

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

BIOQUÍMICA

ANA PAULA TONIAZZO

**EFEITOS BIOQUÍMICOS SEXO-ESPECÍFICOS DA EXPOSIÇÃO AO
ISOLAMENTO SOCIAL DURANTE O PERÍODO PRÉ-PÚBERE ASSOCIADO
À DIETA RICA EM GORDURA SOBRE A PROGRAMAÇÃO DO
METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS ADULTOS**

Porto Alegre

2018

ANA PAULA TONIAZZO

**EFEITOS BIOQUÍMICOS SEXO-ESPECÍFICOS DA EXPOSIÇÃO AO
ISOLAMENTO SOCIAL DURANTE O PERÍODO PRÉ-PÚBERE ASSOCIADO
À DIETA RICA EM GORDURA SOBRE A PROGRAMAÇÃO DO
METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Bioquímica.

Orientador(a): Prof.^a Dra. Carla Dalmaz

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Toniazzo, Ana Paula
EFEITOS BIOQUÍMICOS SEXO-ESPECÍFICOS DA EXPOSIÇÃO
AO ISOLAMENTO SOCIAL DURANTE O PERÍODO PRÉ-PÚBERE
ASSOCIADO À DIETA RICA EM GORDURA SOBRE A PROGRAMAÇÃO
DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM RATOS ADULTOS / Ana
Paula Toniazzo. -- 2018.
145 f.
Orientadora: Carla Dalmaç.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Dieta rica em gordura. 2. Estresse. 3.
Programação metabólica. 4. Diferenças sexo-específicas.
5. Intervenções precoces. I. Dalmaç, Carla, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu
namorado, pelo amor e apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fazer acreditar que era possível, pela força, persistência e pela coragem.

Aos meus pais, Ivo e Odete, que são a base do que sou e do que consegui até hoje, por serem meus maiores incentivadores, pelo carinho e amor incondicionais, pela confiança e por estarem sempre dando apoio quando precisei.

Ao meu namorado, Lucas, pela compreensão, por toda paciência, pelo carinho e pelas palavras de conforto que me ajudaram a superar as dificuldades.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Carla Dalmaz, por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa, pela confiança que depositou em mim. Agradeço por toda a atenção, pela disponibilidade, pelos ensinamentos, pela compreensão e paciência em auxiliar sempre. Agradeço pela grande contribuição para a construção da minha vida acadêmica.

À minha grande amiga e colega, Danusa, que sempre esteve ao meu lado, tanto na vida pessoal quanto na profissional, sempre com palavras de apoio, de incentivo, sempre me fazendo acreditar no meu potencial. Agradeço pela amizade, por toda ajuda, pelos ensinamentos e pela motivação em momentos difíceis.

À Rachel, meu grande exemplo profissional, sempre me ajudando nas dificuldades e contribuindo para meu crescimento, pessoal e profissional, durante toda a pós-graduação. Agradeço por todos conselhos e por todas palavras de apoio.

À Camilla, que sempre esteve disposta a ajudar, grande colega e amiga que tornava os dias no lab mais leves e descontraídos. Obrigada pela ajuda nos experimentos, na vida pessoal e pela parceria sempre.

Aos colegas do laboratório 37, aos integrantes atuais e aos que estiveram por lá durante a minha trajetória, pela parceria nos experimentos, pelo carinho e pela convivência. À Aline, Carine e Nati pela ajuda nos experimentos e por estarem sempre dispostas a ajudar. Aos alunos de iniciação científica, Rafael e Emily que de forma proativa auxiliaram no desenvolvimento das atividades e facilitaram a execução das tarefas.

Ao pessoal do laboratório 35, pela parceria, amizade e cordialidade.

Aos colaboradores, o professor José Cláudio, ao Carlos Eduardo Schnorr, à Letícia Pettenuzzo, à Carina e ao Rodrigo Proto-Siqueira do laboratório Antonello de Pelotas por possibilitarem a concretização das ideias.

Aos professores da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos coordenadores, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Bioquímica pela oportunidade de realizar o doutorado. Aos órgãos financiadores de pesquisa, em especial ao CNPq pela bolsa de doutorado.

Agradeço a todos meus amigos, familiares e à família do meu namorado pelo apoio.

Para esses citados e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, deixo meu sincero obrigado.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Obesidade: influência de fatores ambientais	11
1.2 Fatores ambientais durante o desenvolvimento podem programar sistemas encefálicos e metabólicos	13
1.3 Período pré-púbere: vulnerabilidade ao estresse social	15
1.4 A resposta ao estresse	19
1.5 Estresse e comportamento alimentar	22
1.6 Ação de adipocinas na homeostase metabólica	24
1.7 Fatores ambientais: efeitos sobre a mitocôndria.....	29
1.8 Estresse oxidativo	31
2. OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS	38
3.1 Capítulo I: Sex-specific effects of prepubertal stress and high-fat diet on leptin signaling in rats.....	40
3.2 Capítulo II: Sex-dependent effect on mitochondrial and oxidative stress parameters in the hypothalamus induced by prepubertal stress and access to high- fat diet	60

4. DISCUSSÃO	95
5. CONCLUSÕES.....	116
6. PERSPECTIVAS.....	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
8. ANEXO.....	139

APRESENTAÇÃO

A presente tese está organizada conforme os seguintes tópicos: **Introdução**; **Objetivos**; **Material, Métodos e Resultados**: subdivididos em Capítulos I e II (referentes ao artigo publicado e ao manuscrito submetido); **Discussão**; **Conclusões**; **Perspectivas e Referências bibliográficas**.

Na **Introdução** encontra-se o embasamento teórico que nos forneceu subsídio para formular a proposta de estudo dessa tese. Os **Objetivos** (gerais e específicos) definem os propósitos centrais do trabalho, assim como de cada trabalho científico. A sessão **Material, Métodos e Resultados** está subdividida em Capítulos, sendo que cada Capítulo corresponde a um artigo científico específico referente aos trabalhos desenvolvidos durante o período do doutorado. Os trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Neurobiologia do Estresse (Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS).

O tópico **Discussão** apresenta uma integração geral dos resultados obtidos nos dois capítulos. Nas **Conclusões** estão os principais achados da tese e nas **Perspectivas** as possibilidades de futuros estudos a partir dos resultados obtidos na presente tese.

As **Referências Bibliográficas** contêm as referências dos trabalhos citados nos tópicos: **Introdução e Discussão**. Ao final de cada capítulo está listada a bibliografia correspondente a cada artigo, de acordo com a formatação especificada por cada revista.

RESUMO

A obesidade é uma condição multifatorial cujo aumento da prevalência está relacionado a mudanças no estilo de vida, no qual o estresse e o consumo de dietas ricas em gordura estão amplamente envolvidos. A exposição a fatores ambientais em períodos precoces do desenvolvimento pode causar alterações persistentes no sistema nervoso central e no sistema endócrino-metabólico que, por consequência, podem resultar no desenvolvimento do fenótipo da obesidade. O período pré-púbere é uma fase sensível do desenvolvimento, caracterizada pela maturação de sistemas envolvidos na homeostase energética e nas respostas ao estresse. Intervenções durante esse período podem influenciar a susceptibilidade a doenças ou a resiliência na idade adulta. O isolamento social é considerado um potente estressor para roedores e humanos e a exposição a esse fator durante o período pré-púbere pode ter efeitos emocionais, comportamentais e metabólicos em longo prazo. A exposição ao estresse durante fases precoces do desenvolvimento pode causar alterações no comportamento alimentar e induzir a maior preferência por alimentos confortantes (“comfort foods”), ricos em açúcares e gorduras. O estresse e a ingestão de dietas ricas em gordura podem programar o metabolismo de forma distinta entre os sexos por modular a sinalização de hormônios envolvidos na regulação da homeostase energética. Além disso, esses fatores ambientais podem levar a um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes, favorecendo o estresse oxidativo, o qual pode induzir a oxidação de biomoléculas e levar a disfunções mitocondriais. Com base no exposto acima, o objetivo dessa tese foi investigar os efeitos em longo prazo do isolamento social durante o período pré-púbere (21-28 dias pós-natal), associado ou não à dieta rica em gordura crônica, sobre parâmetros metabólicos, oxidativos, sobre a função mitocondrial e sobre parâmetros de dano à célula no hipotálamo total, comparando machos e fêmeas. Para alcançar esse objetivo foram avaliados aspectos murinométricos e metabólicos relacionados à sinalização da leptina no hipotálamo total dos ratos na idade adulta, verificando possíveis diferenças sexo-específicas. Para verificar se os fatores estresse e o consumo crônico de dieta rica em gordura teriam efeitos sobre o metabolismo celular, também foram analisados parâmetros oxidativos e de função mitocondrial no hipotálamo total desses animais na idade adulta. Os resultados mostraram que os machos e as fêmeas responderam de forma diferente ao estresse no período pré-púbere e à dieta rica em gordura. Os machos apresentaram características murinométricas que pareceram refletir uma resistência à leptina. Entretanto, o prejuízo na sinalização desse hormônio aconteceu apenas parcialmente no hipotálamo e foi principalmente influenciado pela dieta rica em gordura nesses animais. Por outro lado, as fêmeas foram mais susceptíveis ao isolamento social no período pré-púbere, o qual levou a prejuízos na sinalização da leptina na idade adulta. De modo interessante, a via alternativa de sinalização da leptina, através do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, permaneceu ativada nos machos. Porém, a maior liberação de hormônios da tireoide nesses animais não teve os efeitos metabólicos esperados devido à menor conversão do T4 em T3. Embora ambos fatores, estresse e a dieta rica em gordura assim como a interação entre eles tenham apresentado efeitos distintos em machos e fêmeas, o consumo crônico da dieta rica em gordura teve efeitos mais proeminentes nas fêmeas quando considerados

parâmetros oxidativos e de função mitocondrial. A dieta induziu um desequilíbrio oxidativo que resultou em danos celulares e mitocondriais nas fêmeas. De forma ampla, essa tese mostrou que intervenções em fases precoces da vida do indivíduo podem ter desfechos diferentes em machos e fêmeas. O isolamento social no período pré-púbere e o consumo crônico da dieta rica em gordura podem programar o metabolismo ao longo da vida. O consumo crônico da dieta rica em gordura levou a uma perturbação na comunicação do metabolismo periférico com o central nos machos que repercutiu em um fenótipo semelhante ao da obesidade nesses animais. As fêmeas foram mais susceptíveis à dieta rica em gordura, porém os prejuízos maiores foram observados no metabolismo energético central, marcado pelo desequilíbrio oxidativo e pelas disfunções mitocondriais. Assim, nosso trabalho destaca a importância de intervenções ambientais, no início da vida, para a programação metabólica em longo prazo. Adicionalmente, esses resultados podem revelar alvos importantes para a elucidação dos mecanismos relacionados ao desenvolvimento da obesidade e contribuir para que novos trabalhos sejam desenvolvidos além de auxiliar para que futuras medidas terapêuticas e preventivas sejam desenvolvidas respeitando as particularidades de cada gênero.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disorder in which increased prevalence is related to changes in lifestyle, and both stress and consumption of high-fat diets are largely involved. Exposure to environmental factors at early stages of development may cause persistent changes in the central nervous system and endocrine-metabolic system, which may result in the development of the obesity phenotype. The pre-pubertal period is a sensitive phase of development, characterized by the maturation of systems involved in energy homeostasis and stress responses. Interventions during this period may influence the susceptibility to disease or resilience in adulthood. Social isolation is considered a potent stressor for rodents and humans and exposure to this factor during the pre-pubertal period may have long-term emotional, behavioral, and metabolic effects. The stress exposure during early stages of development can cause changes in eating behavior and induce the preference for “comfort foods”, rich in sugars and fats. Both, stress and high-fat diets intake can program the metabolism in a sex-different manner through modulation of hormones signaling involved in regulation of energy homeostasis. In addition, these environmental factors may lead to an imbalance between the production of reactive oxygen species and antioxidant defenses favoring oxidative stress, which can induce the oxidation of biomolecules and lead to mitochondrial dysfunctions. Based on the above ideas, the aim of this thesis was to investigate the long-term effects of social isolation during the pre-pubertal period (postnatal day 21-28), associated with chronic high-fat diet on metabolic, oxidative and mitochondrial parameters in the total hypothalamus, comparing males and females. To achieve this goal, we evaluated murine and metabolic aspects related to the leptin signaling in the total hypothalamus of rats in adulthood, verifying possible sex-specific differences. To verify if the stress factor and the chronic consumption of high-fat diet would have effects on cellular metabolism, oxidative and mitochondrial function parameters were also analyzed in the total hypothalamus of these animals in adulthood. The results showed that males and females respond differently to pre-pubertal stress and high-fat diet. Males presented murinometric characteristics that reflect leptin resistance, however the damage in this hormone signaling occurred only partially in hypothalamus, and was mainly influenced by high-fat diet in these animals. On the other hand, females were more susceptible to social isolation in the pre-pubertal period, which led to impaired leptin signaling in adulthood. Interestingly, the alternative pathway of leptin signaling through the hypothalamic-pituitary-thyroid axis remained activated in males. However, the greater release of thyroid hormones in these animals did not have the expected metabolic effects due to the lower conversion of T4 into T3. Although both factors, stress and high-fat diet had different effects in males and females, chronic consumption of high-fat diet had more prominent effects in females when considered mitochondrial function and oxidative parameters. The diet induced an oxidative imbalance that resulted in cellular and mitochondrial damage in females. Generally, this thesis showed that interventions in early stages of individual life may have different outcomes in males and females. Social isolation in the prepubertal period and the chronic consumption of high-fat diet can program the metabolism throughout life. The high-fat diet chronic consumption led to a disturbance in the communication of peripheral and central energetic metabolism in males that led to a phenotype similar to that of obesity in these animals. Females were also more susceptible to high-fat diet, but the impairments were observed in central energy metabolism, which was marked by oxidative imbalance and mitochondrial dysfunctions. Thus, our work highlights the importance of early interventions for long-

term metabolic programming. Additionally, these results may reveal important targets for the elucidation of the mechanisms related to the development of obesity and contribute to the development of new original works that stimulate the development of future therapeutic and preventive measures respecting the particularities of each sex.

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$ = Potencial de membrana mitocondrial

ACTH = Hormônio adrenocorticotrópico

AgRP = Proteína relacionada ao gene cutia

ARC = Núcleo arqueado do hipotálamo

ATP = Adenosina trifosfato

BHE= Barreira hematoencefálica

CAT = Catalase

CRH = Hormônio liberador de corticotropina

DCF = 2', 7'-diclorofluoresceína

DRG = Dieta rica em gordura

EROs = Espécies reativas de oxigênio

FADH₂ = Flavina adenina dinucleotídeo

GCs = Glicocorticoides

GPx = Glutaciona peroxidase

GR = Glutaciona redutase

GSH = Glutaciona reduzida

GSSG = Glutaciona oxidada

GSH = Glutaciona

HHA= Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HHT = Eixo hipotálamo-hipófise-tireoide

JAK 2 = Janus cinase 2

Lep-Rb = Receptor de leptina

Mn-SOD= Superóxido dismutase dependente de manganês

NADH= Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NPY = Neuropeptídeo Y

PGC-1 α = Coativador 1 alfa do peroxissomo proliferador- ativado receptor gama

POMC = Proopiomelanocortina

pSTAT3 = Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 fosforilado

PVN = Núcleo paraventricular

RE α = Receptor de estrógeno alfa

RG = Receptor de glicocorticoide

SNC = Sistema nervoso central

SN = Sistema nervoso

SOCS3 = Supressor de sinalização de citocinas 3

SOD = Superóxido dismutase

STAT3 = Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TSH = Hormônio estimulador da tireóide

T3 = Triiodotironina

T4 = L-tiroxina

TRH = Hormônio liberador de tireotropina

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade: influência de fatores ambientais

A *World Health Organization* (WHO) tem relatado que a obesidade atinge atualmente proporções de epidemia, sendo reconhecida como um dos problemas de saúde pública mais importantes que o mundo enfrenta. Dados epidemiológicos mostram que desde 1975 a obesidade triplicou. No ano de 2016, 650 milhões de adultos com 18 anos ou mais eram obesos, cerca de 41 milhões de crianças menores de 5 anos apresentaram sobrepeso ou obesidade e cerca de 340 milhões de crianças e adolescentes de 5 a 19 anos tinham sobrepeso ou obesidade (WHO). A obesidade é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de várias patologias como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias, vários tipos de câncer, doenças hepáticas entre outras (Knight, 2011).

A obesidade envolve alterações metabólicas centrais e periféricas, como inflamação (Galic et al., 2010, Johnson et al., 2012), estresse oxidativo (Noeman et al., 2011, Matsuda and Shimomura, 2013), disfunção mitocondrial (Heinonen et al., 2015, Putti et al., 2015), apoptose (Pintus et al., 2012), mudanças na barreira hematoencefálica (BHE) (Davidson et al., 2012, Ouyang et al., 2014) e no encéfalo (Convit, 2012, Shefer et al., 2013), principalmente no hipotálamo (Moraes et al., 2009, Convit, 2012, Williams, 2012) e no hipocampo (Boitard et al., 2014, Stranahan, 2015).

A principal causa da obesidade é atribuída ao desequilíbrio entre calorias consumidas e calorias gastas (WHO). Existem diversos fatores que contribuem para esse desequilíbrio, dentre eles o surgimento de um “ambiente obesogênico” (Kaur et al., 2003), no qual mudanças no estilo de vida (Ballal et al., 2010), incluindo o sedentarismo (Stein and Colditz, 2004), o aumento do consumo de dietas ricas em gordura (DRG) (Buettner et al., 2007, Hariri and Thibault, 2010) e o estresse (Huneault

et al., 2011) estão altamente envolvidos. Estudos mostram que o consumo de DRG podem induzir a obesidade em humanos (Jequier, 2002) e em animais (Ghibaudi et al., 2002). Modelos animais mostram que o início precoce e o consumo crônico de DRG induzem a obesidade de forma mais efetiva (Peckham and Entenman, 1962). O estresse em períodos precoces é outro fator ambiental relacionado ao fenótipo da obesidade. Evidências têm mostrado que crianças vítimas de abuso infantil apresentam maior tendência de desenvolver a obesidade. Nesse sentido, crianças expostas a situações adversas têm maior facilidade de se tornarem “comedores emocionais” (comem para atenuar emoções negativas), hábito que pode persistir até a idade adulta (Kent et al., 1999). Em humanos, o estresse crônico é um importante modulador do comportamento alimentar, favorecendo a preferência por alimentos palatáveis e com grande densidade energética, além de estar associado com o ganho de peso especialmente em homens (Torres and Nowson, 2007).

O controle do balanço energético é modulado por um complexo sistema, localizado principalmente em neurônios hipotalâmicos (Velloso and Schwartz, 2011). Situações como o consumo alimentar excessivo podem potencialmente levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode resultar em danos mitocondriais (Patti and Corvera, 2010, Frohnert and Bernlohr, 2013). Especialmente no hipotálamo, a liberação de EROs pode ocorrer pelo estímulo de adipocinas (leptina), neurotransmissores e nutrientes (glicose e lipídios), e tem grande influência no controle do metabolismo energético (Drougard et al., 2015). Alterações na função sinalizadora das EROS pode contribuir para a maior susceptibilidade de se desenvolver patologias como obesidade e diabetes tipo II (Drougard et al., 2015).

1.2 Fatores ambientais durante o desenvolvimento podem programar sistemas encefálicos e metabólicos

O desenvolvimento estrutural e funcional encefálico acontece por processos não – lineares (Gogtay et al., 2004) envolvendo períodos de vulnerabilidade a fatores potencialmente causadores de dano (Andersen, 2003). Nessas fases críticas do desenvolvimento, fatores genéticos interagem com fatores ambientais para estabelecer as características funcionais individuais (Crews et al., 2007, Giedd et al., 2009). As fases do nascimento até a idade adulta são marcadas por grande desenvolvimento físico, comportamental, cognitivo, emocional e intensa maturação encefálica (De Bellis and Keshavan, 2003). Especialmente no período neonatal, infância e na adolescência, o sistema nervoso está passando por processos críticos de maturação com intensa organização da arquitetura das redes neurais envolvendo proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose (Rice and Barone, 2000, Ismail et al., 2017). Durante esses períodos de grande plasticidade, o organismo pode se desenvolver em distintas direções, pois possui um grande potencial de se adaptar ao ambiente (Remmers and Delemarre-van de Waal, 2011). Assim, a exposição a fatores ambientais em períodos precoces, pode contribuir para processos adaptativos positivos semelhantes aos da resiliência, promovendo estratégias de enfrentamento e a possibilidade de recuperação de danos anteriores (Marco et al., 2011), ou contribuir para desfechos negativos e influenciar na susceptibilidade de desenvolver patologias psiquiátricas ao longo da vida (Cirulli et al., 2009, Lavoie et al., 2016).

O ambiente em períodos precoces envolve diversos elementos, incluindo o estímulo sensorial materno, sinais neuroendócrinos e de nutrição (Joels and Baram, 2009, Baram et al., 2012, Lucassen et al., 2013), e mudanças nesses elementos podem levar a alterações estruturais e funcionais duradouras no encéfalo (Lupien et al., 2009,

Teicher et al., 2012). Estudos têm mostrado que o abuso ou a negligência durante a infância podem contribuir para alterações neuroestruturais como diminuição no volume do hipocampo (Bremner et al., 1997, Vythilingam et al., 2002), redução no corpo caloso (Sheridan et al., 2012) e no córtex pré-frontal (De Bellis et al., 2002), assim como no volume da amígdala (Tottenham et al., 2010).

Nesse contexto, a exposição a estressores em fases precoces pode alterar a programação neural e levar a mudanças nas respostas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) em longo prazo. Em humanos, a exposição a estressores em fases precoces aumenta a reatividade do eixo HHA (Tyrka et al., 2008, Lupien et al., 2009, Pesonen et al., 2010) e facilita o desenvolvimento de prejuízos cognitivos e emocionais na idade adulta (Heim et al., 2008, Loman et al., 2010). Outro alvo da influência de fatores ambientais em idades precoces é a programação metabólica, de modo a modificar a susceptibilidade do indivíduo em desenvolver alterações metabólicas (Martin-Gronert and Ozanne, 2013). Experimentos com modelos animais mostram que as regiões do sistema nervoso que regulam o equilíbrio energético permanecem se desenvolvendo até o período pós-natal, sofrendo a influência de estímulos ambientais e sinais endócrinos (Mainardi et al., 2010, Remmers and Delemarre-van de Waal, 2011). A imaturidade funcional e estrutural desse sistema durante a infância, em roedores (Bouret et al., 2004, Mainardi et al., 2010) e humanos (Dietz, 1994), torna essa fase altamente sensível aos efeitos de fatores ambientais. Recentemente, os fatores dieta (Teegarden et al., 2009) e o estresse social (Danese and Tan, 2014) na infância foram investigados como importantes determinantes no desenvolvimento da obesidade em longo prazo. Estressores durante as fases iniciais da vida apresentam potentes efeitos sobre o sistema endócrino-metabólico (Schmidt et al., 2009). Nesse sentido, diversos estudos mostram a associação de experiências adversas durante a infância e o

desenvolvimento da obesidade na idade adulta (Felitti et al., 1998, Gustafson and Sarwer, 2004, Fuemmeler et al., 2009, Danese and Tan, 2014). Em ratos, um estudo mostrou que a exposição precoce a um estressor levou a alterações na distribuição de gordura, resultando em uma razão de gordura visceral/subcutânea aumentada na idade adulta (Schmidt et al., 2009).

