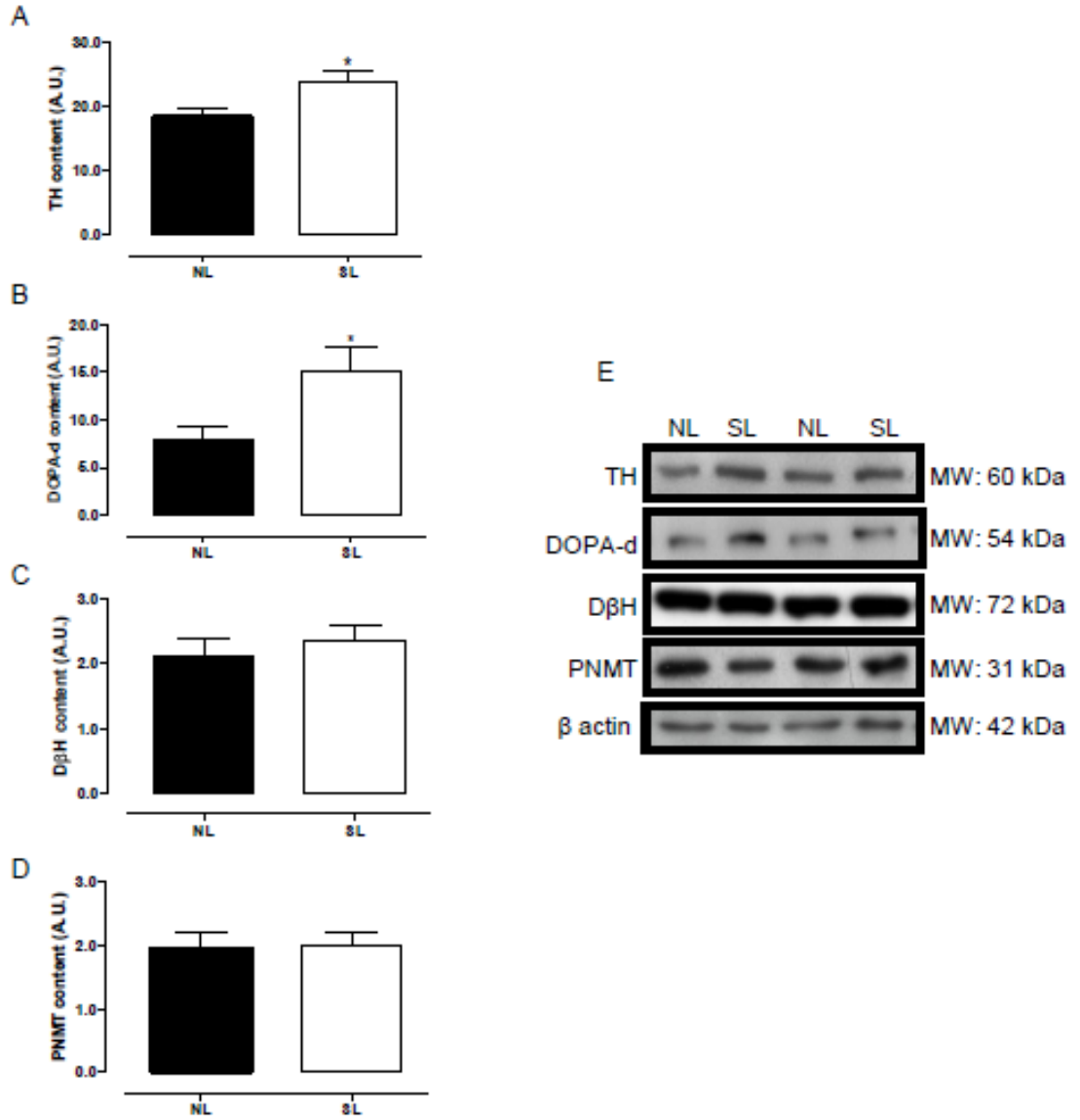


Figure 4