Ao atuar em sistemas em plena maturação durante o desenvolvimento, fatores como estresse e dieta podem exercer efeitos persistentes sobre a programação encefálica e metabólica, associados a mudanças permanentes no comportamento alimentar e à predisposição à obesidade na idade adulta (Bouret et al., 2004, Frazier et al., 2008, Teegarden et al., 2009, Remmers and Delemarre-van de Waal, 2011). Estudos com humanos e animais têm mostrado que perturbações no estado nutricional em fases precoces podem causar prejuízos em sistemas periféricos em longo prazo, podendo modular o estoque de gordura e a utilização de nutrientes, tornando o indivíduo mais susceptível a desenvolver a obesidade (Martin-Gronert and Ozanne, 2013). Por exemplo, o consumo crônico e precoce de alimentos ricos em gordura pode causar o aumento de gordura abdominal assim como modificar as respostas de circuitos neuroendócrinos na idade adulta, tal como a diminuição nos receptores de leptina no hipotálamo, associada à hiperleptinemia (Boukouvelas et al., 2010).

Assim, é importante ressaltar que intervenções ambientais precoces podem alterar a maturação de circuitos encefálicos com efeitos em longo prazo e assim influenciar na maior susceptibilidade a patologias ao longo da vida.

1.3 Período pré-púbere: vulnerabilidade ao estresse social

O período da pré-puberdade se inicia cronologicamente após o desmame em roedores, por volta do 21º dia pós-natal, e finaliza por volta do 30º dia pós-natal. Em

humanos, esse período corresponde ao final da infância, por volta dos 8-10 anos de idade (Eiland and Romeo, 2013). Durante este período do desenvolvimento, os animais sofrem contínuas mudanças neurológicas e físicas, com aumento da força, alterações na função imunológica (Dahl, 2004), no comportamento social, e grande plasticidade encefálica (Paus et al., 2008), além de ser um período marcado por mudanças que precedem a maturidade sexual (McCormick and Mathews, 2007). Este período também é reconhecido como uma fase de vulnerabilidade para a maturação de circuitos neuronais que controlam a homeostase energética e as respostas ao estresse (McCormick and Mathews, 2007).

Os processos de remodelamento, maturação e plasticidade variam em diferentes regiões encefálicas durante o desenvolvimento (Rice and Barone, 2000, Andersen, 2003). Na pré-puberdade, estruturas envolvidas na modulação das respostas ao estresse na idade adulta, como córtex frontal e hipocampo, continuam em processos de maturação (Ulrich-Lai and Herman, 2009). Nesse contexto, estudos utilizando ressonância magnética demonstraram que o córtex pré-frontal possui uma maturação tardia, com aumentos nos volumes corticais frontais e temporais que são observados desde a infância até o início da puberdade (Gogtay et al., 2004). No hipocampo, o processo de neurogênese acontece da gestação até a idade adulta (Paizanis et al., 2007). O hipotálamo, estrutura envolvida com a homeostase energética, permanece em desenvolvimento no período pós-natal (até o final da terceira semana de vida) (Bouret, 2010) e a maturação das sinapses se prolonga do nascimento até a idade adulta em roedores (Melnick et al., 2007).

A exposição a experiências adversas ou estressores durante essa fase de intensa plasticidade pode ter efeitos marcantes sobre o comportamento social e cognitivo.

Grande parte das experiências estressantes durante a pré-puberdade envolve o contexto social (McCormick et al., 2008). Em roedores, os estímulos sociais na infância e na adolescência são essenciais para o desenvolvimento socioemocional normal (Douglas et al., 2004, Panksepp et al., 2007, Panksepp and Lahvis, 2007), quando grande parte do tempo é investido no convívio social (Douglas et al., 2004) e novas relações sociais estão sendo estabelecidas (van den Berg et al., 1999). O comportamento de brincadeira é uma das primeiras formas de interação social, sendo fundamental para o posterior desenvolvimento social normal (Von Frijtag et al., 2002) e indispensável para ratos lidarem com desafios sociais (van den Berg et al., 1999).

Assim como ocorre em roedores, em humanos, os estímulos sociais, incluindo relações familiares apropriadas (Heim and Nemeroff, 2002, Teicher et al., 2006), são essenciais para o desenvolvimento socioemocional normal na infância e na adolescência (Pagani et al., 2010), quando interações sociais são altamente gratificantes. Desse modo, desafios e mudanças nesse ambiente social podem contribuir para psicopatologias ao longo da vida (Rose and Rudolph, 2006).

Nesse sentido, o isolamento social é considerado um potente estressor durante a pré-puberdade para humanos (Jones et al., 2011) e roedores (Panksepp et al., 2007) podendo causar alterações persistentes em longo prazo (Lukkes et al., 2009a, Lukkes et al., 2009b, Lukkes et al., 2009c). Em modelos animais o isolamento social é considerado aversivo pois, no ambiente natural, roedores são altamente gregários, vivem em grupos e possuem um sistema social bastante organizado (Panksepp et al., 2007). Esse estressor, em períodos precoces, pode repercutir em alterações periféricas, neuroquímicas e comportamentais descritas como “síndrome do isolamento”, caracterizada por estado de hiperatividade, neofobia, prejuízos sensório-motores e

comportamentos perseverativos (Valzelli, 1973). Essas alterações causadas pelo isolamento social podem ter efeitos a longo-prazo sobre a atividade do eixo HHA (Weiss et al., 2004, Ferdman et al., 2007), com diferentes consequências para machos e fêmeas (McCormick and Mathews, 2007, Krolow et al., 2013a). Estudos mostram que o isolamento social crônico após o desmame pode ter efeitos sexo-específicos em longo prazo, causando aumento nos níveis de corticosterona e na atividade locomotora (Jahng et al., 2012), assim como aumento no consumo de alimentos altamente palatáveis (Jahng et al., 2012). Além disso, foram observadas alterações morfológicas como redução do volume do córtex pré-frontal, e diminuição na plasticidade sináptica cortical e hipocampal associadas com a hiperfunção do sistema mesolímbico dopaminérgico em ratos isolados após o desmame (Fone and Porkess, 2008).

Entretanto, é importante ressaltar que a maioria dos estudos, inclusive os citados acima, utilizam uma exposição ao isolamento social de longo prazo, iniciando-se logo após o desmame e perdurando até a idade adulta. Poucos trabalhos investigam os efeitos de uma exposição mais curta ao isolamento social, apenas no período pré-púbere. O isolamento realizado em período mais curto permite uma transposição mais fidedigna ao que acontece com humanos expostos a esse estressor, visto que são raros os casos de um isolamento social por toda a vida.

Estudos em humanos têm demonstrado que crianças institucionalizadas apresentam frequentemente comprometimento comportamental e no desenvolvimento encefálico (Tottenham et al., 2010, McLaughlin et al., 2014). Dentre os transtornos comportamentais foram evidenciados sintomas de déficit de atenção/ hiperatividade, ansiedade, depressão, impulsividade e prejuízos cognitivos (Chugani et al., 2001, McLaughlin et al., 2010). Adicionalmente, estudos demonstraram que crianças que se

afastaram do convívio social após ser vítimas de “bullying” apresentaram transtornos emocionais como a depressão, ansiedade e diminuída autoestima (Gladstone et al., 2006).

1.4 A resposta ao estresse

O meio no qual o indivíduo está inserido aplica continuamente desafios ao equilíbrio homeostático do organismo. O estresse pode ser definido como um desafio interno ou externo ao indivíduo que tem o potencial de perturbar a homeostase, estimulando respostas adaptativas do organismo (Tsigos and Chrousos, 2002). A exposição ao estresse ativa sistemas fisiológicos que incluem respostas neurovegetativas, imunológicas e comportamentais, visando restaurar o controle homeostático e facilitar a adaptação (Tsigos and Chrousos, 2002). As respostas fisiológicas ao estresse são efetuadas por dois sistemas distintos: 1) a ativação do sistema nervoso simpático que resulta na liberação de noradrenalina em diversos tecidos e de adrenalina pela glândula adrenal, modulando respostas imediatas, de “luta ou fuga” ao estresse; 2) e a ativação do eixo HHA, que inicia com a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) dos núcleos paraventriculares (PVN) no hipotálamo, que, posteriormente, estimula a hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH, por sua vez, é liberado para a circulação e age estimulando o córtex das glândulas adrenais a liberar glicocorticoides (GCs) na circulação (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) (Tsigos and Chrousos, 2002, McCormick et al., 2010). Os GCs exercem diversas ações em todo organismo. Em resposta a um estressor, aumentam a disponibilidade e distribuição de substratos energéticos (aumentam a gliconeogênese hepática e a glicose plasmática, induzem a lipólise, aumentam a degradação proteica) para atender às demandas metabólicas

representadas pelo estressor e tem ação imunossupressora (Chrousos, 1995, Barnes, 1998, Kyrou et al., 2006, Peckett et al., 2011). Contudo, uma exposição prolongada a altos níveis de GCs pode causar alterações indesejadas e ter efeitos nocivos em vários sistemas, incluindo o sistema nervoso central (SNC) (McEwen, 2000). Especialmente no SNC os GCs estão envolvidos na síntese de proteínas, excitabilidade neural, no metabolismo de neurotransmissores, na neurogênese, na sinaptogênese, na morfologia dendrítica e na morte celular (McEwen, 2000, Joels, 2008).

Além disso, os GCs fazem um controle inibitório do eixo HHA através de um mecanismo de retroalimentação negativa que acontece pela ligação dos GCs a seus receptores (RG), localizados em distintas regiões do SNC que participam do controle do eixo, incluindo o hipotálamo, hipocampo e córtex pré-frontal (Charmandari et al., 2003). Os GCs são hormônios esteróides altamente lipossolúveis que atravessam as membranas da célula e se ligam a seus receptores no citoplasma, os quais, ao serem ativados, se translocam do citosol para o núcleo onde se ligam a elementos responsivos aos GCs presentes no ADN, e assim exercem o seu papel de regulação transicional em vários genes (Pariante and Miller, 2001).

Estudos *in vivo* e *in vitro* utilizando fígado de ratos documentaram que os RG translocam não somente para o núcleo, mas também para a mitocôndria, e assim esses receptores podem regular o genoma mitocondrial (Demonacos et al., 1993). A modulação da função metabólica mitocondrial por GCs é bifásica: no músculo, a exposição em curto prazo a esse hormônio esteroide foi associada ao aumento da biogênese mitocondrial e da atividade enzimática de algumas subunidades dos complexos da cadeia respiratória. Por outro lado, a exposição prolongada aos GCs podem levar a disfunções na cadeia respiratória., aumento da produção de EROs,

alterações estruturais mitocondriais, apoptose e morte celular (Orzechowski et al., 2002, Duclos et al., 2004).

A ativação do eixo HHA é um mecanismo adaptativo acionado para manter a estabilidade fisiológica (Korte et al., 2005) e favorecer a sobrevivência frente a um estressor (Tsigos and Chrousos, 2002). Entretanto, a ativação prolongada desse sistema pode levar a consequências mal adaptativas, por exemplo, depressão, anorexia nervosa, desnutrição, transtorno obsessivo compulsivo, ansiedade, diabetes mellitus e maior propensão à obesidade (Charmandari et al., 2003, Pervanidou and Chrousos, 2012). Além disso, a ativação crônica do eixo HHA está associada com aumento da gordura visceral e diminuição da massa magra (músculo e ossos), resistência à insulina, redução na produção de hormônio estimulador da tireoide (TSH) e a inibição da conversão periférica da L- tiroxina (T4) para a triiodotironina (T3) (Kyrou et al., 2006).

Os efeitos da exposição ao estresse e seus consequentes desfechos depende da natureza do estressor, da duração (agudo ou crônico), da gravidade, do período do desenvolvimento em que acontece a exposição ao estressor, do gênero assim como das respostas individuais ao estressor (Amat et al., 2010, Lucas et al., 2014). A magnitude e a duração das respostas ao estresse variam durante o desenvolvimento (Romeo et al., 2006b): o eixo HHA está em maturação durante a pré-puberdade e a adolescência e a exposição a estressores durante esses períodos pode alterar a maturação desse sistema, assim como das respostas ao estresse em longo prazo. Estudos têm salientado as diferenças das respostas a estressores em diferentes períodos do desenvolvimento (McCormick et al., 2010): animais expostos a um estresse agudo durante o período pré-púbere apresentam uma liberação mais prolongada de corticosterona e ACTH comparados a adultos (Goldman et al., 1973, Romeo et al., 2004a, Romeo et al., 2004b,

Romeo and McEwen, 2006), possivelmente devido à maturação incompleta do sistema de retroalimentação negativa do eixo (Goldman et al., 1973). Por outro lado, após a exposição a um estresse crônico, ratos no período pré-púbere apresentaram uma resposta aumentada logo após o estresse, porém, retornaram rapidamente aos níveis basais quando comparados com adultos (Romeo et al., 2006a). As respostas ao estresse também podem ser moduladas por uma exposição prévia a um estressor. Animais adultos expostos repetidamente a um único tipo de estressor apresentam uma reatividade diminuída a esse mesmo estressor, enquanto pré-adolescentes na mesma situação não apresentam uma adaptação, sendo mais vulneráveis ao estressor (Bhatnagar et al., 2002). Além disso, hormônios sexuais podem modular o eixo HHA durante o desenvolvimento repercutindo em diferentes respostas a estressores para machos e fêmeas (McCormick and Mathews, 2007). Na pré-puberdade, não são observados efeitos dos hormônios sexuais modulando as respostas ao estresse, porém na idade adulta o estradiol tende a potencializar a atividade do eixo HHA e os andrógenos tendem a inibir a liberação de corticosterona (Young et al., 2001, McCormick and Mathews, 2007). Além disso, fêmeas adultas apresentam aumento nos níveis de ACTH e corticosterona, tanto basais quanto induzidos pelo estresse, se comparadas aos machos (McCormick and Mathews, 2007).

1.5 Estresse e comportamento alimentar

Fatores internos e externos podem influenciar no apetite, na quantidade e na escolha dos alimentos (Torres and Nowson, 2007). Os fatores internos incluem mecanismos que regulam o apetite, por exemplo o neuropeptídeo Y (NPY) e a leptina (Levine and Billington, 1997, Blundell et al., 2001). Fatores externos incluem fatores ambientais, fatores sociais, palatabilidade dos alimentos e o estresse (Pliner and Mann,

2004, Popkin et al., 2005). A exposição ao estresse (durante o desenvolvimento ou na idade adulta) foi associada a alterações no comportamento alimentar (Ely et al., 1997). Estudos com animais e com humanos demonstram que, dependendo da intensidade e da duração da exposição ao estresse, podem ser induzidos o aumento ou a diminuição da ingestão alimentar (Marti et al., 1994, Ely et al., 1997, Silveira et al., 2000).

Em humanos, o estresse afeta o comportamento alimentar de forma bidirecional, cerca de 30% dos indivíduos apresentam diminuição do consumo alimentar e no peso corporal durante ou após um estressor, enquanto que a maioria dos indivíduos aumenta o consumo alimentar durante a exposição ao estressor (Epel et al., 2004), em especial de alimentos palatáveis, altamente calóricos e ricos em açúcares e gorduras (Tomiyama et al., 2011, Tryon et al., 2013). Em roedores, essa preferência por alimentos confortantes (“comfort foods”) também é observada (Pecoraro et al., 2004) e camundongos, por exemplo, apresentaram uma preferência pela DRG quando expostos a um estressor (Teegarden and Bale, 2008). Além disso, os efeitos da escolha de alimentos altamente calóricos, em resposta ao estresse, pode ser diferente entre os sexos (Zylan and Brown, 1996, Liang et al., 2007). Alguns grupos de pesquisa hipotetizam que a preferência pelo consumo de alimentos confortantes está associada ao excesso de GCs liberados em resposta a um estímulo crônico do eixo HHA pelo estresse (Pecoraro et al., 2004). Nesse sentido, o aumento da ingestão desses alimentos funcionaria como um mecanismo adaptativo para reduzir a resposta desse eixo ao estresse (Pecoraro et al., 2004). No entanto, o tipo de dieta consumida pode influenciar diferentemente a atividade do eixo HHA; dietas ricas em carboidrato e gordura, parecem reduzir a atividade do eixo HHA frente a um estressor crônico (Pecoraro et al., 2004); por outro lado, a exposição contínua à DRG podem realçar os níveis de GCs, agindo como um fator estressor (Tannenbaum et al., 1997, Hryhorczuk et al., 2017). Contudo, existem

dados da literatura que ainda divergem sobre a ação de DRG sobre o eixo HHA, pois diferentes composições e tempos de exposição a essas dietas podem levar a desfechos distintos (Auvinen et al., 2011).

O maior consumo de alimentos confortantes, e sobretudo, o consumo crônico de DRG como resposta ao estresse pode contribuir para o aumento da prevalência da obesidade, assim como para distúrbios metabólicos incluindo a hiperglicemia, resistência à insulina, mudanças nos níveis de adipocinas (leptina e adiponectina) (Buettner et al., 2007), além de repercutir em aumento no ganho de peso e na gordura abdominal (Hariri and Thibault, 2010).

1.6 Ação de adipocinas na homeostase metabólica

O excesso de energia fornecido pela ingestão de DRG ultrapassa a perda energética, e animais tendem a armazenar esse excesso de energia na forma de gordura corporal, particularmente no tecido adiposo (de Ferranti and Mozaffarian, 2008). O tecido adiposo foi reconhecido como um órgão endócrino que influencia no metabolismo via liberação de adipocinas, incluindo a leptina e a adiponectina. Esses hormônios atuam no sistema nervoso (SN) e regulam o balanço energético ao influenciarem ambos, o consumo alimentar e o gasto energético (Henry and Clarke, 2008). A adiponectina possui propriedades antiaterogênicas, anti-inflamatórias e anti-diabéticas (Okamoto et al., 2006) e sua ação é mediada pelos receptores de adiponectina 1 e 2 (Adipo R1 e Adipo R2), os quais estão presentes em regiões do hipotálamo (Kos et al., 2007). Dessa forma, a adiponectina pode influenciar regiões do hipotálamo responsáveis pela regulação do apetite e pela homeostase energética (Henry and Clarke, 2008). Em ratos, os dados da literatura a respeito dos efeitos da adiponectina sobre o balanço energético ainda são conflitantes: estudos têm mostrado que a adiponectina

pode reduzir (Shklyayev et al., 2003) ou aumentar (Kubota et al., 2007) o consumo alimentar assim como pode aumentar (Qi et al., 2004) ou diminuir a perda energética (Kubota et al., 2007). Em humanos, os níveis plasmáticos de adiponectina são inversamente proporcionais ao ganho de peso, à gordura corporal e à resistência à insulina (Scherer, 2006). Além disso, os níveis de adiponectina são diminuídos em indivíduos obesos, particularmente na obesidade visceral (Reinehr et al., 2004, Okamoto et al., 2006).

A leptina, secretada na circulação em proporção ao volume de tecido adiposo branco, se liga a seus receptores (Lep-Rb) em núcleos específicos no hipotálamo e assim regula o balanço energético, reduzindo o apetite e aumentando o gasto energético (Trayhurn and Bing, 2006). Em níveis adequados, a leptina sinaliza para neurônios hipotalâmicos sobre as reservas de gordura e assim modula o consumo alimentar (Lustig, 2001). Por outro lado, em situações em que a sinalização ou a sensibilidade à leptina estão prejudicadas, alterações na homeostase energética podem advir (Sainz et al., 2015). Estudos com humanos têm evidenciado que os níveis circulantes de leptina são diferentes entre homens e mulheres (Saad et al., 1997). Experimentos, utilizando modelos animais têm mostrado que machos apresentam maiores níveis de leptina comparados a fêmeas (Mulet et al., 2003) e que fêmeas são mais sensíveis aos efeitos da leptina do que machos (Clegg et al., 2003). Em ratos, machos diferem de fêmeas no estoque de gordura, nos hormônios secretados em proporção a essa gordura e também na forma como o encéfalo responde aos sinais que regulam o consumo alimentar e o ganho de peso (Valle et al., 2005, Shi et al., 2009).

Em humanos e animais obesos os níveis plasmáticos de leptina são elevados, porém, não diminuem o consumo alimentar, nem aumentam o gasto energético. Essa

condição de hiperleptinemia é associada à resistência à leptina (Hamann and Matthaei, 1996, Wunderlich et al., 2013), que pode envolver várias possibilidades: (1) diminuição no transporte da leptina através da BHE (Caro et al., 1996, Banks et al., 1999), (2) redução na expressão dos receptores de leptina (Martin et al., 2000), (3) dessensibilização central e periférica à sinalização da leptina (Munzberg et al., 2005, Munzberg and Myers, 2005) e (4) alterações em etapas das rotas de sinalização da leptina nos neurônios (Martin et al., 2000). Classicamente, a leptina regula o consumo alimentar e a homeostase energética por meio da via JAK-STAT3 (Kwon et al., 2016) (ver Figura 1). A leptina circulante atravessa a BHE usando um transportador, e, ao se ligar aos seus receptores (Lep-Rb), induz uma modificação conformacional e uma dimerização no seu receptor promovendo a ativação da janus cinase 2 (JAK2) e sua auto-fosforilação (Sainz et al., 2015). A JAK2, por sua vez, fosforila três resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do receptor (Aragones et al., 2016). A tirosina 1138 fosforilada recruta o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) que também é fosforilado. Posteriormente, o STAT3 fosforilado dimeriza e transloca do citoplasma para o núcleo onde liga-se a elementos responsivos no DNA (Ladyman and Grattan, 2013). Alguns elementos transcrpcionais aos quais o STAT3 fosforilado liga-se regulam a transcrição de genes que codificam o supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3), a proopiomelanocortina (POMC) e o hormônio liberador de tireotropina (TRH) (Ladyman and Grattan, 2013). O aumento da transcrição de SOCS3, via um mecanismo de retroalimentação negativa, atenua a sinalização da leptina (Bjorbaek et al., 1999) e pode ser considerado um mecanismo de resistência à leptina (Enriori et al., 2007).

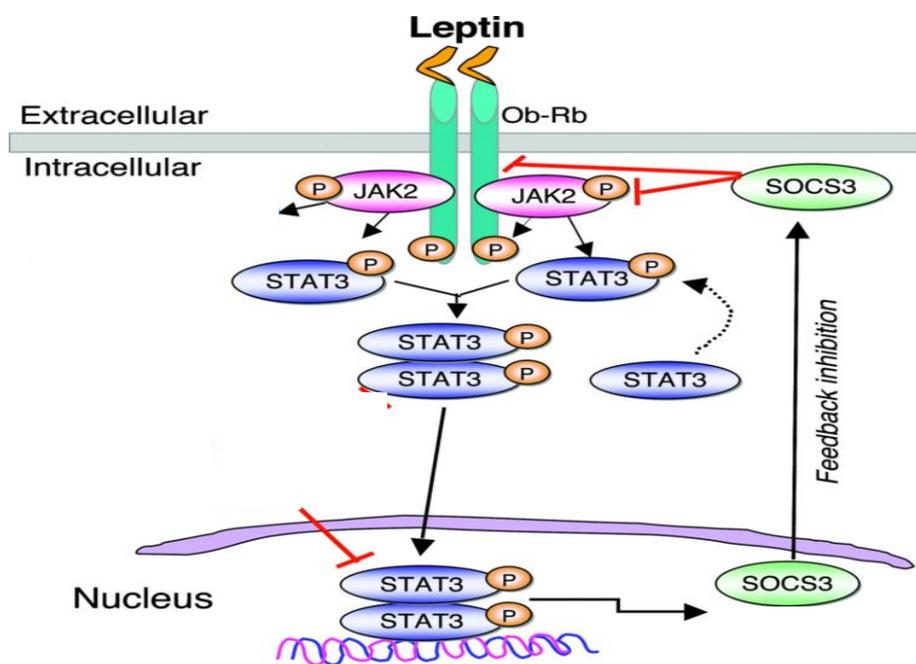


Figura 1) Sinalização da leptina via JAK2-STAT3 (Adaptado de Abhiram Sahu et al, 2003)

Alguns fatores podem contribuir para a resistência à leptina, incluindo processos inflamatórios, estresse oxidativo (Leon-Cabrera et al., 2013) e o tipo (Shapiro et al., 2011) e a duração da dieta ingerida (Haring and Harris, 2011, Shapiro et al., 2011). Em modelos animais, o consumo de DRG têm sido associado com processos de resistência periférica e central à leptina (Knight et al., 2010). Centralmente, estudos apontam que a resistência à leptina induzida por uma DRG pode acontecer em algumas áreas específicas do hipotálamo (como no núcleo arqueado) e também na área tegmentar ventral, enquanto outras regiões permanecem sensíveis a esse hormônio (Matheny et al., 2011). Além disso, outras investigações têm mostrado que fatores ambientais como o estresse precoce (Zannas and West, 2014, Seo et al., 2016) e DRG (Funato et al., 2011)

podem causar alterações epigenéticas através de mediadores como a histona desacetilase 5 (HDAC5), de modo a afetar a sinalização da leptina inclusive no hipotálamo (Kabra et al., 2016). A leptina também controla o gasto energético e o ganho de peso por modulação direta ou indireta do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HHT). De forma direta, a leptina induz a fosforilação do STAT3 em neurônios TRH no PVN, e ao se translocar para o núcleo o fosfo-STAT3 regula a transcrição do TRH (Guo et al., 2004). Indiretamente, a leptina aumenta a expressão da POMC e inibe a expressão do NPY e da proteína relacionada ao gene agouti (AgRP) no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo (Harris et al., 2001, Ghamari-Langroudi et al., 2010). Alguns trabalhos sugerem que a via indireta fica inativa em animais obesos devido ao consumo de uma DRG, o que é atribuído ao desenvolvimento de resistência à leptina (Perello et al., 2010). Apesar disso, em humanos e roedores obesos, a atividade do eixo HHT permanece em níveis normais ou ligeiramente aumentados (Perello et al., 2010), sugerindo que a via direta permanece ativa nesses animais. Além disso, a resistência à leptina parece se desenvolver de forma distinta em diferentes regiões do sistema nervoso (Perello et al., 2010).

A ativação do eixo HHT leva a um aumento do TRH que ativa a hipófise anterior a liberar o hormônio estimulador da tireoide (TSH) que posteriormente estimula a tireoide a liberar os hormônios tetraiodotironina (T4) e triiodotironina (T3) na circulação. Esses hormônios, através de retroalimentação negativa regulam o eixo HHT (Ghamari-Langroudi et al., 2010). Contudo, a disponibilidade plasmática e tecidual desses hormônios depende da conversão do T4 em T3 através das enzimas iodotironina desiodinases (St Germain et al., 2009). O T3, a forma mais ativa desse hormônio, é responsável por promover a termogênese e o gasto de energia, regular o consumo alimentar e o metabolismo da glicose e de lipídeos (Reinehr, 2010). Assim,

desregulações no eixo HHT levam a alterações no balanço energético. Estudos com roedores mostraram que o consumo crônico de uma DRG pode afetar a estrutura da glândula tireóide e por consequência causar disfunções na produção de T4 e T3 (Shao et al., 2014). Além disso, estudos têm mostrado que GCs podem afetar os níveis circulantes dos hormônios da tireóide, assim como afetar a desiodinação em tecidos periféricos e levar à redução nos níveis circulantes de T3 (Van der Geyten and Darras, 2005).

1.7 Fatores ambientais: efeitos sobre as mitocôndrias

As mitocôndrias são organelas importantes para a manutenção da homeostase e sobrevivência celular, pois são responsáveis pela maior parte da produção de adenosina trifosfato (ATP), além de ser o local de várias rotas metabólicas, incluindo a β -oxidação de ácidos graxos, o ciclo do ácido tricarboxílico e parte do ciclo da ureia (Manoli et al., 2007). A principal função das mitocôndrias é produzir ATP a partir de substratos provindos dos alimentos, tais como carboidratos, lipídeos e proteínas (Cheng and Ristow, 2013), por meio da cadeia transportadora de elétrons e da fosforilação oxidativa. Estruturalmente, as mitocôndrias são compostas por duas membranas: uma externa lisa que reveste o espaço intermembranas e outra interna, com múltiplas invaginações, denominadas cristas mitocondriais. Dentre outras proteínas, aderidos às cristas estão os complexos de proteínas que compõem a cadeia respiratória: complexo I (NADH: ubiquinona oxidorreductase), complexo II (succinato: ubiquinona oxidorreductase), complexo III (ubiquinol: citocromo *c* oxidorreductase), complexo IV (citocromo *c* oxidase), além da ATP sintase, codificados a partir de genes do genoma mitocondrial e nuclear (Mattson et al., 2008). Em condições aeróbicas, elétrons provindos da glicose ou da oxidação de ácidos graxos são transferidos de forma

gradativa pelos complexos até o acceptor final, o oxigênio molecular, que é posteriormente convertido em H₂O. A passagem de elétrons através dos complexos enzimáticos I, II, III e IV é acoplada ao bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um gradiente eletroquímico, responsável por manter o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), que direciona o fluxo de prótons de volta à matriz mitocondrial através da ATP sintase, para produzir ATP (Fox et al., 1993). Adicionalmente, a mitocôndria ajuda a controlar o cálcio intracelular (Baydoun et al., 1990), inicia processos de apoptose e regula a produção de EROs (Wallace et al., 1995).

Devido ao seu importante papel na fisiologia celular, a mitocôndria é uma das principais organelas a responder ao estresse. Os mediadores do estresse (GCs e catecolaminas), através de seus receptores na mitocôndria, podem ter efeitos sobre a biogênese mitocondrial, metabolismo e produção de EROs (Manoli et al., 2007). A ação dos GCs modulando as atividades metabólicas mitocondriais acontece de forma bifásica: a exposição de curto prazo aos GCs é associada com o aumento da biogênese mitocondrial e da atividade das subunidades dos complexos da cadeia transportadora de elétrons; entretanto, a exposição prolongada aos GCs pode causar disfunções na atividade da cadeia transportadora de elétrons, aumento da produção de EROs, alterações estruturais mitocondriais, apoptose e morte celular (Manoli et al., 2007). Animais expostos a um estressor crônicamente apresentam diminuição na atividade dos complexos I, III e IV da cadeia transportadora de elétrons (Rezin et al., 2008). Além disso, estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a exposição ao isolamento social, durante períodos precoces, induziu diferentes respostas mitocondriais dependendo da região do encéfalo analisada (Krolow et al., 2012, Krolow et al., 2013b).

Como exposto anteriormente, ambos os fatores, exposição ao estresse e o acesso a DRG influenciam a liberação de GCs, e portanto podem modular a atividade mitocondrial. Em modelos animais, o consumo de DRG têm sido associado com o aumento na produção de EROs, diminuição na fosforilação oxidativa, desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons, redução na produção de ATP (Boudina et al., 2007, Fink et al., 2007, Wang et al., 2012, Pires et al., 2014) e diminuição no número de mitocôndrias (Civitarese et al., 2007). O consumo por períodos longos de dietas ricas em lipídeos e carboidratos também parecem alterar o funcionamento mitocondrial no tecido muscular de ratos (Bonnard et al., 2008). Estudos com humanos mostram que o consumo de DRG reduziu a expressão de genes relacionados a proteínas da cadeia transportadora de elétrons e à biogênese mitocondrial no tecido muscular (Sparks et al., 2005). Além disso, o consumo excessivo de nutrientes, como observado na obesidade, pode causar disfunções mitocondriais e conseqüentemente afetar o metabolismo de lipídeos e da glicose (Bournat and Brown, 2010). Observa-se que o encéfalo é especialmente vulnerável a disfunções mitocondriais devido a sua alta demanda energética, além de ser uma estrutura sensível às EROs devido ao seu reduzido sistema antioxidante (Halliwell, 1992).

1.8 Estresse oxidativo

A mitocôndria gera EROs durante a produção de ATP pela cadeia transportadora de elétrons (Alfadda and Sallam, 2012). Durante o transporte de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons, parte dos elétrons escapa da cadeia transportadora de elétrons, causando a redução incompleta do oxigênio molecular, formando espécies reativas, incluindo o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (Halliwell, 2006). O controle do status redox da célula é

realizado por um sistema antioxidante composto por defesas não-enzimáticas (vitaminas E e C, carotenoides, ácido úrico e a glutatona) e defesas enzimáticas (superóxido dismutase - SOD; glutatona peroxidase - GPx; catalase - CAT). O radical superóxido produzido pela cadeia transportadora de elétrons, incapaz de difundir para o citosol, é detoxificado pela enzima superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD), presente no interior da mitocôndria, gerando H_2O_2 . O H_2O_2 é detoxificado pela GPx e pela CAT nos peroxissomos, produzindo água e oxigênio. A GPx detoxifica peróxidos usando a glutatona reduzida (GSH), a qual atua como doadora de elétrons em uma reação redox, produzindo glutatona oxidada (GSSG). A redução da GSSG é catalisada pela glutatona redutase (GR) em um processo que requer NADPH (Townsend et al., 2003). Uma razão adequada GSH/GSSG é essencial para a sobrevivência celular, sendo que a deficiência de GSH pode levar a dano oxidativo (Townsend et al., 2003).

O desequilíbrio entre a geração de EROs e as defesas antioxidantes, favorecendo o excesso de EROs, é denominado estresse oxidativo (Birben et al., 2012, Brieger et al., 2012). Em baixos níveis, as EROs funcionam como moléculas necessárias para processos de sinalização. Entretanto, em níveis elevados, podem levar ao estresse oxidativo (Uttara et al., 2009). Fatores ambientais podem influenciar esse equilíbrio e levar ao estresse oxidativo. O desequilíbrio energético devido ao consumo excessivo de alimentos pode contribuir para o aumento da produção de EROs, que por sua vez pode levar a disfunções mitocondriais (Patti and Corvera, 2010). Em especial, o consumo de DRG por curtos ou longos períodos pode levar ao aumento do estresse oxidativo e subsequentemente à obesidade (Anderson et al., 2009). A obesidade é marcada por alterações na função mitocondrial no músculo esquelético, incluindo redução da biogênese mitocondrial e mudanças na dinâmica mitocondrial (balanço entre a fusão e fissão mitocondriais) (Jheng et al., 2015). Essas disfunções levam a menor geração de

energia, alterações estruturais mitocondriais e reduzida oxidação de ácidos graxos (Hernandez-Aguilera et al., 2013).

O estresse oxidativo pode levar à oxidação de biomoléculas como lipídeos, proteínas e o DNA e causar danos celulares e teciduais (Birben et al., 2012). A oxidação de proteínas pode causar a fragmentação da cadeia peptídica, alterar a carga elétrica das proteínas e causar a oxidação de aminoácidos específicos, levando à redução de suas atividades e /ou ao aumento da susceptibilidade à degradação por proteases (Birben et al., 2012). A oxidação de resíduos sulfidríla presentes em proteínas pode levar a mudanças conformacionais, desdobramentos da estrutura proteica e degradação (Lyras et al., 1997). A peroxidação lipídica pode levar a danos estruturais nas membranas, podendo inativar receptores de membrana, aumentar a permeabilidade, alterar a fluidez, reduzir o potencial de membrana, fenômenos que podem levar à ruptura da membrana. Nas mitocôndrias, essas alterações podem potencializar suas disfunções (Madrigal et al., 2001). A grande quantidade de ácidos graxos insaturados (mais susceptíveis à peroxidação), em conjunto com sua menor defesa antioxidante, torna o encéfalo bastante sensível a danos por EROs.

A exposição ao estresse também pode aumentar o estresse oxidativo. Por exemplo, animais expostos a estresse crônico variado apresentam aumento na peroxidação lipídica no córtex pré-frontal (Herbet et al., 2017).

Dessa forma, considerando que:

- o período pré-púbere é um período de intenso desenvolvimento do SNC, assim como de sistemas envolvidos com o controle metabólico;

- intervenções durante esse período, como exposição a fatores ambientais podem comprometer o desenvolvimento encefálico e alterar o balanço energético;
- a exposição a fatores ambientais como o estresse e a dieta rica em gordura têm aumentado na sociedade ocidental e de forma cada vez mais precoce;
- tais fatores, em períodos precoces do desenvolvimento podem afetar a sinalização de hormônios relacionados com o balanço energético e com o controle metabólico, assim como influenciar no funcionamento mitocondrial;
- diferenças sexo-específicas nas respostas a esses fatores ambientais são possíveis e devem ser estudadas,

nossa **hipótese** é que a exposição ao estresse durante o período pré-púbere, associado ou não a uma DRG, pode ter efeitos em longo prazo na sinalização de hormônios relacionados à modulação do balanço energético e sobre o funcionamento mitocondrial, contemplando as particularidades de cada sexo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo da presente tese foi investigar os efeitos sexo–específicos da exposição ao isolamento social durante o período pré-púbere associado a exposição crônica a uma DRG sobre aspectos relacionados à regulação metabólica, sobre a função mitocondrial e possíveis danos à célula em ratos adultos.

2.2 Objetivos específicos

- A) Investigar se o isolamento social no período pré-púbere altera o consumo de uma DRG, avaliando aspectos murinométricos tais como, o consumo calórico, ganho de peso, eficiência calórica, peso das gorduras retroperitoneal e gonadal, observando possíveis diferenças sexo-específicas (Capítulo I);
- B) Avaliar os efeitos do isolamento social durante o período pré-púbere e o acesso crônico a uma DRG sobre a comunicação de parâmetros periféricos com a sinalização central de hormônios relacionados com o controle metabólico em ratos machos e fêmeas, na idade adulta (Capítulo D);
- C) Investigar a possibilidade do isolamento social durante o período pré-púbere e o acesso crônico à DRG levem a alterações na função mitocondrial (massa, potencial mitocondrial, atividade da cadeia

transportadora de elétrons e parâmetros de estresse oxidativo) e por consequência, danos à célula (peroxidação lipídica e dano a proteínas) em ratos machos e fêmeas na idade adulta (Capítulo II);

3. MATERIAL, MÉTODOS E RESULTADOS

O material, métodos e os resultados dessa tese serão apresentados a seguir, da seguinte forma:

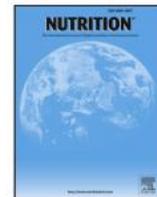
- Capítulo I: Artigo publicado na revista *Nutrition*;

- Capítulo II: Artigo submetido para publicação na revista *Neurochemistry International*;

3.1 Capítulo I

Sex-specific effects of prepubertal stress and high-fat diet on leptin signaling in rats

Artigo publicado na revista *Nutrition*



Basic nutritional investigation

Sex-specific effects of prepubertal stress and high-fat diet on leptin signaling in rats



Ana Paula Toniazzo M.S. ^{a,*}, Danusa M. Arcego Ph.D. ^{a,b}, Camilla Lazzaretti Ph.D. ^b,
Carine Lampert M.S. ^a, Simone N. Weis Ph.D. ^a, Rodrigo Proto-Siqueira Ph.D. ^c,
Rachel Krolow Ph.D. ^a, Carla Dalmaz Ph.D. ^{a,b}

^a Department Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^b PPG-Neurociências, ICBS, UFRS, Brazil

^c Laboratório Antonello, Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2017

Received in revised form

27 September 2017

Accepted 22 October 2017

Keywords:

Thyroid hormones

JAK/STAT3 pathway

HPT axis

Obesity

Caloric efficiency

ABSTRACT

Objective: Both stress exposure and high-fat diet (HFD) are contributors to the alarming prevalence of obesity. Leptin is secreted from adipose tissue and regulates appetite and body weight via the JAK-STAT3 pathway in the hypothalamus; it also regulates the hypothalamic-pituitary-thyroid axis, modulating energy homeostasis. Leptin signaling may be impaired by HFD intake, and here we investigate whether social isolation during the prepubertal period, associated with chronic HFD, can exert long-term effects on metabolic parameters in a sex-specific manner.

Methods: Wistar male and female rats were divided into two groups (receiving standard chow or standard chow and HFD), which were subdivided into (1) exposed to social isolation during the prepubertal period or (2) not exposed.

Results: HFD induced sex-specific effects on leptin signaling and on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis; males receiving HFD presented increased T4 but a reduced T3:T4 ratio and higher caloric efficiency during development. A stress × diet interaction was noted for leptin signaling in males, where pSTAT3 was higher when these factors were applied together. On the other hand, females were more susceptible to early stress, which reduced pSTAT3 in the hypothalamus.

Conclusion: Both stress during the prepubertal period and chronic consumption of HFD had long-term sex-specific effects on hormonal signaling related to energy balance. However, the effects of HFD were more pronounced in males, whereas prepubertal stress had greater effects on leptin signaling in females.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Obesity is becoming a major challenge for public health [1], and its increased prevalence has been attributed to the modern “obesogenic environment” [2], including the consumption of high-fat diets (HFDs) [3], and exposure to stress [4]. Exposure to these factors during the prepubertal period can program metabolism in juvenile animals in a sex-specific manner [5]. This is a critical period for the maturation of neuronal circuits that control energy homeostasis and stress responses [6], as well as for emotional development [6,7]. As such, exposure to social isolation in the prepubertal period is a potent stressor for both humans [8] and rodents [9] and may have long-term effects on emotion, be-

havior, and metabolism [7]. Of particular importance concerning stress responses, rats tend to increase preference for “comfort foods” (sucrose and fat) [10].

The chronic consumption of an HFD induces metabolic disorders such as hyperglycemia, hyperinsulinemia, changes in plasma adipokines (leptin and adiponectin), and fat and weight gain [11], leading to impairment of the communication of metabolic and neuroendocrine mediators that control energy expenditure and food intake [12]. Leptin is secreted in proportion to white adipose tissue and has anorexigenic effects. This hormone binds to specific receptors (LEPRb) in hypothalamic regions and activates the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), which activates the gene transcription of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), pro-opiomelanocortin (POMC), and thyrotropin-releasing hormone (TRH) [13]. Increased SOCS3 expression generates a negative feedback and attenuates

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33085569.

E-mail address: Aninha.toniazzo84@gmail.com (A.P. Toniazzo).

leptin-STAT3 signaling [13]. However, HFD consumption triggers central and peripheral resistance to leptin [14] and consequently disrupts JAK/STAT3 signaling. Additionally, stress experiences in early life may also affect leptin signaling [15]. Central resistance to leptin, associated with altered peripheral levels of this hormone, is a characteristic of obesity [16].

An alternative endocrine mechanism that regulates energy balance is the communication of leptin with the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis [17]; Its dysregulation can lead to energy balance alterations [18].

Therefore, we hypothesized that environmental factors, such as the association of stress in the prepubertal period and chronic HFD, would induce changes in central metabolic processes that regulate food intake and body weight (including leptin-JAK/STAT3, and leptin-HPT signaling) later in life that could be sex specific. We also evaluated body weight, abdominal fat deposition, and related hormones (leptin and adiponectin).

Materials and methods

Subjects

All proceedings were approved by the Institutional Ethical Committee (#27714). Wistar rats were housed in Plexiglas cages (65 × 25 × 15 cm), maintained on a standard 12-h dark/light cycle (lights on at 07:00 h) and temperature of 22 ± 2°C. At postnatal day (PND) 21, animals were weaned and separated according to sex. They were housed in groups of three to five animals (control) or submitted to social isolation in a smaller home cage (27 × 17 × 12 cm). Different diets were offered to the animals: (a) standard lab chow; (b) both standard chow and HFD. This second group of animals was free to choose between standard chow and HFD. Therefore, four groups were obtained for each sex: (1) controls/standard chow (17 males; 18 females); (2) controls/standard chow and HFD (16 males; 15 females); (3) isolated/standard chow (16 males; 17 females) and (4) isolated/standard chow and HFD (13 males; 15 females). From PND 21, both HFD and standard chow groups were offered the diets *ad libitum* for 40 d, according to their groups, and the daily food consumption was measured for each diet. Isolation was maintained from PND 21 to 28 [19], and during this period the animals were not handled, except for during the cleaning of the cages. At PND 28, the animals were returned to regular home cages in groups of three to five. The timeline of the experimental design is shown in Figure 1.

Diets

The HFD was enriched with fat (as described in [19]). Its soy oil/lard ratio contained larger amounts of saturated and monounsaturated fatty acids to reproduce the consumption of fat in Western diets (Supplementary Table S1).

Food consumption

Equal amounts of standard lab chow and HFD were offered to animals, and the remaining pellets were weighed. Food consumption was measured per cage, and the amount of food consumed was divided by the number of animals per

cage to determine mean consumption. To verify the amount of kilocalories consumed, the amount of food ingested was multiplied by the caloric content per gram of chow or HFD (caloric content: standard lab chow, 3.24 kcal/g; HFD, 5.8 kcal/g). Caloric efficiency was determined by body weight gain divided by caloric intake (grams per Kilocalorie).