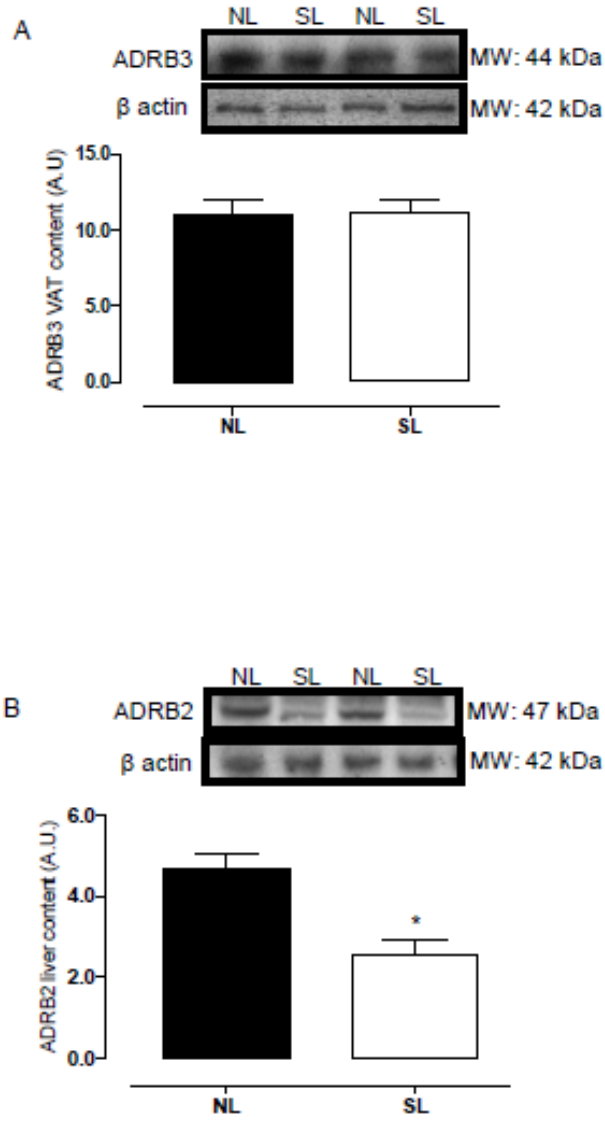
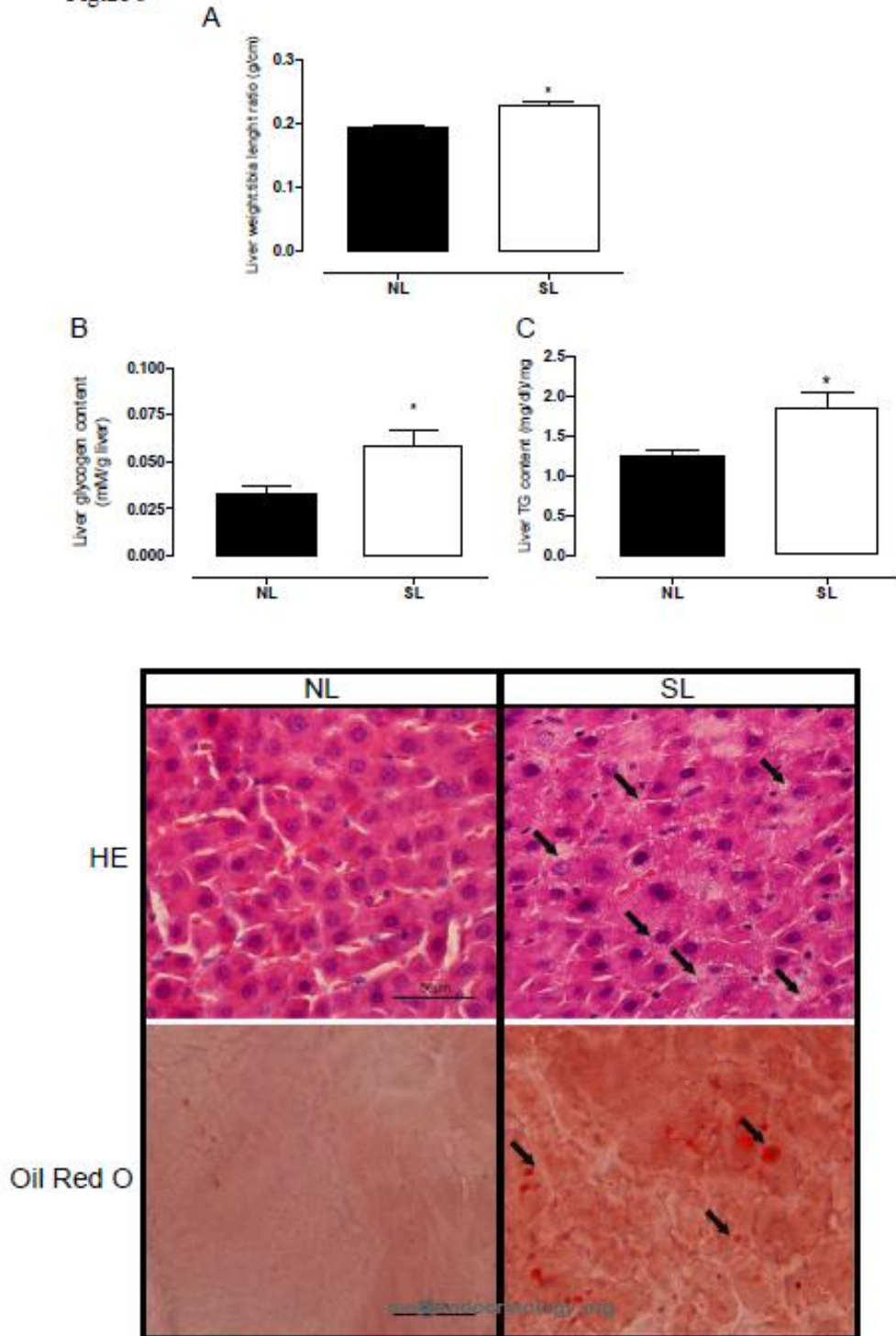