Abdominal fat and adrenal dissection and sample preparation

At PND 60 to 62, animals were killed by decapitation at approximately 13:00 h, after 6 h of fasting. Gonadal and retroperitoneal adipose tissue depots and adrenal glands were carefully dissected and weighed. Trunk blood was collected with heparin, and plasma separated by centrifugation and frozen at -80°C (for evaluation of thyroid hormones, leptin, and adiponectin). The brains were dissected on ice to remove whole hypothalamus, which was immediately stored at -80°C until use. For corticosterone determination, animals were sacrificed between 08:00 and 10:00 h.

Plasma hormone levels

Plasma levels of leptin, adiponectin, and corticosterone were measured using ELISA assay kits (leptin, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; adiponectin, Abcam, Cambridge, UK; corticosterone, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). Thyroid hormones were measured by electrochemiluminescence immunoassay using a Roche Elecsys-411 analyzer. For more detailed instructions concerning these procedures, please see supplementary material.

Western blot analysis

The hypothalamus was homogenized in ice-cold lysis buffer and Western blot performed as described elsewhere [20]. For more detailed instructions concerning these procedures, please see supplementary material.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM and analyzed using three-way analysis of variance (ANOVA), with *isolation stress*, *diet*, and *sex* as factors. A Bonferroni post hoc test was performed if necessary. For Western blot results, a two-way ANOVA was used because males and females were distributed in distinct gels. For body weight and caloric intake, repeated-measures ANOVAs were used; the Greenhouse-Geisser correction was applied when necessary. All analyses were performed using SPSS software, and a $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Body weight and food consumption

During the week of isolation, there was an effect of sex on body weight gain ($F[1,119] = 8.46, P = 0.004$) (Supplementary Fig. S1A). With regard to the caloric consumption, animals presented an increased consumption over time ($F[4.77,338.89] = 35.18, P < 0.001$) and there was an interaction between *time* and *diet* ($F[4.77,338.89] = 5.41, P < 0.001$), because animals with access to HFD consumed more calories at the beginning of the study.

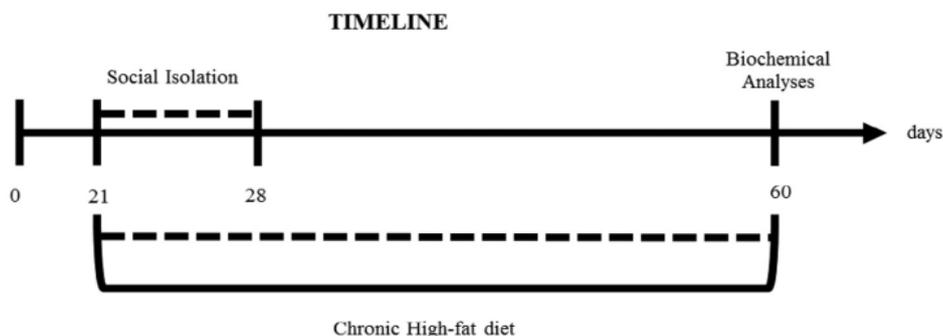


Fig. 1. Timeline of the experimental design. At postnatal day (PND) 21, animals were separated according to sex, and housed in groups (control) or isolated for 7 d. They received standard lab chow or both standard chow and high-fat diet from PND 21 to 60.

Table 1

Effects of isolation stress during the prepubertal period with chronic access to HFD on plasma adiponectin ($\mu\text{g/mL}$), leptin (pg/mL), and corticosterone (ng/mL) levels in adult male and female rats

Sex		Group			
		Control		Stress	
		Chow	Chow + HFD	Chow	Chow + HFD
Male	Leptin	1547.87 \pm 127.37	3015.83* \pm 305.55	1435.35 \pm 140.16	3498.41 \pm 328.57*
	Adiponectin	6.99 \pm 0.38	7.01 \pm 0.55	6.78 \pm 0.51	7.09 \pm 0.59
	Corticosterone	123.60 \pm 35.98	138.24 \pm 56.45	70.11 \pm 22.45	36.11 \pm 5.65
Female	Leptin [†]	796.32 \pm 90.67	2246.47 \pm 430.36*	960.15 \pm 159.60	1735.81 \pm 340.98*
	Adiponectin	6.29 \pm 0.61	9.51 \pm 0.98 [‡]	6.56 \pm 0.43	7.87 \pm 1.02
	Corticosterone [†]	317.79 \pm 79.93	384.19 \pm 137.31	256.44 \pm 26.33	274.22 \pm 34.42

HFD, high-fat diet.

Data are expressed as mean \pm SEM, $n =$ five to seven per group. A three-way ANOVA indicated an effect of *diet* ($P < 0.001$) and an effect of *sex* ($P < 0.001$) on leptin levels. Access to a high-fat diet increased plasma adiponectin levels only in females (interaction *diet* \times *sex*, $P = 0.031$, followed by Bonferroni post hoc). A main effect of *sex* ($P < 0.001$) was noted on corticosterone levels.

* Effect of diet.

[†] Effect of sex.

[‡] Different from respective control group receiving standard chow (post hoc Bonferroni test).

Additionally, a main effect of diet (three-way ANOVA; $F[1,71] = 11.91$, $P = 0.001$) and of isolation stress (three-way ANOVA; $F[1,71] = 7.06$, $P = 0.01$) were noted (Supplementary Fig. S1C). In this context, isolation stress exposure increased the percentage of consumed calories derived from HFD ($F[1,32] = 10.92$, $P = 0.002$) (Supplementary Fig. S1F), suggesting that the increased consumption induced by stress was derived mainly from HFD. Furthermore, the caloric efficiency decreased in the first week in animals with access to HFD ($F[1,70] = 28.41$, $P < 0.001$) (Supplementary Fig. S1B).

After isolation, from PND 28 to 60, the body weight gain increased over *time* ($F[2.50,295.44] = 7129.90$, $P < 0.001$), with interactions between *time* and *sex* ($F[2.50, 295.44] = 437.76$, $P < 0.001$), as expected, and between *time* \times *stress* \times *diet* \times *sex* ($F[2.50,295.44] = 3.05$, $P = 0.037$). There was also an effect of *sex* on body weight gain ($F[1,118] = 239.44$, $P < 0.001$) because males present higher body weight gain than females (Supplementary Fig. S2A). Regarding caloric consumption, results were similar for body weight gain; animals had an interaction between *time* and *diet* ($F[4,112] = 4.78$, $P = 0.001$), and an effect of *sex* ($F[1,28] = 95.61$, $P < 0.001$) (Supplementary Fig. S2E). Access to HFD increased caloric efficiency ($F[1,28] = 4.93$, $P = 0.035$). There was also a main effect of *sex* ($F[1,28] = 58.96$, $P < 0.001$) because females had lower caloric efficiency (Supplementary Fig. S2D).

Abdominal fat and adrenal weight

Females presented higher relative adrenal weight ($F[1,70] = 42.18$, $P < 0.001$). Gonadal fat was increased in the HFD group ($F[1,70] = 78.70$, $P < 0.001$). For retroperitoneal fat, an interaction between *diet* and *sex* was detected ($F[1,70] = 11.86$, $P = 0.001$, followed by Bonferroni post hoc) because retroperitoneal fat increase with HFD was more prominent in males (Supplementary Table S2).

Basal plasma levels of leptin, adiponectin, and corticosterone during adulthood

Plasma leptin levels were increased by access to HFD ($F[1,35] = 61.08$, $P < 0.001$), and there was a main effect of *sex* ($F[1,35] = 26.03$, $P < 0.001$), with higher levels in males. An interaction between *diet* and *sex* ($F[1,40] = 4.97$, $P = 0.031$) was identified in adiponectin levels because females with access to HFD presented higher levels of this adipokine. Regarding corti-

costerone levels, we found a main effect of *sex* ($F[1,40] = 22.06$, $P < 0.001$), with higher levels in females (Table 1).

Leptin signaling in the hypothalamus

STAT3 immunocontent was increased in males receiving HFD ($F[1,29] = 6.13$, $P = 0.019$) (Fig. 2A). Isolated males with HFD access had increased pSTAT3 immunocontent (Fig. 2B) and also increased phospho-STAT3/STAT3 ratio (Fig. 2C) (interaction *stress* \times *diet*; phospho-STAT3: $F[1,20] = 21.21$, $P < 0.001$; phospho-STAT3/STAT3 ratio: $F[1,17] = 19.50$, $P < 0.001$). No effects were detected on SOCS3 immunocontent ($P > 0.05$) (Fig. 2D).

In females, on the other hand, a main effect of *stress* was identified, increasing STAT3 ($F[1,24] = 4.47$, $P = 0.045$) (Fig. 3A) and decreasing phospho-STAT3 ($F[1,18] = 9.07$, $P = 0.007$) (Fig. 3B) and phospho-STAT3/STAT3 ratio ($F[1,16] = 17.60$, $P = 0.001$) (Fig. 3C). In addition, stressed females displayed increased SOCS-3 immunocontent ($F[1,22] = 5.80$, $P = 0.025$) (Fig. 3D).

Circulating thyroid hormones

Both plasma total thyroxine (T4) and free T4 levels were increased in animals that were isolated (total T4: $F[1,40] = 11.26$, $P = 0.002$; free T4: $F[1,38] = 5.56$, $P = 0.024$). *Diet* \times *sex* interactions were also detected, with higher levels in males receiving HFD (total T4: $F[1,40] = 5.85$, $P = 0.020$; free T4: $F[1,38] = 10.26$, $P = 0.003$). With regard to total triiodothyronine (T3) levels, a main effect of *sex* was noted, with T3 levels being higher in females (total T3: $F[1,39] = 34.29$, $P < 0.001$). Additionally, stressed animals presented a decreased T3/T4 ratio ($F[1,39] = 21.93$, $P < 0.001$), and an interaction between *diet* \times *sex* was identified because the T3/T4 ratio was decreased in males receiving HFD ($F[1,39] = 10.50$, $P = 0.002$) (Table 2).

Discussion

These findings provide new data regarding the influence of sex on the effects of chronic HFD, and of isolation stress. Exposure to a stressor can either increase or decrease food ingestion [21]. Our findings indicate that, during PND 21 to 28, the exposure to isolation stress increased caloric consumption, mainly from HFD, indicating a preference for fat during isolation, a fact already noted using chronic variable stress [22]. Our results reinforce the theory that stress conditions lead to increased consumption of

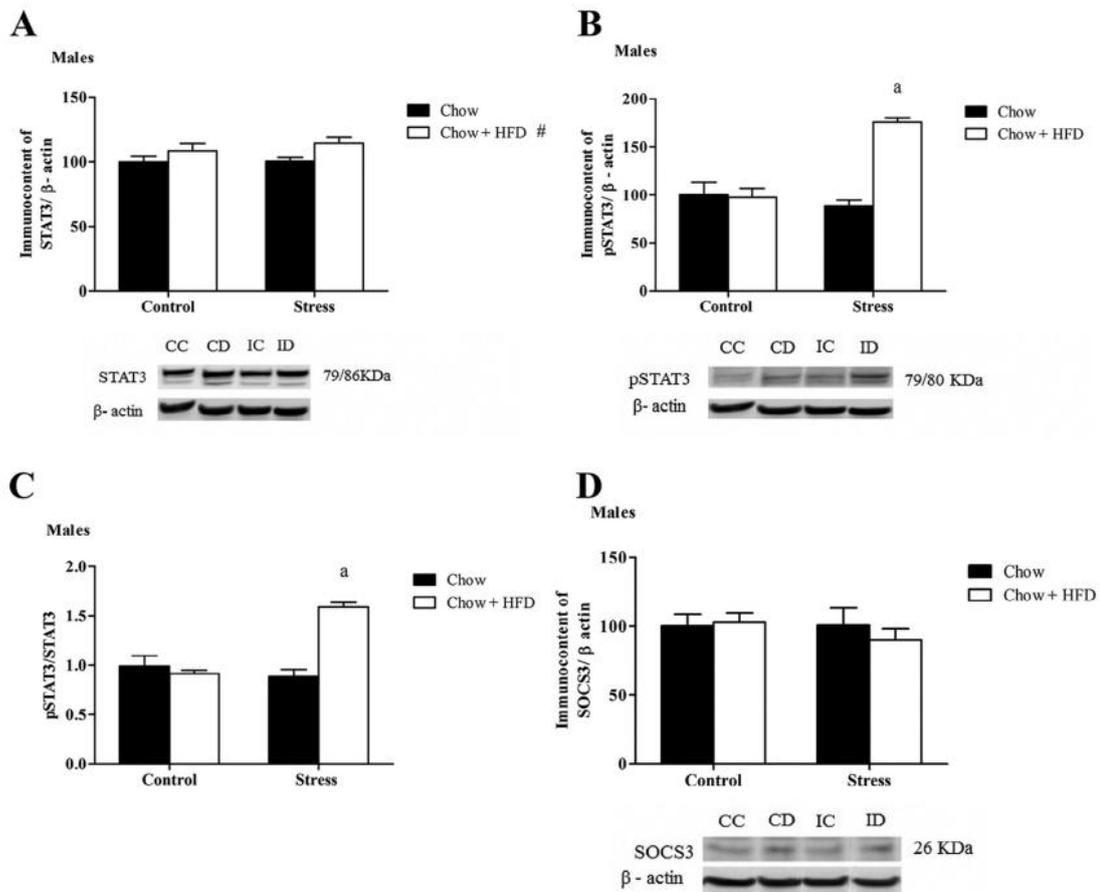


Fig. 2. Effect of isolation stress during the prepubertal period, with or without chronic access to HFD, on the relative immunocontent of the following: (A) STAT3. A main effect of HFD increased STAT3 immunocontent ($P = 0.019$). (B) Phospho-STAT3. An interaction between stress and diet ($P < 0.001$) was identified because stressed males receiving HFD displayed increased pSTAT3. (C) Phospho-STAT3/STAT3 ratio. There was an interaction between stress and diet ($P < 0.001$) because stressed males receiving HFD increased phospho-STAT3/STAT3 ratio. (D) SOCS3. No effect was identified ($P > 0.05$). Data are expressed as mean \pm SEM, $n =$ five to nine per group. CC, control chow; CD, control diet; HFD, high-fat diet; IC, isolated chow; ID, isolated diet. *Effect of diet; a, different from all other groups (Bonferroni post hoc).

Table 2

Effects of isolation stress during the prepubertal period with or without chronic access to HFD on total T4 ($\mu\text{g/dL}$), free T4 (ng/dL), total T3 (ng/mL), and total T3/total T4 ratio in adult male and female rats

Sex		Group			
		Control		Stress	
		Chow	Chow + HFD	Chow	Chow + HFD
Male	Total T4	4.29 \pm 0.34	5.50 \pm 0.21	4.82 \pm 0.30*	6.66 \pm 0.61* [†]
	Free T4	2.46 \pm 0.09	3.05 \pm 0.12	2.49 \pm 0.09*	3.27 \pm 0.25* [†]
	Total T3	1.25 \pm 0.03	1.20 \pm 0.04	1.21 \pm 0.02	1.19 \pm 0.03
	TT3/TT4	0.2933 \pm 0.0214	0.2215 \pm 0.0135 [‡]	0.2549 \pm 0.0135*	0.1845 \pm 0.0136* [§]
Female	Total T4	4.62 \pm 0.26	5.21 \pm 0.28	5.61 \pm 0.17*	5.75 \pm 0.30*
	Free T4	2.47 \pm 0.11	2.45 \pm 0.12	2.75 \pm 0.06*	2.86 \pm 0.14*
	Total T3	1.38 \pm 0.08	1.48 \pm 0.04	1.41 \pm 0.03	1.37 \pm 0.04
	TT3/TT4	0.2996 \pm 0.0086	0.2870 \pm 0.0134	0.2528 \pm 0.0072*	0.2402 \pm 0.0085*

HFD, high-fat diet; T3, triiodothyronine; T4, thyroxine; TT3, total T3; TT4, total T4.

Data are expressed as mean \pm SEM; $n = 5$ to 6 per group. The high-fat diet increased both total T4 and free T4 levels in males (three-way ANOVA interaction of diet \times sex, $P < 0.05$), and exposure to stress in the prepubertal period increased plasma total T4 and free T4 levels in all animals ($P < 0.05$). There was a main effect of sex on total T3 levels that was higher in females ($P < 0.05$). An interaction between diet \times sex ($P < 0.05$) on T3/TT4 ratio was detected because HFD decreased the T3/TT4 ratio in males. Stress decreased the T3/TT4 ratio in all animals.

* Effect of stress.

[†] Different from male groups receiving standard chow (post hoc Bonferroni test).

[‡] Different from control male and female groups receiving standard chow and from the control female group receiving HFD (post hoc Bonferroni test).

[§] Different from all male and female groups receiving standard chow and from control female group receiving HFD (post hoc Bonferroni test).

^{||} Effect of sex.

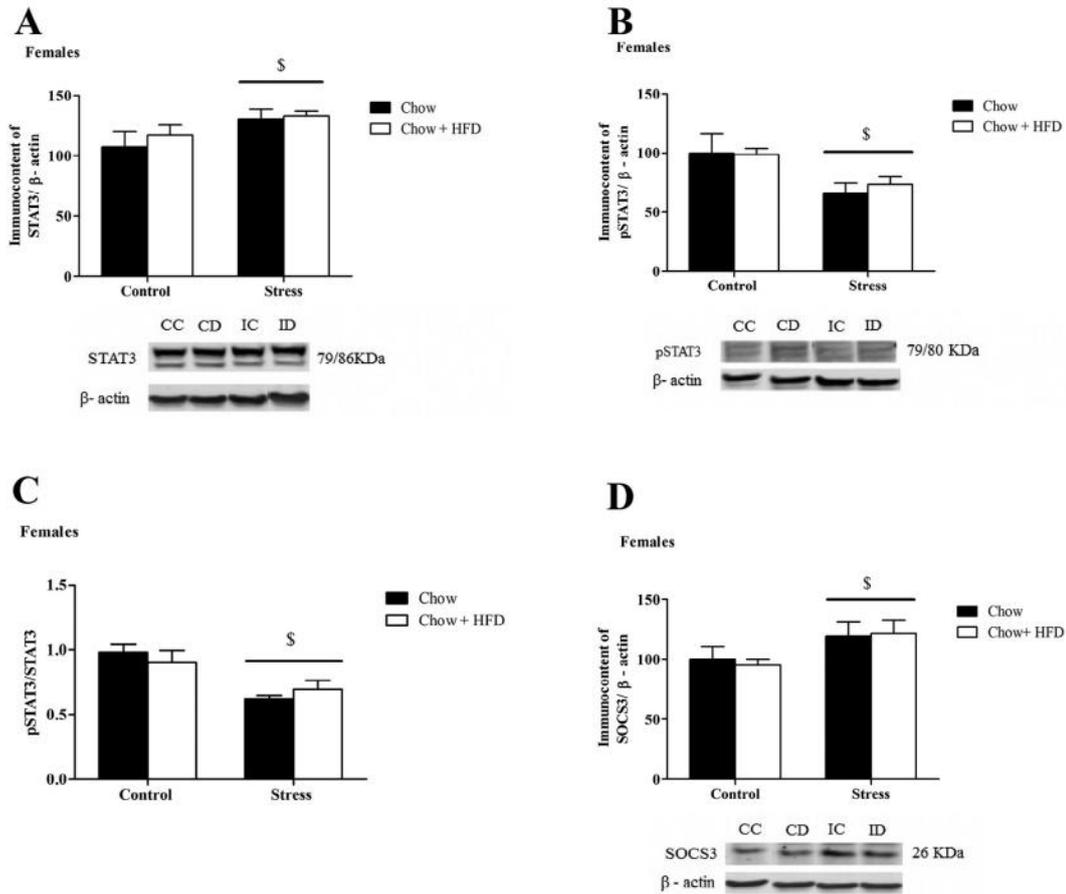


Fig. 3. Effect of isolation stress during the prepubertal period, with or without chronic access to HFD on the relative immunocontent of the following. (A) STAT3. A main effect of stress increased STAT3 immunocontent ($P = 0.045$). (B) Phospho-STAT3. Stressed females had decreased pSTAT3 immunocontent ($P = 0.007$). (C) Phospho-STAT3/STAT3 ratio. There was a stress main effect decreased phospho-STAT3/STAT3 ratio ($P < 0.001$). SOCS3. There was a main effect of stress because stressed females had increased SOCS3 immunocontent ($P = 0.025$). Data are expressed as mean \pm SEM, $n = 5$ to 8 per group. CC, control chow; CD, control diet; HFD, high-fat diet; IC, isolated chow; ID, isolated diet. $\$$ Effect of stress.

comfort foods [10,21]. Interestingly, HFD access decreased caloric efficiency during this period. In young animals, a large part of the calories is directed to the growth processes [23]. Accordingly, young rats fed HFD displayed a greater ability to utilize fat as a metabolic fuel [24].

In contrast to the prepubertal period, however, an inversion occurs later in life, where all animals receiving HFD had increased caloric efficiency, and male rats had higher caloric efficiency than females. The control of energy balance and body weight gain was sex dimorphic, consistent with previous data [23]. In addition, energy intake and utilization are modified during development [25], and HFD induces time-dependent oscillations in energy balance [26]. Despite the different composition of diets, our results are in agreement with those indicating that chronic exposure to HFD leads to changes in energy homeostasis [27]. In fact, dietary fat is more efficiently converted into body fat than protein or carbohydrates [28]. Thus, our results indicate that chronic HFD generates different responses during development, with long-term effects on energy homeostasis, that are sex specific, and with males being more susceptible to a chronic obesogenic diet.

There are important sex-dependent differences in the regulation of energy homeostasis [29]. Chronic consumption of HFD led to high abdominal fat deposition. On the other hand, adipose tissue releases a variety of adipokines, among them adiponectin and leptin, which appear to control metabolic, vascular, immune, and endocrine processes [30]. Interestingly, chronic consumption of HFD increased plasma levels of adiponectin, an adipocytokine with antiinflammatory, antiatherogenic, and anti-diabetic properties [31], mainly in females. Other studies have also found that adiponectin levels in females may be increased by interventions during development, suggesting a protection by this adipocytokine in females [5].

Leptin is secreted in proportion to adipose stores [12] and is a mediator of long-term regulation of energy balance [32]. In adequate levels, leptin communicates with hypothalamic neurons and provides a signal of body fat reserves, modulating food intake [33]. On the other hand, impaired leptin synthesis, signaling, or sensitivity can result in energy homeostasis alterations [34]. Experiments using animal models suggest that females are more sensitive to the anorectic effects of leptin than males [29]. In this scenario, it has been noted that both estrogen and leptin are

hormones that influence energy balance, and studies have found that estrogen may influence the expression and sensitivity to leptin in various tissues [35], including the central nervous system [36], an effect that may depend on diet [35]. Additionally, evidence indicates that there is a co-localization of estrogen receptors ($ER\alpha$) with leptin receptors in some regions of the hypothalamus, suggesting a possible interaction between the two signaling pathways [37]. Here, the consumption of HFD increased leptin levels in both males and females, being more pronounced in males, probably because of their high content of abdominal fat. However, high leptin was accompanied by high caloric consumption and body weight gain. A low sensitivity to leptin in the hypothalamus could have occurred, whereby high plasma leptin concentrations did not lead to reduced food intake, suggesting a resistance to the effects of endogenous leptin [34,38]. Elevated levels of leptin, a characteristic process of resistance to this adipokine, may be found with HFDs [39], in obesity, and in metabolic syndrome [38].

The mechanisms of leptin resistance may involve various pathways, such as a reduction in downstream leptin signaling [40]. Leptin regulates food intake and energy homeostasis in the hypothalamus through the JAK-STAT pathway [41]. Peripheral leptin binds to specific receptors (LEPRb) in hypothalamic regions and activates the STAT3, which activates the SOCS3, POMC, and TRH [13]. Increased SOCS3 expression generates a negative feedback and attenuates leptin-STAT3 signaling [13]. Interestingly, we found that STAT3 phosphorylation and the pSTAT3/STAT3 ratio were higher in stressed males receiving HFD; however, the increase in pSTAT3 was not accompanied by an increase in SOCS3, an important negative regulator of the JAK/STAT3, suggesting activation of this pathway; food ingestion and body weight gain, however, suggest that leptin signaling is impaired somewhere.

On the other hand, stressed females presented decreased STAT3 phosphorylation and increased STAT3 and SOCS3

immunocontents. Remarkably, females were more at risk for long-lasting stress effects on leptin signaling that result in the apparent inactivation of JAK/STAT. In this sense, our findings indicate that both early life stress and chronic HFD programmed leptin signaling through different mechanisms in males and females.

Leptin also regulates energy balance via the activation of the HPT axis, both directly on TRH neurons in the paraventricular nucleus and indirectly through POMC neurons in the arcuate nucleus [42]. The indirect pathway has been suggested to become inactive after diet-induced obesity as a result of the development of leptin resistance [17]. However, in obese rodents, the HPT axis activity remains at normal or slightly elevated levels [17]; therefore, it is suggested that the direct action of leptin on paraventricular nucleus neurons may still be active, in such a way that leptin resistance does not develop in the same way in its different hypothalamic sites of action. In this study, male animals had increased plasma leptin and they had increased caloric consumption and body weight gain, suggesting leptin resistance. On the other hand, they also had increased leptin signaling in the whole hypothalamus, as well as increased T4, suggesting that leptin is still able to activate the HPT axis. It is possible that leptin could have activated the HPT axis as an adaptive response to excessive energy intake, resulting in increased T4 and FT4 in males receiving HFD. Interestingly, despite the elevated circulating T4, males receiving HFD presented low plasmatic T3, which can be attributed to a possible failure in converting T4 into T3, a process catalyzed by the iodothyronine deiodinases enzymes, determining plasmatic and cellular availability of T3 [43]. Failure of this conversion impairs metabolic homeostasis [44]. In contrast, females presented increased T3 levels, associated with increased corticosterone levels. Glucocorticoids have been reported to influence circulating thyroid hormone levels as well as peripheral deiodination [45]. Consistent with this, elevated

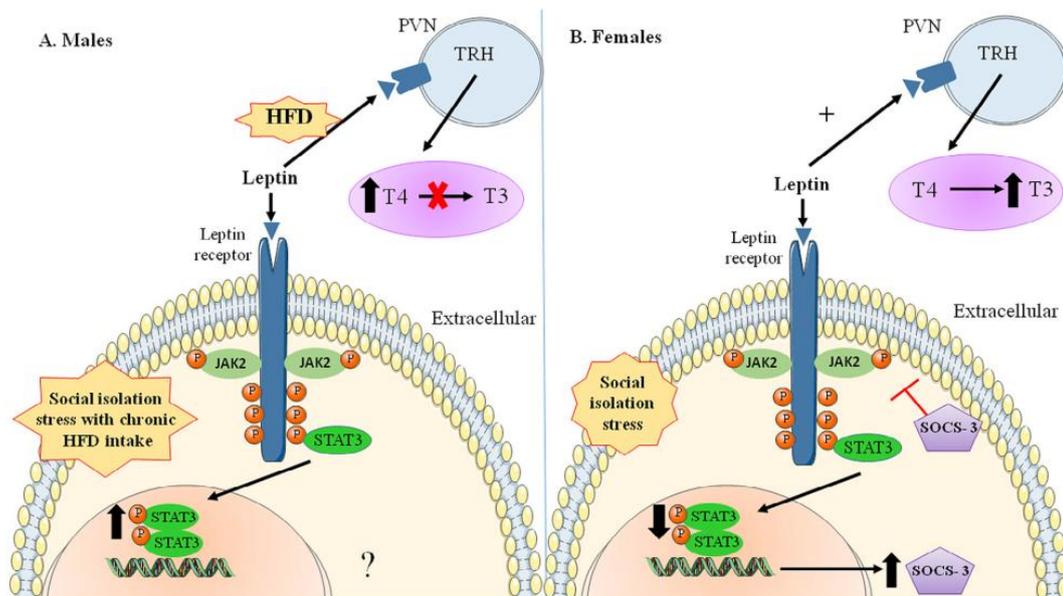


Fig. 4. Proposed model of leptin action on hypothalamus of adult male and female rats submitted to social isolation during the prepubertal period with chronic HFD access. (A) Males. The social isolation stress and chronic HFD access (interaction stress \times diet) increased STAT3 phosphorylation in males; however, the increase in pSTAT3 did not activate the SOCS3. It is possible that alterations in SOCS3 are dependent on the hypothalamic region. Leptin also activates the HPT axis in males receiving HFD, resulting in increased T4, which was not converted into T3. (B) Females. Stressed females presented decreased STAT3 phosphorylation and increased SOCS3 immunocontent, resulting in apparent inactivation of JAK/STAT pathway. HFD, high-fat diet; HPT, hypothalamic-pituitary-thyroid.

corticosterone levels in females may induce an increased activity of deiodinases and consequently higher T3 levels.

Conclusion

In conclusion, the present findings indicate that males and females respond differently to stress in the prepubertal period and to the consumption of HFDs. Males were more susceptible to HFD effects on the HPT axis function, with reduced conversion of T4 into T3. On the other hand, females were more susceptible to isolation during the prepubertal period, which led to reduced leptin signaling in the hypothalamus later on in life. Further evaluations of the HPT axis could contribute to a better understanding of the sex-specific effects of HFD consumption. These consequences could be risk factors for the development of metabolic syndrome and obesity.

Our data highlight the importance of environmental factors early in life for long-term metabolic programming. Additionally, these results may reveal important targets for the elucidation of sex differences in mechanisms related to the development of obesity and contribute to future therapeutic and preventive measures (Fig. 4).

Acknowledgments

The authors do not declare any conflict of interest. This work was financially supported by Instituto nacional de ciência e tecnologia (INCT) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). INCT/CNPq 465671/2014-4.

Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.10.018>.

References

- [1] Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. *JAMA* 2006;295:1549–55.
- [2] Kaur H, Hyder ML, Poston WS. Childhood overweight: an expanding problem. *Treat Endocrinol* 2003;2:375–88.
- [3] Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 2010;23:270–99.
- [4] Huneault L, Mathieu ME, Tremblay A. Globalization and modernization: an obesogenic combination. *Obes Rev* 2011;12:e64–72.
- [5] Krolow R, Noschang C, Arcego DM, Huffell AP, Marcolin ML, Benitz AN, et al. Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism* 2013;62:1268–78.
- [6] McCormick CM, Mathews IZ. HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;86:220–33.
- [7] Pervanidou P, Chrousos GP. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism* 2012;61:611–9.
- [8] Jones AC, Schinka KC, van Dulmen MH, Bossarte RM, Swahn MH. Changes in loneliness during middle childhood predict risk for adolescent suicidality indirectly through mental health problems. *J Clin Child Adolesc Psychol* 2011;40:818–24.
- [9] Panksepp JB, Lahvis GP. Social reward among juvenile mice. *Genes Brain Behav* 2007;6:661–71.
- [10] Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. Chronic stress and obesity: a new view of “comfort food.”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:11696–701.
- [11] Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 2007;15:798–808.
- [12] Badman MK, Flier JS. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology* 2007;132:2103–15.
- [13] Ladyman SR, Grattan DR. JAK-STAT and feeding. *JAKSTAT* 2013;2:e23675.
- [14] Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM. Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS ONE* 2010;5:e11376.
- [15] Lee JH, Yoo SB, Kim JY, Lee JY, Kim BT, Park K, et al. Early life stress experience may blunt hypothalamic leptin signalling. *J Biosci* 2017;42:131–8.
- [16] Kong AP, Chan NN, Chan JC. The role of adipocytokines and neurohormonal dysregulation in metabolic syndrome. *Curr Diabetes Rev* 2006;2:397–407.
- [17] Perello M, Cakir I, Cyr NE, Romero A, Stuart RC, Chiappini F, et al. Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E976–89.
- [18] Marzullo P, Minocci A, Tagliaferri MA, Guzzaloni G, Di Blasio A, De Medici C, et al. Investigations of thyroid hormones and antibodies in obesity: leptin levels are associated with thyroid autoimmunity independent of bioanthropometric, hormonal, and weight-related determinants. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3965–72.
- [19] Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Ferreira AG, Scherer E, et al. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiol Behav* 2014;124:23–32.
- [20] Arcego DM, Toniazzo AP, Krolow R, Lampert C, Berlitz C, Dos Santos Garcia E, et al. Impact of high-fat diet and early stress on depressive-like behavior and hippocampal plasticity in adult male rats. *Mol Neurobiol* 2017;doi:10.1007/s12035-017-0538-y. e-pub ahead of print. [Accessed 12 June 2017].
- [21] Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 2004;145:3754–62.
- [22] Teegarden SL, Bale TL. Effects of stress on dietary preference and intake are dependent on access and stress sensitivity. *Physiol Behav* 2008;93:713–23.
- [23] Valle A, Catala-Niell A, Colom B, Garcia-Palmer FJ, Oliver J, Roca P. Sex-related differences in energy balance in response to caloric restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289:E15–22.
- [24] Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Liverini G. Skeletal muscle oxidative capacity in rats fed high-fat diet. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:65–72.
- [25] Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, et al. Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br J Nutr* 2003;90:953–60.
- [26] So M, Gaidhu MP, Maghdoori B, Ceddia RB. Analysis of time-dependent adaptations in whole-body energy balance in obesity induced by high-fat diet in rats. *Lipids Health Dis* 2011;10:99.
- [27] Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 2003;133:1081–7.
- [28] Roberts CK, Berger JJ, Barnard RJ. Long-term effects of diet on leptin, energy intake, and activity in a model of diet-induced obesity. *J Appl Physiol* 2002;93:887–93.
- [29] Clegg DJ, Riedy CA, Smith KA, Benoit SC, Woods SC. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* 2003;52:682–7.
- [30] Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 2009;54:1847–56.
- [31] Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett* 2006;580:2917–21.
- [32] Tomiyama AJ, Schamarek I, Lustig RH, Kirschbaum C, Puterman E, Havel PJ, et al. Leptin concentrations in response to acute stress predict subsequent intake of comfort foods. *Physiol Behav* 2012;107:34–9.
- [33] Lustig RH. The neuroendocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001;30:765–85.
- [34] Sainz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* 2015;64:35–46.
- [35] Al-Qahtani SM, Bryzgalova G, Valladolid-Acebes I, Korach-Andre M, Dahlman-Wright K, Efendic S, et al. 17 Beta-estradiol suppresses visceral adipogenesis and activates brown adipose tissue-specific gene expression. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2017;29:13–26.
- [36] Ainslie DA, Morris MJ, Wittert G, Turnbull H, Proietto J, Thorburn AW. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1680–8.
- [37] Springer AM, Foster-Schubert K, Morton GJ, Schur EA. Is there evidence that estrogen therapy promotes weight maintenance via effects on leptin? *Meno-pause* 2014;21:424–32.
- [38] Zhang Y, Scarpance PJ. The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol Behav* 2006;88:249–56.
- [39] Shapiro A, Tumer N, Gao Y, Cheng KY, Scarpance PJ. Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. *Br J Nutr* 2011;106:390–7.
- [40] Martin RL, Perez E, He YJ, Dawson R Jr, Millard WJ. Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. *Metabolism* 2000;49:1479–84.
- [41] Kwon O, Kim KW, Kim MS. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:1457–77.
- [42] Ghamari-Langroudi M, Vella KR, Srisai D, Sugrue ML, Hollenberg AN, Cone RD. Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in

- paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol Endocrinol* 2010;24:2366–81.
- [43] St Germain DL, Galton VA, Hernandez A. Minireview: defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 2009;150:1097–107.
- [44] Rotondi M, Magri F, Chiovato L. Thyroid and obesity: not a one-way interaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:344–6.
- [45] Van der Geyten S, Darras VM. Developmentally defined regulation of thyroid hormone metabolism by glucocorticoids in the rat. *J Endocrinol* 2005;185:327–36.

Supplementary material

Methods

Supplemental Table 1.

Table 1. Nutritional composition /100g of the diets used.

HFD: high fat diet

Diet	Energy (Kcal)	Total Protein (g)	Total carbohydrate (g)	Total Fat (g)
Standard chow ^a	301.2	22	44.3 (from starch)	4.0 (0.6 from saturated and 3.4 from unsaturated fat)
HFD ^b	588	28	25 (12.5 from starch and 12.5 from sucrose)	42 (16 from saturated and 26 from unsaturated fat)

^a Nuvilab[®]

^b (Arcego et al., 2014) Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: Effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. Neurochem Res. 2013 Sep;38(9):1791-800.

Plasma hormones levels

Plasma levels of leptin and adiponectin

Plasma leptin was measured by Rat Leptin ELISA assay (Invitrogen, cat no. KRC2281), with a sensitivity of <20 pg/mL, intraassay coefficient of variation (CV) ranged from 5.1-5.7% and interassay CV varied from 6.4-8.0%. Adiponectin was measured by Rat Adiponectin ELISA (Abcam, cat no ab108784), the sensitivity was 1.5 ng/ml (working range 1.56 ng/ml-100 ng/ml), intraassay CV from 4.6% and interassay CV from 7.2%.

Corticosterone assay

At PND 60, animals were killed by decapitation between 8:00 pm to 10:00 pm; the trunk blood was collected into tubes with heparin to assess basal corticosterone levels. Corticosterone was extracted with ethyl acetate (Couto-Pereira et al., 2016) and analyzed with a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Cayman Chemical Co., USA), following the manufacturer's instructions. Results are expressed as ng corticosterone/ml; the sensitivity (B/Bo% =80%) was 35 pg/mL, intraassay CV ranged from 5.1-13.4% and interassay CV varied from 6.7-25.8%.

Plasmatic Thyroid hormone level measurement: Total Thyroxine (TT4), Free thyroxine (FT4) and triiodothyronine (T3)

Hormones were measured using an electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) using a Roche Elecsys-411 analyzer. Plasma TT4 (cat no. 18836402 - Roche); sensitivity, 5.40-320 nmol/L or 0.420-24.9 µg/dL; intraassay CV range, 2.5-4.7%; interassay CV varied from 3.0-6.9%. FT4 (cat no. 12582703-Roche); sensitivity, 0.5 pmol/L; intraassay CV, 1.3-4.0%; interassay CV varied from 2.1-7.6%. Plasma TT3 (cat no. 18856901 - Roche); sensitivity 0.195- 6.51 ng/mL; intraassay CV, 3.6-5.3%; interassay CV, 4.7-5.4%.

Western Blot Analysis

The entire hypothalamus was dissected from the brain and homogenized in ice-cold lysis buffer, pH 7.9: 2.5 M KCl, 10 mM Hepes, 0.6 mM EDTA, 1% NP 40 and 1% protease inhibitor cocktail (PIC). Equal protein concentrations (40 µg of total protein/lane, determined using a commercial kit BCA Protein Assay [Thermo Scientific, USA]) were loaded onto NuPAGE[®] 4-12% Bis-Tris gels (different gels were used for male and female samples). After electrophoresis, proteins were transferred (XCell SureLock[®] Mini-Cell, Invitrogen) to nitrocellulose membranes (1h at 50V in transfer buffer [48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol, and 0.25% SDS]) (Valentim et al., 2001). The blot was submitted to 2h incubation in blocking solution (TBS plus 5% bovine serum albumin). After incubation, the blot was incubated overnight at 4°C in blocking solution containing one of the following antibodies: Rabbit anti-pSTAT3 (Tyr705, 1:2000, Cell Signaling), Rabbit anti-SOCS3 (1:1000, Cell Signaling), and Rabbit anti-STAT3 (1:1000, Cell Signaling) and Rabbit anti-β actin (1:2000, Millipore). The blot was then washed three times for 5 minutes with T-TBS and incubated for 2h in solution containing peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:1000, Millipore). The blot

was again washed four times for 5 minutes with T-TBS and then left in TBS. The blot was developed using a chemiluminescence ECL Kit (Amersham, Oakville, Ontario), detected using a digital imaging system (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences) and analyzed using the Image Studio Lite Software. Results were expressed as the ratio of intensity of the protein of interest to that of β actin, and calculated as percentages of controls (control-chow) from the same membrane.

Supplemental Table 2. Effects of isolation stress during the prepubertal period with chronic access to HFD on retroperitoneal fat, gonadal fat and relative weights of adrenal glands in adult male and female rats.

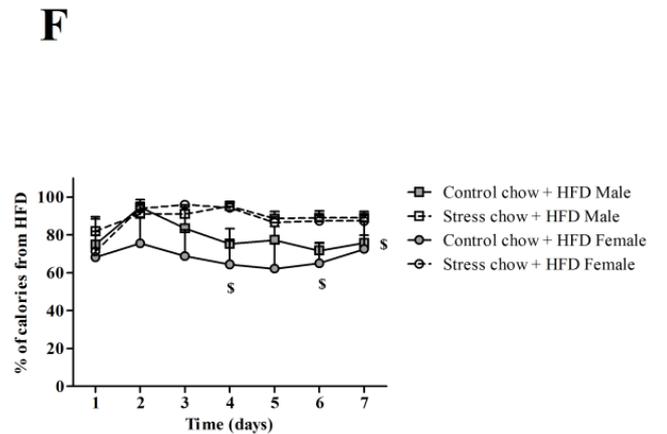
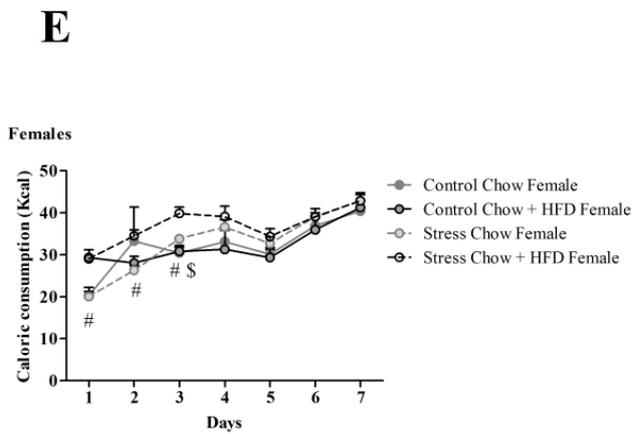
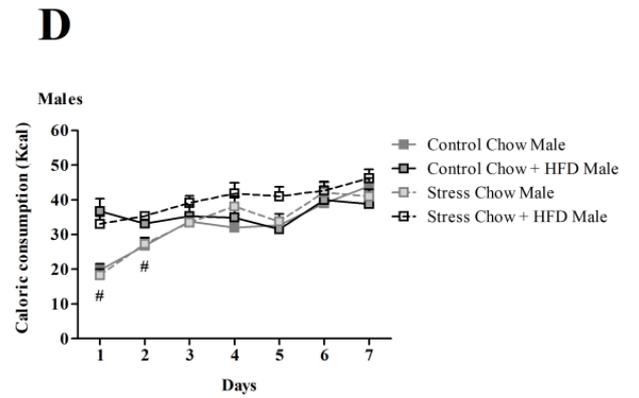
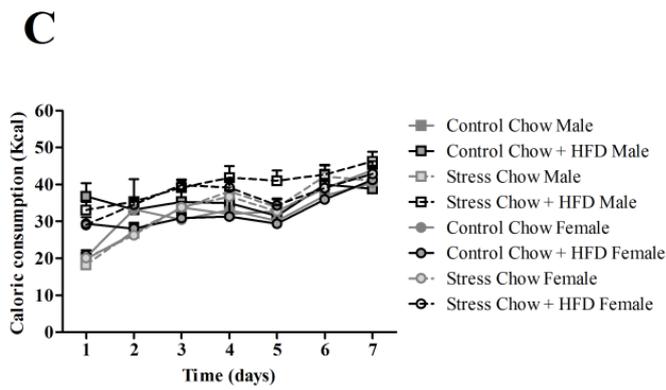
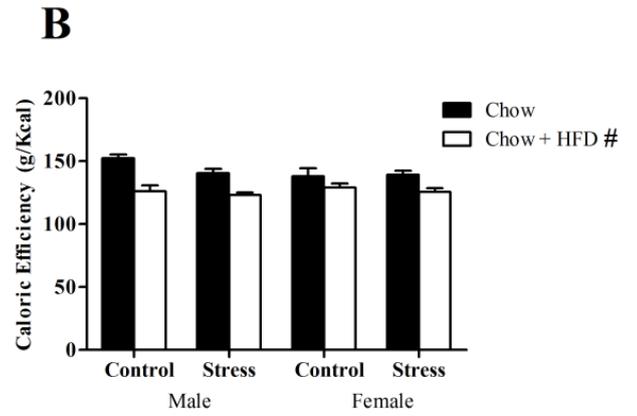
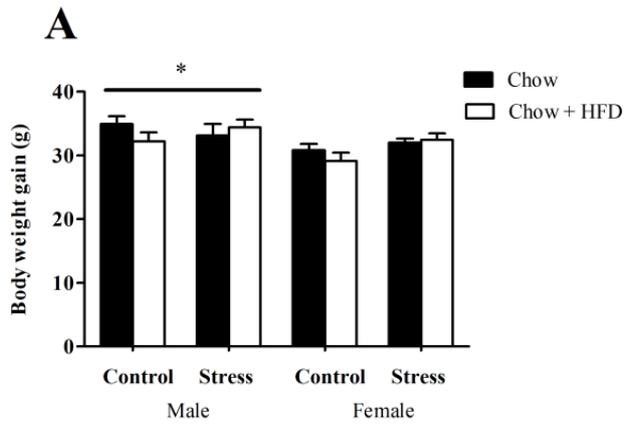
Sex		Group			
		Control		Stress	
		Chow	Chow + HFD	Chow	Chow + HFD
Male	Retroperitoneal Fat	3.78 ± 0.50	7.59 ± 0.77 ^a	3.94 ± 0.65	7.87 ± 0.70 ^a
	Gonadal Fat	2.68 ± 0.29	5.20 ± 0.64 [#]	2.83 ± 0.38	4.86 ± 0.28 [#]
	Adrenal Glands	0.23 ± 0.012	0.21 ± 0.023	0.24 ± 0.009	0.21 ± 0.025
Female	Retroperitoneal Fat	1.98 ± 0.18	3.64 ± 0.42	2.09 ± 0.17	3.43 ± 0.28
	Gonadal Fat	2.53 ± 0.19	5.18 ± 0.54 [#]	3.21 ± 0.19	5.63 ± 0.39 [#]
	Adrenal Glands*	0.43 ± 0.055	0.38 ± 0.032	0.37 ± 0.025	0.44 ± 0.074

Supplemental Table 2. Fat deposition is shown in grams, and adrenal weight is expressed in relation to body weight (mg tissue/g). Data are expressed as mean±S.E.M., N=7-12/group. The diet increased retroperitoneal fat, an effect that was more prominent in males (interaction of *diet* and *sex*, P = 0.001, followed by Bonferroni post-hoc). In addition, a three-way ANOVA showed an effect of *diet* on gonadal fat and an effect of sex on adrenal glands. [#] Effect of diet; * Effect of sex.