Figure 5



1

Figure legends

2 **Figure 1: Long-term effect of neonatal overnutrition on the hypothalamus-pituitary-adrenal**
3 **cortex axis.** Hypothalamic CRH (A) and pituitary ACTH protein contents (C) from normal litter
4 (NL-black bar) and small litter (SL-white bar) rats at 180 days old. The top figure is a representative
5 blot. CRH and ACTH content were quantified by scanning densitometry [arbitrary units (AU)]; actin
6 content was used as control loading. Graph represents a pool of 2 independent Western blot
7 runnings. CRH immunoreactivity (B), ACTH⁺ cell number (D), serum ACTH (E) and corticosterone
8 (F). Values are means \pm SEM. N= 5-7 per group (by the Mann-Whitney *U* test).

9 **Figure 2: Long-term effect of neonatal overnutrition on the adrenal medullae.** Adrenal gland
10 weight (A), absolute (B) and relative (C) adrenal catecholamine content and *in vitro* basal and
11 caffeine stimulated catecholamine release (D) of normal litter (NL-black bar) and small litter (SL-
12 white bar) rats at 180 days old. Values are means \pm SEM. * $p < 0.05$, N= 7 per group (by the Student's
13 unpaired *t* - test).

14 **Figure 3: Long-term effect of neonatal overnutrition on the catecholamine synthesis.** Protein
15 content of TH (A), DOPA decarboxylase (B), dopamine β hydroxylase (C), phenylethanolamine N
16 methyltransferase (D) in adrenal medullae homogenates from normal litter (NL-black bar) and small
17 litter (SL-white bar) rats at 180 days old. Representative blots of each protein (E) are shown. Enzyme
18 contents were quantified by scanning densitometry [arbitrary units (AU)]; actin content was used as
19 control loading. Graph represents a pool of 2 independent Western blot runnings. Values are means \pm
20 SEM. * $p < 0.05$, N= 7 per group (by the Mann-Whitney *U* test).

21 **Figure 4: Long-term effect of neonatal overnutrition on the tissue catecholamine**
22 **responsiveness.** Protein content of β 3-adrenergic receptor (ADRB3) in retroperitoneal fat
23 homogenates (A) and β 2-adrenergic receptor (ADRB2) in liver homogenates (B) from (NL-black

1 bar) and (SL-white bar) at 180 days old. The top figure is a representative blot. ADRB3 and ADRB2
2 content were quantified by scanning densitometry [arbitrary units (AU)]; actin content was used as
3 control loading. Graph represents a pool of 2 independent Western blot runnings. Values are means \pm
4 SEM. * $p < 0.05$, $N = 7$ per group (by the Mann-Whitney U test).

5 **Figure 5: Long-term effect of neonatal overnutrition on liver energetic storage and**
6 **morphometric characteristics.** Weight of liver normalized for tibia length (A), glycogen (B) and
7 triglyceride (C) contents in liver from normal litter (NL-black bar) and small litter (SL-white bar)
8 rats at 180 days old. Photomicrographs of liver observed at 60x objective in H&E (top) and 100x Oil
9 Red O staining (bottom). Lipid droplets are indicated by arrows at both staining of SL group. Values
10 are means \pm SEM. * $p < 0.05$, $N = 5-7$ per group (by the Student's unpaired t - test).

ANEXO – Carta de submissão

Os resultados apresentados nesta dissertação de mestrado fizeram parte do manuscrito submetido a “Journal of Endocrinology”, fator de impacto 3.099 (2010 JCR).

09-Jan-2012

Dear Dr. Lisboa:

Your manuscript entitled 'DEVELOPMENTAL PLASTICITY IN ADRENAL FUNCTION AND LIVER TISSUE PRIMED BY NEONATAL OVERFEEDING IN RATS' has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Endocrinology.

Your manuscript ID is JOE-12-0010.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence with the editorial office. If there are any changes to your contact information, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/sfe-joe> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/sfe-joe>.

If you have not done so already, please ensure all the authors have signed a copyright form (this is a requirement for publication), available at http://joe.endocrinology-journals.org/misc/SfE_Copyright_form.pdf. We ask the authors to print their names next to their signature. If your manuscript contains colour figures please complete the colour charges form at <http://www.endocrinology-journals.org/misc/colourack.pdf>. You may return the forms as scanned versions in attachment to this email.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Endocrinology.

Yours sincerely,

Journal of Endocrinology Editorial Office

BioScientifica Ltd., Reg in England no. 3190519

Society for Endocrinology (limited by guarantee)

Reg. in England no. 349408 Reg. Charity no. 266813

22 Apex Court

Woodlands, Bradley Stoke

Bristol BS32 4JT

United Kingdom