^a Different from groups receiving standard chow and from all female groups (post-hoc Bonferroni test).

Supplemental Figure 1. Effect of isolation stress during the prepubertal period, with or without chronic access to HFD during PND 21-28, on Body weight gain (A), Caloric efficiency (B), Caloric consumption from all groups for comparison (C), Caloric consumption from Males (D), Caloric consumption from Females (E) and Percentage of calories from HFD (F).

Supplemental Figure 1.



Supplemental Figure 1. Effect of isolation stress during the prepubertal period, with or without chronic access to HFD. Data are expressed as mean \pm S.E.M., N = 13-18/group (when in groups, with N = 4-5 animals/ cage); N = 13- 17 (for isolated animals).

Results during the period of isolation (first week):

A. Body weight gain. Three-way ANOVA showed that males displayed increased body weight gain (P = 0.004).

B. Caloric efficiency [weight gained (grams)/kilocalorie ingested]. Three-way ANOVA showed that diet decreased caloric efficiency (P < 0.001).

C. Caloric consumption. Both male and female rats had increased caloric consumption over time (repeated measures ANOVA, P <0.001), with an interaction between *time* and *diet* (rats with access to HFD had more total caloric consumption over time, P<0.001). Three-way ANOVA showed a main effect of *diet* (P= 0.001) and of *stress* (P= 0. 01) (isolated rats or rats with access to HFD consumed more total calories).

D. Caloric consumption in Males. Access to HFD increased caloric consumption in male rats (P = 0.011). [#] Different from groups receiving HFD (followed by Bonferroni post-hoc test).

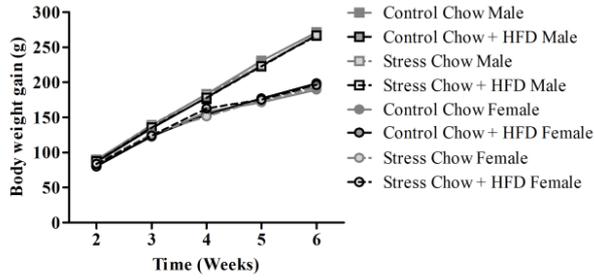
E. Caloric consumption in Females. Both, access to HFD (P = 0.038) and exposure to isolation stress (P = 0.005) increased caloric consumption in female rats. [#] Different from groups receiving HFD and ^{\$} different from isolated groups (followed by Bonferroni post-hoc test).

F. Percentage of calories from HFD. Both males and females exposed to isolation stress consumed more calories from HFD (P= 0.002). ^{\$} Different from isolated groups (followed by Bonferroni post-hoc test). (* Effect of sex. [#] Effect of diet. ^{\$} Effect of stress).

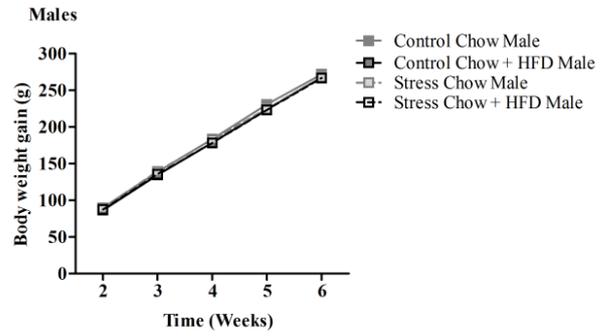
Supplemental Figure 2. Effect of isolation stress during the prepubertal period, with or without chronic access to HFD after isolation (PND 28-60), on body weight gain from all groups for comparison (A), Body weight gain for males (B), Body weight gain for females (C), Caloric efficiency (D), Caloric consumption for all groups for comparison (C), and Percentage of calories from HFD (F).

Supplemental Figure 2.

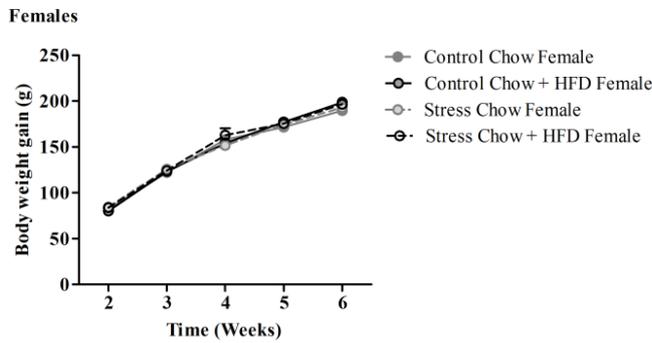
A



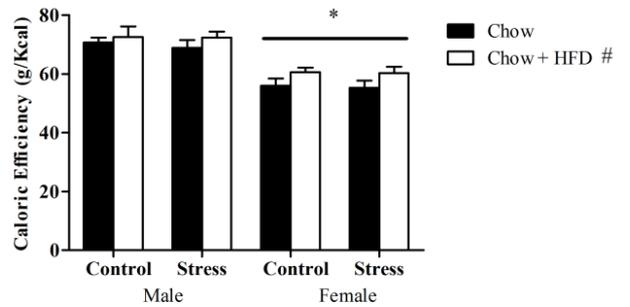
B



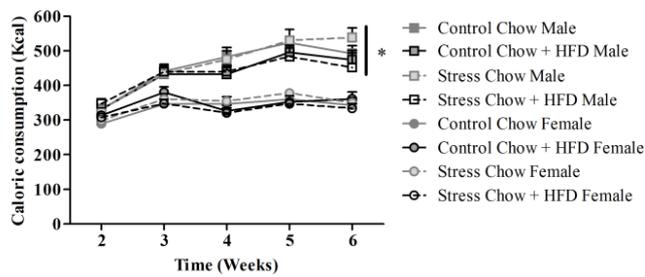
C



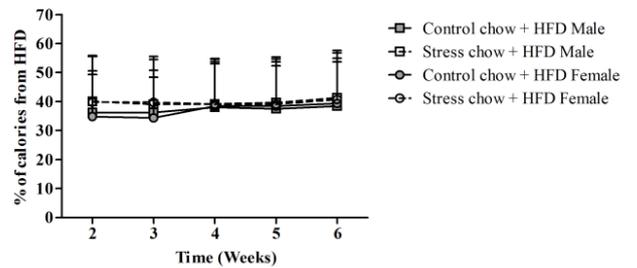
D



E



F



Supplemental Figure 2. Effect of isolation stress during the prepubertal period, with or without chronic access to HFD. Data are expressed as mean \pm SEM, N=13-18/group (when in groups, with N=4-5 animals/ cage). **Results after isolation (PND 28-60):**

A. Body weight gain. The body weight gain from PND 28 to 60 increased over *time* [F (2.50, 295.44) = 7129.90, P < 0.001], with interactions between *time* and *sex* [F (2.50, 295.44) = 437.76, P < 0.001], as expected, and between *time* x stress x *diet* x *sex* [F (2.50, 295.44) = 3.05, P = 0.037]. There was also a *sex* effect on body weight gain [F (1,118) = 239.44, P < 0.001], since males present higher body weight gain than females.

B. Body weight gain in males. No effect was observed (P > 0.05).

C. Body weight gain in females. No effect was observed (P > 0.05).

D. Caloric efficiency. Caloric efficiency was calculated by [weight gained (grams)/kilocalorie ingested]. Three-way ANOVA showed that diet increased caloric efficiency (P = 0.035); additionally, females had lower caloric efficiency than males (P < 0.001).

E. Caloric consumption. Repeated measures ANOVA showed an increase in the caloric consumption over the time (P < 0.001), interaction between *time* and *HFD* (P = 0.001) and between *time* and *sex* (P < 0.001). Three-way ANOVA showed an effect of *sex* (P < 0.001), males presented a larger increase in caloric consumption compared with females.

F. Percentage of calories from HFD. No effects were observed (P > 0.05). * Effect of sex.

3.2 Capítulo II

Sex-dependent effect on mitochondrial and oxidative stress parameters in the hypothalamus induced by prepubertal stress and access to high- fat diet

Artigo submetido para a revista *Neurochemistry International*

Sex-dependent effect on mitochondrial and oxidative stress parameters in the hypothalamus induced by prepubertal stress and access to high fat diet

Ana Paula Toniazzo^{*a}, Danusa Mar Arcego^a, Camilla Lazzaretti^b, Carina Mota^a, Carlos Eduardo Schnorr^{a,c}, Leticia Ferreira Pettenuzzo^a, Rachel Krolow^a, Jose Claudio Fonseca Moreira^a, Carla Dalmaz^{a,b}.

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Civil and Environmental, Universidad de la Costa, Calle 58 #55-66, Barranquilla, Atlántico, Colombia

*Correspondence: AP Toniazzo: Depto Bioquímica, UFRGS Ramiro Barcelos, 2600 Lab.37. 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil; E-mail: aninha.toniazzo84@gmail.com

Abstract

Objective: Some factors that affect lifestyle, including stress and high-fat diet (HFD) consumption, are associated with higher prevalence of obesity. These factors can lead to an imbalance between ROS production and antioxidant defenses and to mitochondrial dysfunctions, which, in turn, could cause metabolic impairments, favoring the development of obesity. However, little is known about the interplay between these factors, particularly at early ages, and whether long-term sex-specific changes may occur. Here, we evaluated whether social isolation during the prepubertal period only, associated or not with chronic HFD, can exert long-term effects on oxidative status parameters and on mitochondrial function in the whole hypothalamus, in a sex-specific manner.

Methods: Wistar male and female rats were divided into two groups (receiving standard chow or standard chow+HFD), that were subdivided into exposed or not to social isolation during the prepubertal period. Oxidative status parameters, and mitochondrial function were evaluated in the hypothalamus in the adult age.

Results: Regarding antioxidant enzymes activities, HFD decreased GPx activity in the hypothalamus, while increasing SOD activity and SOD/CAT and SOD/GPx ratios in females. Females also presented increased total thiols. However, non-protein thiols were lower. Interactions between stress x sex and diet x sex were observed in TBARS levels, since stress decreased TBARS levels in males compared to controls; on the other hand, HFD increased TBARS levels in females. Additionally, HFD increased complex IV activity, and decreased mitochondrial mass in females. Complex I-III activity was higher in males compared to females.

Conclusion: Stress during the prepubertal period and chronic consumption of HFD had persistent sex-specific effects on oxidative status, as well as on its consequences for the cell and for mitochondrial function. HFD had more detrimental effects on females, inducing oxidative imbalance, which resulted in damage to the mitochondria. This HFD-induced imbalance may be related to the development of obesity.

Keywords: oxidative stress, mitochondrial dysfunctions, lipid peroxidation, mitochondrial mass

1. Introduction

The prevalence of obesity increased in the last four decades, and remains a challenge for public health worldwide (Arroyo-Johnson & Mincey, 2016). This increase has been attributed to changes in lifestyle (Ballal, Wilson, Harmancey, & Taegtmeier, 2010), in which sedentary habits (Stein & Colditz, 2004), the consumption of high-fat diets (HFD) (Buettner, Scholmerich, & Bollheimer, 2007), and exposure to stress (Adam & Epel, 2007; Huneault, Mathieu, & Tremblay, 2011) are highly associated.

Stress exposure and high-fat diet (HFD) during sensitive periods of development, such as the prepubertal period, could be associate with the rising rates of obesity observed in children and adolescents. An early exposure to these two factors can induce sex-specific effects on hormonal signaling related to energy balance (Toniazzo et al., 2017) and also program metabolism in juvenile animals (Krolow et al., 2013). In this context, the prepubertal period is critical for sexual maturation (McCormick & Mathews, 2007), and to the development of neuronal circuits that control energy homeostasis and stress responses. In this context, the prepubertal period (immediately prior to the onset of puberty) is critical for sexual maturation, and to the development of neuronal circuits that control energy homeostasis and stress responses (McCormick & Mathews, 2007).

One animal model of stress exposure during the prepubertal period is social isolation: In rodents, social interactions are rewarding and crucial for the social and emotional development of these animals (Douglas, Varlinskaya, & Spear, 2003, 2004; Panksepp & Lahvis, 2007). Therefore, exposure to social isolation in the prepubertal period may have persistent effects on emotion, behavior, and metabolism (Arcego et al.,

2017; Pervanidou & Chrousos, 2012), and it models stress to which children may be exposed during the beginning of their school years.

Additionally, stress exposure, both during the development or in the adulthood, can induce changes in eating behavior (Ely et al., 1997). According to the intensity and duration of stress exposure, it may cause both, increase and decrease in food intake (Ely et al., 1997; Groesz et al., 2012; Pecoraro, Reyes, Gomez, Bhargava, & Dallman, 2004; Silveira et al., 2000). In response to stress, rats demonstrate increased motivation for the ingestion of “comfort foods” (sucrose and fat) (Dallman et al., 2003; Dallman, Pecoraro, & la Fleur, 2005), and stressed animals many times choose diets rich in fat, which is associated with obesity, especially when it is chronically consumed (Peckham & Entenman, 1962; Teegarden & Bale, 2008). The excess of energy supply by HFD may contribute to the increase of reactive oxygen species (ROS) production (Frohnert & Bernlohr, 2013) that, in turn, may lead to mitochondrial dysfunction in muscle (Bonnard et al., 2008) and in brain (Freeman et al., 2013). In agreement, the mediators of the stress response also exert several effects on mitochondrial biogenesis, metabolism, ROS generation, and apoptosis (Manoli et al., 2007). In adults, acute stress is associated with increases in mitochondrial biogenesis, and the enzymatic activity of some respiratory chain complexes. Conversely, chronic stress can lead to abnormal mitochondrial biogenesis, respiratory chain dysfunction, decreased ATP production, increased ROS generation, lipid peroxidation, mitochondrial and nuclear DNA damage, and increased cell apoptosis and/or necrosis (Manoli et al., 2007). Additionally, there are evidences that mitochondrial function (Guevara, Gianotti, Oliver, & Roca, 2011; Guevara et al., 2009), brain mitochondrial respiration, oxidative stress (Gaignard et al., 2015), and mitochondrial biogenesis are sex-dimorphic (Sharma, Johnston, & Hossain, 2014).

The main function of mitochondria is to produce energy for cells in form of adenosine triphosphate (ATP). However, aside from ATP production, the mitochondria participates in the ROS production and elimination (Bournat & Brown, 2010). The imbalance between ROS production and antioxidant defenses (oxidative stress) may culminate in cellular damage (Halliwell, 1997), and, as mentioned above, it may impair mitochondrial function (Frohnert & Bernlohr, 2013). The brain is highly affected by mitochondrial dysfunction due to its high metabolic demand for energy, provided mainly from mitochondrial oxidative metabolism, and due to its vulnerability to oxidative stress (Sohal, Arnold, & Sohal, 1990). However, specific brain regions appear to be particularly susceptible to injury, and in models of obesity, the hypothalamus is highly susceptible to changes (Valdearcos et al., 2017; Velloso & Schwartz, 2011), probably due to its relation with appetite, body weight gain, and glucose homeostasis (Gyengesi, Paxinos, & Andrews, 2012). In this sense, excessive consumption of high-fat diets causes damage to neurons in the hypothalamus, resulting in energy metabolism imbalance, a characteristic found in obesity (Cavadas, Azeiteiro, Souza, & Velloso, 2016; Velloso & Schwartz, 2011). HFD diets may alter mitochondrial dynamics, thus interfering in energetic homeostasis (Carraro et al., 2018), and the mitochondrial dysfunction is, among other mechanisms, involved in hypothalamic damage in obesity (Dietrich, Liu, & Horvath, 2013).

Considering (a) the ability of early environment, including stress exposure and HFD access, two highly prevalent events in the present human societies, in programming hypothalamic functions, and considering (b) that these factors may affect oxidative status and mitochondrial functions, the aim of this work was to investigate the effects of exposure to stress in the prepubertal period and chronic access to HFD, on the

long-term oxidative status and oxidative damage to cells. We also aimed to evaluate respiratory complexes activities and mitochondrial mass in adult male and female rats.

2. Material and Methods

2.1 Subjects

All proceedings were performed in strict accordance to the recommendations of the Brazilian Society for Neurosciences (SBNeC), Brazilian Law on the use of animals (Federal Law 11.794/2008) and were approved by the Institutional Ethical Committee (CEUA-UFRGS 27714). All efforts were made to minimize animal suffering, as well as to reduce the number of animals used. Wistar rats from our own breeding colony were housed in Plexiglas cages (65 x 25 x 15 cm) with the floor covered with sawdust and maintained on a standard 12h dark/light cycle (lights on between 7:00h and 19:00h), temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. At postnatal day (PND) 21, males and females were weaned and separated according to sex. Half of the animals were housed in standard cages in groups of 3 to 5 animals (control); the other animals were submitted to stress by social isolation (isolated in a smaller home cage, 27x17x12 cm) (Arcego et al., 2014; Douglas et al., 2004). Only one male and one female per litter were used in each group. Different diets were offered to the animals: (a) standard lab chow; (b) both standard chow and HFD. These last animals were free to choose between standard chow and HFD. Therefore, four groups of each sex were obtained: (1) controls + standard chow (17 males and 18 females); (2) controls + standard chow and high-fat diet (16 males and 15 females); (3) isolated + standard chow (16 males and 17 females) and (4) isolated + standard chow and HFD (13 males and 15 females). During 40 days, beginning on PND 21, both HFD and standard chow were offered *ad libitum*, according to the groups. Isolation was maintained from PND 21 to 28 and during this period the animals were

not handled, except for the cleaning of the cages. On PND 28, isolated animals were returned to regular home cages in groups of three to five. A timeline of the experimental design is shown in Figure 1. At PND 60 the animals were killed by decapitation, brains were immediately dissected on ice to remove the hypothalamus and biochemical analyses were performed.

2.2 Diets

The nutritional compositions of standard lab chow and high-fat diet are displayed in Table 1. The HFD was enriched with fat (42%) from lard and soy oil. In addition, the diet contained vitamins and a salt mixture, purified soy protein, methionine, lysine and starch (Arcego et al., 2014). This ratio soy oil/lard has larger amounts of saturated and monounsaturated fatty acids, to reproduce the consumption of fat in western diets that have higher percentages of these types of fat, such as “fast foods”.

2.3 Biochemical analysis

2.3.1 *Assessment of Oxidative Stress Parameters*

The animals were killed by decapitation. The whole hypothalamus was quickly dissected out and stored at -80°C until analysis. Structures were then homogenized in 10 vol (w:v) ice-cold 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mM EDTA. The homogenate were centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min at 4°C and the supernatants were used.

2.3.2 *Superoxide Dismutase Activity (SOD)*

Superoxide dismutase activity was determined using the RANSOD kit (Randox Labs., USA), based on the procedure described by Delmas-Beauvieux et al (Delmas-

Beauvieux et al., 1995). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals that react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) to form a formazan dye that is assayed by spectrophotometric analysis at 492 nm at 37°C. The inhibition of the chromogen production is proportional to the activity of SOD present in the sample; one unit of SOD causes 50 % inhibition of the rate of reduction of INT under the conditions of the assay.

2.3.3 *Glutathione Peroxidase Activity (GPx)*

Glutathione peroxidase activity was determined using a RANSEL kit (Randox Labs., USA), based on the method described by (Paglia & Valentine, 1967). In this assay, glutathione peroxidase (GPx) catalyses the oxidation of glutathione (GSH) by Cumene Hydroperoxide. In the presence of glutathione reductase (GR) and NADPH, the oxidized glutathione (GSSG) is immediately converted to the reduced form with a concomitant oxidation of NADPH to NADP⁺. The decrease in absorbance at 340nm is measured.

2.3.4 *Catalase Activity (CAT)*

Catalase activity assessment is based upon establishing the rate of H₂O₂ degradation at 240 nm at 25 °C by spectrophotometric analysis (Aebi, 1984). CAT activity was calculated in micromoles of H₂O₂ consumed per minute per mg of protein, using a molar extinction coefficient of 43.6 M⁻¹cm⁻¹.

2.3.5 *Evaluation of Free Radical Production by the Chemical Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein (DCFH)*

Samples were incubated with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA 100 μ M) at 37°C for 30 min. DCFH-DA is cleaved by cellular esterases and the DCFH formed is eventually oxidized by reactive oxygen/nitrogen species. The formation of the fluorescent derivative dichlorofluorescein (DCF) was monitored by excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively, using a spectrum photometer. The amount of reactive oxygen/nitrogen species was quantified using a DCF standard curve and results were expressed as nmol of DCF formed per mg of protein (Sriram, Pai, Boyd, & Ravindranath, 1997).

2.3.6 Determination of total thiol content

The total thiol content in its reduced form was measured as an estimative of redox status, since it is present in proteins as well as glutathione molecules, and is played as an intracellular redox buffer, as described by (Ellman, 1959). An aliquot of the sample was diluted in SDS 0.1%. Then, was added 0.01 M 5,5dithiobis-2-nitrobenzoic acid in ethanol. The intense yellow color was developed and read in a spectrophotometer at 412 nm after 60 min. Results were expressed as nmol SH/mg protein.

2.3.7 Determination of Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS)

Samples were deproteinized with 10% trichloroacetic acid (1:2) and centrifuged at 10,000g for 10 minutes. The supernatant (100uL) was transferred to a 96 well microplate and mixed with 0.67% TBA (100uL). The mixture was heated in a microplate heater at 100 ° C for 20 minutes. The mixture was cooled and the absorbance was measured at 532 nm with a SpectraMax i3x Spectrophotometer (Molecular Devices, San Jose, CA, USA). TBARS levels are represented as nmol TBARS / mg protein.

2.3.8 Respiratory Chain Activity Determination

Whole hypothalamus were freshly homogenized (1:20, w/v) in SETH buffer (250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM Trizma base), pH 7.4, for determination of respiratory chain complex activities. The homogenates were centrifuged at 1,000 g for 10 min at 4°C and the supernatants were immediately maintained at -80°C until analyses. The activities of the electron transport chain (ETC) complexes I–III, II and IV were determined according to standard methods previously described in the literature (Schapira et al., 1990; Weis et al., 2012). The activity of complex I–III (complex I + CoQ + III) was assessed by measuring the increase in absorbance due to cytochrome *c* reduction at 550 nm, according to the method described by Schapira et al. (Schapira et al., 1990). Complex I–III activity was calculated as the rotenone sensitive NADH: cytochrome *c* reductase activity. The activity of complex II (succinate: DCIP oxyreductase) was determined according to Fischer et al. (Fischer et al., 1985), by following the decrease in absorbance due to the reduction of 2,6-DCIP at 600 nm, in a medium containing sodium succinate, sodium azide, and rotenone and DCIP. Cytochrome *c* oxidase (COX, complex IV) activity was determined according to Rustin et al. (Rustin et al., 1994), following the decrease in absorbance due to the oxidation of previously reduced cytochrome *c* at 550 nm. The activities of the respiratory chain complexes were calculated and expressed as nmol per min per mg of protein.

2.3.9 Mitochondrial mass and membrane potential measurements

Mitotracker was used for mitochondrial function analysis in cell suspensions of whole hypothalamus obtained by mechanical dissociation with PBS containing

MitoTracker Red (MTR or Chloromethyl-X-rosamine) and MitoTracker Green (MTG) dyes were employed (Khanal, Chung, Solis-Wever, Johnson, & Pappas, 2011; Pendergrass, Wolf, & Poot, 2004). MTG is a green-fluorescent fluorophore that accumulates in mitochondria independent of mitochondrial membrane potential and has been used to measure mitochondrial mass (Rodriguez-Enriquez, Kai, Maldonado, Currin, & Lemasters, 2009). MTR is a lipophilic cationic fluorescent dye that is concentrated inside mitochondria because of the negative mitochondrial membrane potential and has been used to measure mitochondrial membrane potential (Pendergrass et al., 2004). MTR and MTG were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to a 1 mM stock concentration. Dissociated cells were stained with 100 nM MTR and 100 nM MTG for 45 min at 37 °C in a water bath in a dark room according to method described by (Pendergrass et al., 2004) with some modifications.

2.3.10 *Flow Cytometry Analysis*

Samples stained with MTR and MTG dyes were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). MitoTracker dyes were excited at 488 nm using an air-cooled argon laser. Negative controls (samples without stain) were included for setting up the machine voltages. Controls stained with a single dye were used to set compensation. The emission of fluorochromes was recorded through specific band-pass fluorescence filters: red (FL-3; 670 nm long pass) and green (FL-1; 530 nm/30). Fluorescence emissions were collected using logarithmic amplification. In brief, data from 10.000 events were acquired and mean relative fluorescence intensity was determined after exclusion of debris events from the data set. All flow cytometric acquisitions and analyses were performed using CELLQuest Pro data acquisition (BD Biosciences) and FlowJo analysis software. The mean fluorescence intensity (MFI) of

each channel was evaluated. The data were plotted as dot plot with mass in y axis and potential on x axis.

2.3.11 Protein Assay

The protein concentration was determined in the samples using the method described by Lowry et al. (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) with bovine serum albumin as the standard.

2.4 Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M of the mean and analyzed using three-way ANOVA, with *isolation stress*, *diet* and *sex* as factors. All analyses were performed using SPSS software and a $P \leq 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 Antioxidant Enzyme Activities and Free Radical Production

Oxidative stress parameters were analyzed to investigate whether there was an oxidative imbalance in the entire hypothalamus of adult male and female rats subjected to isolation stress during the pre-pubertal period, when associated to chronic HFD. When SOD activity was evaluated at PND 60 (Fig 2A), a main effect of sex was observed [three-way ANOVA, $F(1, 45) = 40.22$, $P < 0.001$], since female rats showed higher hypothalamic SOD activity than males. Additionally, three-way ANOVA showed a main effect of sex on SOD/GPx [$F(1, 36) = 7.26$, $P = 0.011$] and SOD/CAT [$F(1, 42) = 16.40$, $P < 0.001$] ratios, since these ratios were higher in females compared to males (Fig 2D,E). Results also showed an effect of HFD [$F(1,43)=7.83$, $P = 0.008$] decreasing GPx activity (Fig 2B) in males and females, while both CAT activity (Fig

2C) and free radical production, as evaluated by the DCFH test, were not altered ($P > 0.05$) (Fig 2F).

3.2 Total thiols, non-protein thiols and Thiobarbituric acid reactive substances

A main effect of *sex* was observed on total thiol and non-protein thiol contents: total thiol content was higher in females [$F(1, 54) = 4.38, P=0.041$] and non-protein thiols were higher in males [$F(1, 41) = 5.08, P= 0.030$] (see Table 2).

With regard to thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels, the exposure to stress decreased TBARS levels in males [interaction between *stress* x *sex*: $F(1,46) = 5.24, P = 0.027$]. In addition, access to the high-fat diet also decreased TBARS levels in males, but it increased in females [interaction between *diet* x *sex*: $F(1,46) = 13.06, P = 0.001$] (see Table 2).

3.3 Respiratory Chain Enzyme Activities

Enzymatic analysis of mitochondrial electron transport chain (ETC) activities in the entire hypothalamus was performed (Figura 3). A main effect of sex was observed on Complex I-III activity [three-way ANOVA, $F(1,33) = 89.89, P < 0.05$], since this activity was lower in females compared to males (Fig 3A). Besides, an interaction between *diet* and *sex* [$F(1, 34) = 4.60, P= 0.039$] showed that females receiving HFD present increased Complex IV activity; in contrast, males receiving HFD presented decreased Complex IV activity (Fig 3C). Complex II activity was not significantly altered ($P > 0.05$) (Fig. 3B).

3.4 Mitochondrial Mass and Membrane Potential

Analyses of hypothalamic cells labeled with MTG and MTR are shown in Fig. 4. A three-way ANOVA showed an interaction between *diet* and *sex* [$F(1, 55) = 5.36, P = 0.024$], suggesting that females receiving HFD had lower mitochondrial mass (Fig 4A). No effect was detected on membrane potential ($P > 0.05$) (Fig 4B).

4. Discussion

The findings of the current study demonstrate sex differences in the activities of antioxidant enzymes and mitochondrial bioenergetics after both pre-pubertal stress and HFD exposure. Additionally, some effects of high-fat diet on mitochondrial function and oxidative defenses were sex-specific, as well as an effect of exposure to social stress isolation during the prepubertal period on lipid peroxidation.

Regarding antioxidant enzymes activities, our results showed that SOD activity was higher in females compared to males, and similar results were found for SOD/CAT and SOD/GPx ratios. SOD is an enzyme that dismutates the superoxide radical formed by electron 'leakage', from the mitochondrial electron transport chain or other mitochondrial functions, producing hydrogen peroxide (H_2O_2). H_2O_2 is a substrate for peroxidases (CAT and GPx), which degrade H_2O_2 into water (H_2O) (Halliwell, 2006). This increase in SOD activity without a proportional increase in peroxidase activity, such as observed in females, may indicate an overload of peroxide challenge (Pinho et al., 2006). However, this hypothetical accumulation of H_2O_2 was not reflected in changes in DCF test, which measures exposure to reactive species. It is interesting that females also showed lower Complex I-III activity when compared to males. Since this complex is a site of electron leakage, for the complexes I and III are the main mediators of ROS production (Leloup et al., 2011), its lower activity could suggest a lower flow of

electrons through the respiratory chain, and lower production of superoxide, thereby explaining why there were no alterations in free radicals production in females. Interestingly, evidences indicates that estrogen increases the expression of mitochondrial electron transport chain proteins, including cytochrome c and complex IV subunits, and also increases complex IV enzyme activity (Duckles, Krause, Stirone, & Procaccio, 2006). Here, we did not found sex differences in the activities of these components of the electron transport chain in rat hypothalamus.

Few studies have investigated the sex- specific effects of HFD on oxidative status, especially in hypothalamus. This structure is important for the control of metabolism and food intake through the integration of several signaling pathways (Drougard, Fournel, Valet, & Knauf, 2015). In recent years, it has been proposed that the reactive oxygen species (ROS) modulates energy balance by acting in different neurons in hypothalamus (Drougard et al., 2015). In this study, access to HFD decreased GPx activity in both, males and females. In neurons, the antioxidant enzyme GPx provides the main pathway of H₂O₂ catabolism (Dringen, Kussmaul, Gutterer, Hirrlinger, & Hamprecht, 1999). This enzyme detoxifies peroxides with a reaction of reduction in which the non-protein thiol GSH donates electrons producing GSSG as final product. In turn, the reduction of GSSG is catalyzed by GSH reductase (GR) in the presence of NADPH (Townsend, Tew, & Tapiero, 2003). Therefore, the decline in GPx activity can contribute to an increased intracellular accumulation of H₂O₂, enhancing cell oxidative damage (Walczewska, Dziedzic, Stepień, Swiatek, & Nowak, 2010). It is noteworthy that, in females receiving HFD, the association between increased SOD activity and decreased GPx activity may result in H₂O₂ accumulation. It is known that low concentrations the H₂O₂ modulates cellular signaling processes (Rice, 2011), while high concentrations can induce oxidative stress (Armogida, Nistico, & Mercuri, 2012),

and may subsequently lead to cell damage and neuronal death (Teepker, Anthes, Fischer, Krieg, & Vedder, 2007). Moreover, H₂O₂ is diffusible and can act in both mitochondrial and cytosolic compartments (Leloup et al., 2011): in the cytosol, H₂O₂ can react directly with thiol residues in redox-sensitive proteins, and it may alter the ratio of reduced glutathione to oxidized glutathione (GSH/GSSG), thus altering the redox status of the cell (Schafer & Buettner, 2001). In the present study, however, no reductions in thiol groups were observed in HFD animals. It should be considered that some studies have shown that a long-term HFD intake increases oxidative stress and causes mitochondrial dysfunctions in distinct tissues, such as muscle and brain (Ballal et al., 2010; Yokota et al., 2009). However, to our knowledge, this is the first study evaluating the effects of chronic HFD on oxidative status in the hypothalamus considering sex-specific differences. In this context of higher SOD activity observed in females with HFD-induced decrease in GPx, our findings suggest that the female hypothalamus is more susceptible to an oxidative imbalance and consequently to a possible cell damage.

As pointed out previously, the nervous tissue is particularly vulnerable to oxidative stress (Halliwell, 2006). In this sense, oxidative stress can lead to oxidation of biomolecules such as lipids, proteins and DNA, resulting in damage to cellular organelles, particularly mitochondria (Miao & St Clair, 2009). The oxidation of protein residues, such as sulfhydryl groups, cause conformational changes, protein unfolding and degradation (Lyras, Cairns, Jenner, Jenner, & Halliwell, 1997). Interestingly, females had higher hypothalamic total thiol contents than males, suggesting lower oxidation of protein sulfhydryl residues and, therefore, higher protection from protein damage compared to males. On the other hand, females had decreased non-protein thiol content than males. It is known that reduced glutathione (GSH) is the most prevalent

non-protein thiol in animal cells, and it is an important non-enzymatic antioxidant for the detoxification of electrophilic components and peroxides (Anderson, 1998), being used by GPx as a donor of electron equivalents (see above). Therefore, GSH deficiency may increase cellular oxidative damage (Townsend et al., 2003). In contrast to this finding, some studies have shown the protective effects of estrogen on oxidative stress in nervous tissues, emphasizing that females are more protected against an oxidative imbalance than males (Razmara, Duckles, Krause, & Procaccio, 2007; Vina et al., 2011). One limitation of our study is that the estrous cycle was not evaluated. However, we must consider that variations of the circulating hormones could lead to higher variability of the parameters evaluated, and, despite these possible variations, statistical significant differences were observed between sexes and in females subjected to HFD.

Interestingly, the isolation stress decreased hypothalamic lipid peroxidation in males. In contrast to our results, rats exposed to chronic variable stress present increased lipid peroxidation in prefrontal cortex (Herbet et al., 2017), and previous studies reported that acute immobilization stress increases levels of lipid peroxidation in the cerebral cortex, cerebellum, hippocampus (Liu et al., 1996), and hypothalamus (Sosnovskii & Kozlov, 1992). More prolonged exposure to immobilization has also been observed to cause activation of lipid peroxidation (Solin & Liashev Iu, 2013). Environmental stressors are known to induce imbalance of antioxidant status [which leads to increased oxidative stress (Madrigal et al., 2001)] as a result of increased release of glucocorticoids (GCs) by the adrenal glands (Simsek, Kaplan, Uysal, Yuksel, & Alaca, 2016). It must be considered, however, that this evaluation was made in the adult age, a long time after exposure to stress. It is possible that in these animals the

hypothalamus underwent an adaptation, turning this structure more resilient to oxidative damage. If this is the case, this adaptation was only induced in males.

Although exposure to an emotional stressor early in life decreased lipid peroxidation in males, this same parameter was increased by HFD in females. Increased hypothalamic lipoperoxidation in females as consequence of HFD consumption may be associated with the observed decrease in GSH content (Radi, Beckman, Bush, & Freeman, 1991). It is known that the GSH donates reduction equivalents to membrane lipids and protects them from oxidants (Curello et al., 1985). Its depletion may facilitate lipid peroxidation and cause structural damage to membranes, including the mitochondrial membrane, leading to mitochondrial dysfunction (Madrigal et al., 2001). Moreover, impaired H₂O₂ catabolism by GPx or catalase also causes an increase in lipid peroxidation that may compromise cell membrane and mitochondrial integrity and potentiate bioenergetic failure (Demarest & McCarthy, 2015). Since our results suggest that access to HFD exacerbates H₂O₂ accumulation in females, it is possible that increased H₂O₂ may be related to decreased GSH and higher lipid damage.

High-fat diets can compromise mitochondrial membranes leading to perturbations in membrane fluidity (Tsalouhidou et al., 2006), function of transporters (Hoch, 1992), calcium dynamics (Patergnani et al., 2011), gene expression (Flachs et al., 2006) and post translational protein modifications (Hasselbaink, Roemen, & van der Vusse, 2002). Hence, diets rich in fat may cause alterations in the mitochondrial function and production of mitochondrial ROS (Yu et al., 2014). This organelle that houses the electron transport chain (ETC) is responsible for the generation of ATP and for several metabolic pathways (Manoli et al., 2007). The ETC consists in four protein complexes: complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase), complex II (succinate:ubiquinone oxidoreductase), complex III (ubiquinol: cytochrome c oxidoreductase), and complex

IV (cytochrome c oxidase), encoded by genes of the mitochondrial genome and by genes in the cell nucleus (Mattson, Gleichmann, & Cheng, 2008). In aerobic conditions, electrons from fuels oxidation are transferred through nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FADH₂) to molecular oxygen, which is converted into H₂O while the enzymatic complexes I, III and IV pump protons of the mitochondrial matrix to the intermembrane space, and generates an electrochemical gradient used by complex V to produce ATP (Manoli et al., 2007). The ETC is also an important source for reactive oxygen species (ROS) including superoxide ($\bullet\text{O}_2^-$), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxyl radical (OH \bullet), and singlet oxygen (Wallace et al., 1995). Previous experiments in mice have shown that HFD decreases expression of genes involved in oxidative phosphorylation (OXPHOS), genes encoding proteins in complexes I, II, III, and IV of the electron transport chain as well as transcription factors and cofactors in skeletal muscle (Sparks et al., 2005).

The consumption of HFD increased Complex IV activity only in females, while this activity was reduced in males. It is possible that the Complex IV is more active in females as a compensatory mechanism, in response to the excess of energy supplied through HFD. This dissociation between the effects of HFD in males and females has been observed previously: males receiving HFD presented a lower T3/T4 ratio and a higher caloric efficiency compared to controls, while females did not show these effects (Toniazzi et al., 2018).

Mitochondrial dysfunction, including reduction of mitochondrial mass, has been reported in peripheral tissue of obese individuals or in animal models after high fat diet (Bournat & Brown, 2010). We observed that HFD decreased mitochondrial mass in the hypothalamus from females. In agreement, sex-differences in mitochondrial biogenesis have been previously reported (Sharma et al., 2014). It is possible that the oxidative

stress induced by HFD consumption in females is responsible for this altered mitochondrial dynamics, according to what was discussed above for the increased Complex IV activity. Moreover, mitochondrial dysfunction could be linked to defects in fatty acid oxidation, and it has been proposed that hypothalamic fatty acid oxidation/accumulation may be involved in the regulation of feeding and glucose homeostasis (Duca & Yue, 2014).

In summary, the present findings show that males and females respond differently to the effects of stress in the prepubertal period and to HFD consumption. Females were more susceptible to an oxidative imbalance and a possible cell damage. The chronic consumption of HFD induced changes in mitochondria mainly in females, such as lower mitochondrial mass and increased Complex IV activity. Our data reinforce the importance of investigating the effects of environmental factors on oxidative status and on mitochondrial function considering sex-specific effects. Additionally, these data may collaborate with the investigation of the mechanisms involved in the development of obesity and contribute to the prevention measures and new therapies in order to attend sex -different particularities.

Acknowledgments and Funding

This work was supported by INCT/CNPq 465671/2014-4.

5. References

- Adam, T. C., & Epel, E. S. (2007). Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav*, *91*(4), 449-458. doi:10.1016/j.physbeh.2007.04.011
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, *105*, 121-126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660>
- Anderson, M. E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact*, *111-112*, 1-14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679538>
- Arcego, D. M., Krolow, R., Lampert, C., Noschang, C., Ferreira, A. G., Scherer, E., . . . Dalmaz, C. (2014). Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiol Behav*, *124*, 23-32. doi:10.1016/j.physbeh.2013.10.029
- Arcego, D. M., Toniazco, A. P., Krolow, R., Lampert, C., Berlitz, C., Dos Santos Garcia, E., . . . Dalmaz, C. (2017). Impact of High-Fat Diet and Early Stress on Depressive-Like Behavior and Hippocampal Plasticity in Adult Male Rats. *Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s12035-017-0538-y
- Armogida, M., Nistico, R., & Mercuri, N. B. (2012). Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia. *Br J Pharmacol*, *166*(4), 1211-1224. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01912.x
- Arroyo-Johnson, C., & Mincey, K. D. (2016). Obesity Epidemiology Worldwide. *Gastroenterol Clin North Am*, *45*(4), 571-579. doi:10.1016/j.gtc.2016.07.012
- Ballal, K., Wilson, C. R., Harmancey, R., & Taegtmeier, H. (2010). Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. *Mol Cell Biochem*, *344*(1-2), 221-230. doi:10.1007/s11010-010-0546-y
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseau, E., Chauvin, M. A., Morio, B., . . . Rieusset, J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest*, *118*(2), 789-800. doi:10.1172/JCI32601
- Bournat, J. C., & Brown, C. W. (2010). Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, *17*(5), 446-452. doi:10.1097/MED.0b013e32833c3026
- Buettner, R., Scholmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*, *15*(4), 798-808. doi:10.1038/oby.2007.608
- Carraro, R. S., Souza, G. F., Solon, C., Razolli, D. S., Chausse, B., Barbizan, R., . . . Velloso, L. A. (2018). Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol*, *460*, 238-245. doi:10.1016/j.mce.2017.07.029
- Cavadas, C., Aveleira, C. A., Souza, G. F., & Velloso, L. A. (2016). The pathophysiology of defective proteostasis in the hypothalamus - from obesity to ageing. *Nat Rev Endocrinol*, *12*(12), 723-733. doi:10.1038/nrendo.2016.107

- Curello, S., Ceconi, C., Bigoli, C., Ferrari, R., Albertini, A., & Guarnieri, C. (1985). Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. *Experientia*, 41(1), 42-43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3967736>
- Dallman, M. F., Pecoraro, N., Akana, S. F., La Fleur, S. E., Gomez, F., Houshyar, H., . . . Manalo, S. (2003). Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20), 11696-11701. doi:10.1073/pnas.1934666100
- Dallman, M. F., Pecoraro, N. C., & la Fleur, S. E. (2005). Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun*, 19(4), 275-280. doi:10.1016/j.bbi.2004.11.004
- Delmas-Beauvieux, M. C., Peuchant, E., Dumon, M. F., Receveur, M. C., Le Bras, M., & Clerc, M. (1995). Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin Biochem*, 28(2), 163-169. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628075>
- Demarest, T. G., & McCarthy, M. M. (2015). Sex differences in mitochondrial (dys)function: Implications for neuroprotection. *J Bioenerg Biomembr*, 47(1-2), 173-188. doi:10.1007/s10863-014-9583-7
- Dietrich, M. O., Liu, Z. W., & Horvath, T. L. (2013). Mitochondrial dynamics controlled by mitofusins regulate Agrp neuronal activity and diet-induced obesity. *Cell*, 155(1), 188-199. doi:10.1016/j.cell.2013.09.004
- Douglas, L. A., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2003). Novel-object place conditioning in adolescent and adult male and female rats: effects of social isolation. *Physiol Behav*, 80(2-3), 317-325. doi:S003193840300266X [pii]
- Douglas, L. A., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2004). Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Dev Psychobiol*, 45(3), 153-162. doi:10.1002/dev.20025
- Dringen, R., Kussmaul, L., Gutterer, J. M., Hirrlinger, J., & Hamprecht, B. (1999). The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem*, 72(6), 2523-2530. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10349863>
- Drougard, A., Fournel, A., Valet, P., & Knauf, C. (2015). Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front Neurosci*, 9, 56. doi:10.3389/fnins.2015.00056
- Duca, F. A., & Yue, J. T. (2014). Fatty acid sensing in the gut and the hypothalamus: in vivo and in vitro perspectives. *Mol Cell Endocrinol*, 397(1-2), 23-33. doi:10.1016/j.mce.2014.09.022
- Duckles, S. P., Krause, D. N., Stirone, C., & Procaccio, V. (2006). Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol Interv*, 6(1), 26-35. doi:10.1124/mi.6.1.6
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82(1), 70-77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13650640>
- Ely, D. R., Dapper, V., Marasca, J., Correa, J. B., Gamaro, G. D., Xavier, M. H., . . . Dalmaz, C. (1997). Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav*, 61(3), 395-398. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9089758>
- Fischer, J. C., Ruitenbeek, W., Berden, J. A., Trijbels, J. M., Veerkamp, J. H., Stadhouders, A. M., . . . Janssen, A. J. (1985). Differential investigation of the

- capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*, 153(1), 23-36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3000647>
- Flachs, P., Mohamed-Ali, V., Horakova, O., Rossmeisl, M., Hosseinzadeh-Attar, M. J., Hensler, M., . . . Kopecky, J. (2006). Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, 49(2), 394-397. doi:10.1007/s00125-005-0053-y
- Freeman, L. R., Zhang, L., Nair, A., Dasuri, K., Francis, J., Fernandez-Kim, S. O., . . . Keller, J. N. (2013). Obesity increases cerebrocortical reactive oxygen species and impairs brain function. *Free Radic Biol Med*, 56, 226-233. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.577
- Frohnert, B. I., & Bernlohr, D. A. (2013). Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Adv Nutr*, 4(2), 157-163. doi:10.3945/an.112.003319
- Gaignard, P., Savoroux, S., Liere, P., Pianos, A., Therond, P., Schumacher, M., . . . Guennoun, R. (2015). Effect of Sex Differences on Brain Mitochondrial Function and Its Suppression by Ovariectomy and in Aged Mice. *Endocrinology*, 156(8), 2893-2904. doi:10.1210/en.2014-1913
- Groesz, L. M., McCoy, S., Carl, J., Saslow, L., Stewart, J., Adler, N., . . . Epel, E. (2012). What is eating you? Stress and the drive to eat. *Appetite*, 58(2), 717-721. doi:10.1016/j.appet.2011.11.028
- Guevara, R., Gianotti, M., Oliver, J., & Roca, P. (2011). Age and sex-related changes in rat brain mitochondrial oxidative status. *Exp Gerontol*, 46(11), 923-928. doi:10.1016/j.exger.2011.08.003
- Guevara, R., Santandreu, F. M., Valle, A., Gianotti, M., Oliver, J., & Roca, P. (2009). Sex-dependent differences in aged rat brain mitochondrial function and oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 46(2), 169-175. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.035
- Gyengesi, E., Paxinos, G., & Andrews, Z. B. (2012). Oxidative Stress in the Hypothalamus: the Importance of Calcium Signaling and Mitochondrial ROS in Body Weight Regulation. *Curr Neuropharmacol*, 10(4), 344-353. doi:10.2174/157015912804143496
- Halliwell, B. (1997). Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol*, 38, 3-20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895801>
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97(6), 1634-1658. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x
- Hasselbaink, D. M., Roemen, T. H., & van der Vusse, G. J. (2002). Protein acylation in the cardiac muscle like cell line, H9c2. *Mol Cell Biochem*, 239(1-2), 101-112. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12479575>
- Herbet, M., Korga, A., Gawronska-Grzywacz, M., Izdebska, M., Piatkowska-Chmiel, I., Poleszak, E., . . . Dudka, J. (2017). Chronic Variable Stress Is Responsible for Lipid and DNA Oxidative Disorders and Activation of Oxidative Stress Response Genes in the Brain of Rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 7313090. doi:10.1155/2017/7313090
- Hoch, F. L. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta*, 1113(1), 71-133. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1550861>
- Huneault, L., Mathieu, M. E., & Tremblay, A. (2011). Globalization and modernization: an obesogenic combination. *Obes Rev*, 12(5), e64-72. doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00817.x

- Khanal, G., Chung, K., Solis-Wever, X., Johnson, B., & Pappas, D. (2011). Ischemia/reperfusion injury of primary porcine cardiomyocytes in a low-shear microfluidic culture and analysis device. *Analyst*, *136*(17), 3519-3526. doi:10.1039/c0an00845a
- Krolow, R., Noschang, C., Arcego, D. M., Huffell, A. P., Marcolin, M. L., Benitz, A. N., . . . Dalmaz, C. (2013). Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism*, *62*(9), 1268-1278. doi:10.1016/j.metabol.2013.04.009
- Leloup, C., Casteilla, L., Carriere, A., Galinier, A., Benani, A., Carneiro, L., & Penicaud, L. (2011). Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal*, *14*(3), 519-530. doi:10.1089/ars.2010.3424
- Liu, J., Wang, X., Shigenaga, M. K., Yeo, H. C., Mori, A., & Ames, B. N. (1996). Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J*, *10*(13), 1532-1538. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940299>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, *193*(1), 265-275. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
- Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P., & Halliwell, B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem*, *68*(5), 2061-2069. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9109533>
- Madrigal, J. L., Olivenza, R., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Rodrigo, J., & Leza, J. C. (2001). Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, *24*(4), 420-429. doi:10.1016/S0893-133X(00)00208-6
- Manoli, I., Alesci, S., Blackman, M. R., Su, Y. A., Rennert, O. M., & Chrousos, G. P. (2007). Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol Metab*, *18*(5), 190-198. doi:10.1016/j.tem.2007.04.004
- Mattson, M. P., Gleichmann, M., & Cheng, A. (2008). Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*, *60*(5), 748-766. doi:10.1016/j.neuron.2008.10.010
- McCormick, C. M., & Mathews, I. Z. (2007). HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacol Biochem Behav*, *86*(2), 220-233. doi:10.1016/j.pbb.2006.07.012
- Miao, L., & St Clair, D. K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med*, *47*(4), 344-356. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, *70*(1), 158-169. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6066618>
- Panksepp, J. B., & Lahvis, G. P. (2007). Social reward among juvenile mice. *Genes Brain Behav*, *6*(7), 661-671. doi:GBB295 [pii] 10.1111/j.1601-183X.2006.00295.x
- Patergnani, S., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., Bonora, M., De Marchi, E., . . . Pinton, P. (2011). Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal*, *9*, 19. doi:10.1186/1478-811X-9-19

- Peckham, S. C., & Entenman, C. (1962). The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *Res Dev Tech Rep*, 23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14484833>
- Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., & Dallman, M. F. (2004). Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*, 145(8), 3754-3762. doi:10.1210/en.2004-0305
- Pendergrass, W., Wolf, N., & Poot, M. (2004). Efficacy of MitoTracker Green and CMXrosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A*, 61(2), 162-169. doi:10.1002/cyto.a.20033
- Pervanidou, P., & Chrousos, G. P. (2012). Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism*, 61(5), 611-619. doi:10.1016/j.metabol.2011.10.005
- Pinho, R. A., Andrades, M. E., Oliveira, M. R., Pirola, A. C., Zago, M. S., Silveira, P. C., . . . Moreira, J. C. (2006). Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biol Int*, 30(10), 848-853. doi:10.1016/j.cellbi.2006.03.011
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., & Freeman, B. A. (1991). Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*, 266(7), 4244-4250. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1847917>
- Razmara, A., Duckles, S. P., Krause, D. N., & Procaccio, V. (2007). Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res*, 1176, 71-81. doi:10.1016/j.brainres.2007.08.036
- Rice, M. E. (2011). H₂O₂: a dynamic neuromodulator. *Neuroscientist*, 17(4), 389-406. doi:10.1177/1073858411404531
- Rodriguez-Enriquez, S., Kai, Y., Maldonado, E., Currin, R. T., & Lemasters, J. J. (2009). Roles of mitophagy and the mitochondrial permeability transition in remodeling of cultured rat hepatocytes. *Autophagy*, 5(8), 1099-1106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19783904>
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M., & Munnich, A. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta*, 228(1), 35-51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7955428>
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*, 30(11), 1191-1212. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11368918>
- Schapira, A. H., Mann, V. M., Cooper, J. M., Dexter, D., Daniel, S. E., Jenner, P., . . . Marsden, C. D. (1990). Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 55(6), 2142-2145. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2121905>
- Sharma, J., Johnston, M. V., & Hossain, M. A. (2014). Sex differences in mitochondrial biogenesis determine neuronal death and survival in response to oxygen glucose deprivation and reoxygenation. *BMC Neurosci*, 15, 9. doi:10.1186/1471-2202-15-9
- Silveira, P. P., Xavier, M. H., Souza, F. H., Manoli, L. P., Rosat, R. M., Ferreira, M. B., & Dalmaz, C. (2000). Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam administration on sweet food ingestion in rats. *Braz J*

- Med Biol Res*, 33(11), 1343-1350. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050666>
- Simsek, S., Kaplan, I., Uysal, C., Yuksel, T., & Alaca, R. (2016). The Levels of Cortisol, Oxidative Stress, and DNA Damage in the Victims of Childhood Sexual Abuse: A Preliminary Study. *J Child Sex Abus*, 25(2), 175-184. doi:10.1080/10538712.2016.1123790
- Sohal, R. S., Arnold, L. A., & Sohal, B. H. (1990). Age-related changes in antioxidant enzymes and prooxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Radic Biol Med*, 9(6), 495-500. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1964146>
- Solin, A. V., & Liashev Iu, D. (2013). [Lipid peroxidation in the immobilization stress of different duration]. *Ross Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 99(6), 751-755. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24459884>
- Sosnovskii, A. S., & Kozlov, A. V. (1992). [Increased lipid peroxidation in the rat hypothalamus after short-term emotional stress]. *Biull Eksp Biol Med*, 113(5), 486-488. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1421260>
- Sparks, L. M., Xie, H., Koza, R. A., Mynatt, R., Hulver, M. W., Bray, G. A., & Smith, S. R. (2005). A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes*, 54(7), 1926-1933. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983191>
- Sriram, K., Pai, K. S., Boyd, M. R., & Ravindranath, V. (1997). Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res*, 749(1), 44-52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9070626>
- Stein, C. J., & Colditz, G. A. (2004). The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6), 2522-2525. doi:10.1210/jc.2004-0288
- Teegarden, S. L., & Bale, T. L. (2008). Effects of stress on dietary preference and intake are dependent on access and stress sensitivity. *Physiol Behav*, 93(4-5), 713-723. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.030
- Teepker, M., Anthes, N., Fischer, S., Krieg, J. C., & Vedder, H. (2007). Effects of oxidative challenge and calcium on ATP-levels in neuronal cells. *Neurotoxicology*, 28(1), 19-26. doi:10.1016/j.neuro.2006.06.001
- Toniazzo, A. P., D, M. A., Lazzaretti, C., Lampert, C., S, N. W., Proto-Siqueira, R., . . . Dalmaz, C. (2017). Sex-specific effects of prepubertal stress and high-fat diet on leptin signaling in rats. *Nutrition*, 50, 18-25. doi:10.1016/j.nut.2017.10.018
- Toniazzo, A. P., D, M. A., Lazzaretti, C., Lampert, C., S, N. W., Proto-Siqueira, R., . . . Dalmaz, C. (2018). Sex-specific effects of prepubertal stress and high-fat diet on leptin signaling in rats. *Nutrition*, 50, 18-25. doi:10.1016/j.nut.2017.10.018
- Townsend, D. M., Tew, K. D., & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 57(3-4), 145-155. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818476>
- Tsalouhidou, S., Argyrou, C., Theofilidis, G., Karaoglanidis, D., Orfanidou, E., Nikolaidis, M. G., . . . Mougios, V. (2006). Mitochondrial phospholipids of rat skeletal muscle are less polyunsaturated than whole tissue phospholipids: implications for protection against oxidative stress. *J Anim Sci*, 84(10), 2818-2825. doi:10.2527/jas.2006-031
- Valdearcos, M., Douglass, J. D., Robblee, M. M., Dorfman, M. D., Stifler, D. R., Bennett, M. L., . . . Koliwad, S. K. (2017). Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and

- Mediates Obesity Susceptibility. *Cell Metab*, 26(1), 185-197 e183. doi:10.1016/j.cmet.2017.05.015
- Velloso, L. A., & Schwartz, M. W. (2011). Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*, 35(12), 1455-1465. doi:10.1038/ijo.2011.56
- Vina, J., Gambini, J., Lopez-Gruoso, R., Abdelaziz, K. M., Jove, M., & Borras, C. (2011). Females live longer than males: role of oxidative stress. *Curr Pharm Des*, 17(36), 3959-3965. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22188448>
- Walczewska, A., Dziedzic, B., Stepień, T., Swiatek, E., & Nowak, D. (2010). Effect of dietary fats on oxidative-antioxidative status of blood in rats. *J Clin Biochem Nutr*, 47(1), 18-26. doi:10.3164/jcbn.09-116
- Wallace, D. C., Shoffner, J. M., Trounce, I., Brown, M. D., Ballinger, S. W., Corral-Debrinski, M., . . . Lott, M. T. (1995). Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. *Biochim Biophys Acta*, 1271(1), 141-151. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7599200>
- Weis, S. N., Pettenuzzo, L. F., Krolow, R., Valentim, L. M., Mota, C. S., Dalmaz, C., . . . Netto, C. A. (2012). Neonatal hypoxia-ischemia induces sex-related changes in rat brain mitochondria. *Mitochondrion*, 12(2), 271-279. doi:10.1016/j.mito.2011.10.002
- Yokota, T., Kinugawa, S., Hirabayashi, K., Matsushima, S., Inoue, N., Ohta, Y., . . . Tsutsui, H. (2009). Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 297(3), H1069-1077. doi:10.1152/ajpheart.00267.2009
- Yu, L., Fink, B. D., Herlein, J. A., Oltman, C. L., Lamping, K. G., & Sivitz, W. I. (2014). Dietary fat, fatty acid saturation and mitochondrial bioenergetics. *J Bioenerg Biomembr*, 46(1), 33-44. doi:10.1007/s10863-013-9530-z

Table 1. Nutritional composition /100g of the food used in the studies performed.

HFD: high fat diet

Diet	Energy (Kcal)	Total Protein (g)	Total carbohydrate (g)	Total Fat (g)
Standard chow ^a	301.2	22	44.3 (from starch)	4.0 (0.6 from saturated and 3.4 from unsaturated fat)
HFD (Arcego et al., 2014)		28	25 (12.5 from starch and 12.5 from sucrose)	42 (16 from saturated and 26 from unsaturated fat)

^a Nuvilab[®]

^b (Arcego et al., 2014) Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: Effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress.

Neurochem Res. 2013 Sep;38(9):1791-800.

Table 2. Effects of isolation stress during the prepuberal period with or without chronic access to HFD on redox parameters in adult male and female rats. TBARS (nmol NMDA/mg protein), total Thiols (nmolSH/mg protein) and non-protein thiols.

Sex	Redox Parameters	Group			
		Control		Stress	
		Chow	Chow + HFD	Chow	Chow + HFD
Males	TBARS levels	7.72 ± 1.14 ^a	4.98 ± 0.73 ^b	5.51 ± 0.56 ^{s a}	2.61 ± 0.44 ^s
	Total thiol content	48.58 ± 1.88	50.17 ± 1.93	49.15 ± 2.54	51.38 ± 3.28
	Non- protein thiol	16.29 ± 2.09	15.46 ± 1.98	11.85 ± 0.98	16.36 ± 2.45
Females	TBARS levels	1.01 ± 0.14	1.86 ± 0.32	1.04 ± 0.15 ^s	1.88 ± 1.13 ^s
	Total thiol content*	53.50 ± 3.51	57.59 ± 4.76	54.38 ± 6.88	54.11 ± 2.06
	Non- protein thiol*	13.62 ± 1.76	7.97 ± 2.31	12.49 ± 0.50	11.92 ± 4.06

Data are expressed as mean ± S.E.M., N=5-10/ group.

There were interactions *stress* x *sex* (P= 0.027; exposure to stress decreased TBARS levels in males), and *diet* x *sex* (P= 0.001; access to HFD decreased TBARS in males, while it increased in females). With regard to total thiols and non-protein thiols, a main effect of *sex* was noted, with total thiols being higher in females (P = 0.041), and non-protein thiols higher in males (P = 0.030). ^s Effect of stress; *Effect of sex

^a Different from all females (post-hoc Bonferroni test);

^b Different from females groups receiving standard chow (post-hoc Bonferroni test);

Legends to Figures

Figure 1 Time-line of the experimental design.

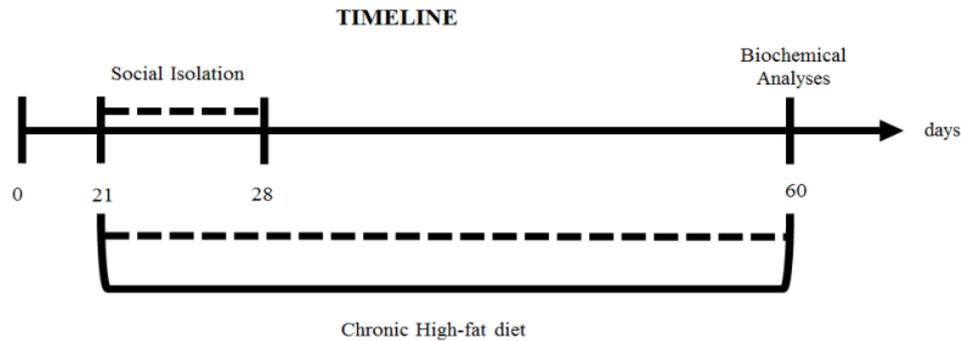


Fig 1. Timeline of the experimental design. At postnatal day (PND) 21, animals were separated according to sex, and housed in groups (control) or isolated for 7 days. They received standard lab chow, or both standard chow and high fat diet from PND 21 to PND 60.

Fig 2. Effect of isolation stress during the prepubertal period, with or without chronic access to HFD on antioxidant enzyme activities, and free radicals (DCFH test) production in hypothalamus of adult male and female rats. Data are expressed as mean \pm S.E.M., N= 5-8/group. **(A) SOD (expressed as U SOD/mg protein).** Three-way ANOVA showed an effect of sex ($P < 0.001$), since females displayed higher SOD activity than males. **(B) GPx (expressed as nmol NADPH oxidized/min/mg protein).** Three-way ANOVA showed that HFD decreased GPx activity ($P = 0.008$). **(C) CAT (expressed as micromoles of H_2O_2 consumed/min/mg protein).** No effect was

observed ($P > 0.05$). **(D) SOD/CAT ratio.** There was a main effect of *sex* ($P < 0.001$), since females had higher SOD/CAT ratio than males. **(E) SOD/GPx ratio.** A main effect of *sex* was noted, with SOD/CAT ratio being higher in females ($P = 0.011$). **(F) DCFH production (expressed as nmol of DCF formed/mg protein).** No effect was observed ($P > 0.05$). # Effect of diet; * Effect of sex.

Fig 3. Effect of isolation stress during the prepubertal period, with or without chronic access to HFD on respiratory chain activity. Data are expressed as mean \pm S.E.M., N= 4-6/ group. **(A) Complex I–III activity (nmol cytochromo c reduced/min/mg protein).** There was a main effect of *sex* ($P < 0.001$) on Complex I-III activity that was smaller in females. **(B) Complex II activity (nmol DCIP reduced/min/mg protein).** No effect was observed ($P > 0.05$). **(C) Complex IV activity (nmol cytochromo c oxidized/min/mg protein).** HFD increased Complex IV activity in females and decreased this activity in males (three-way ANOVA interaction of *diet* x *sex*, $P = 0.039$).

Fig 4. Effect of isolation stress during the prepubertal period, with or without chronic access to HFD on cells labeled with Mitotracker Green (mitochondrial mass) or Mitotracker Red (mitochondrial potential) in the hypothalamus of adult male and female rats. Data are expressed as mean \pm S.E.M., N= 6-10/group. **(A) Mitochondrial mass.** Three-way ANOVA showed an interaction between *diet* x *sex* ($P = 0.024$), since the access to HFD decreased mitochondrial mass in females. **(B) Mitochondrial potential.** No effect was observed ($P > 0.05$).

Fig 2.

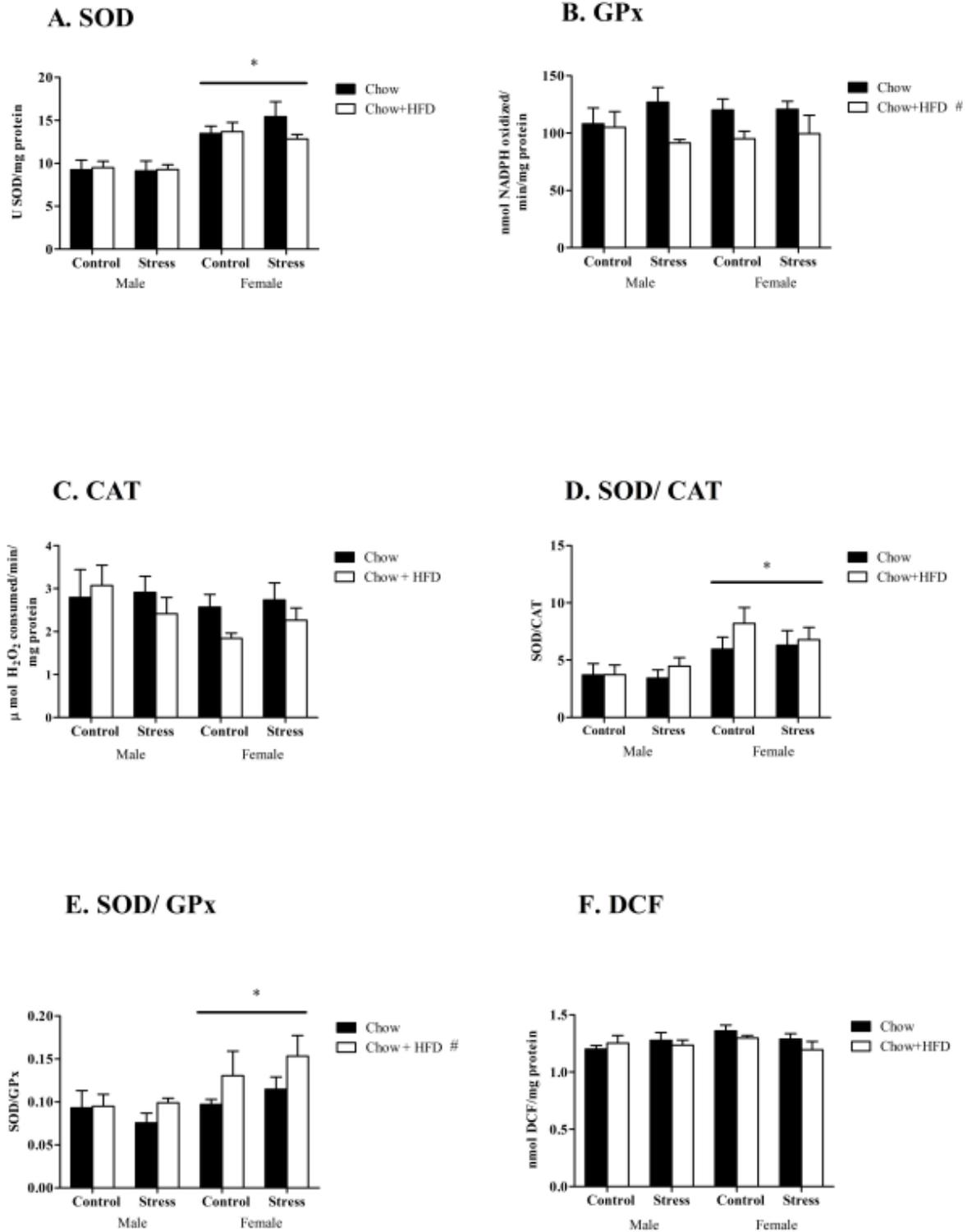


Fig 3.

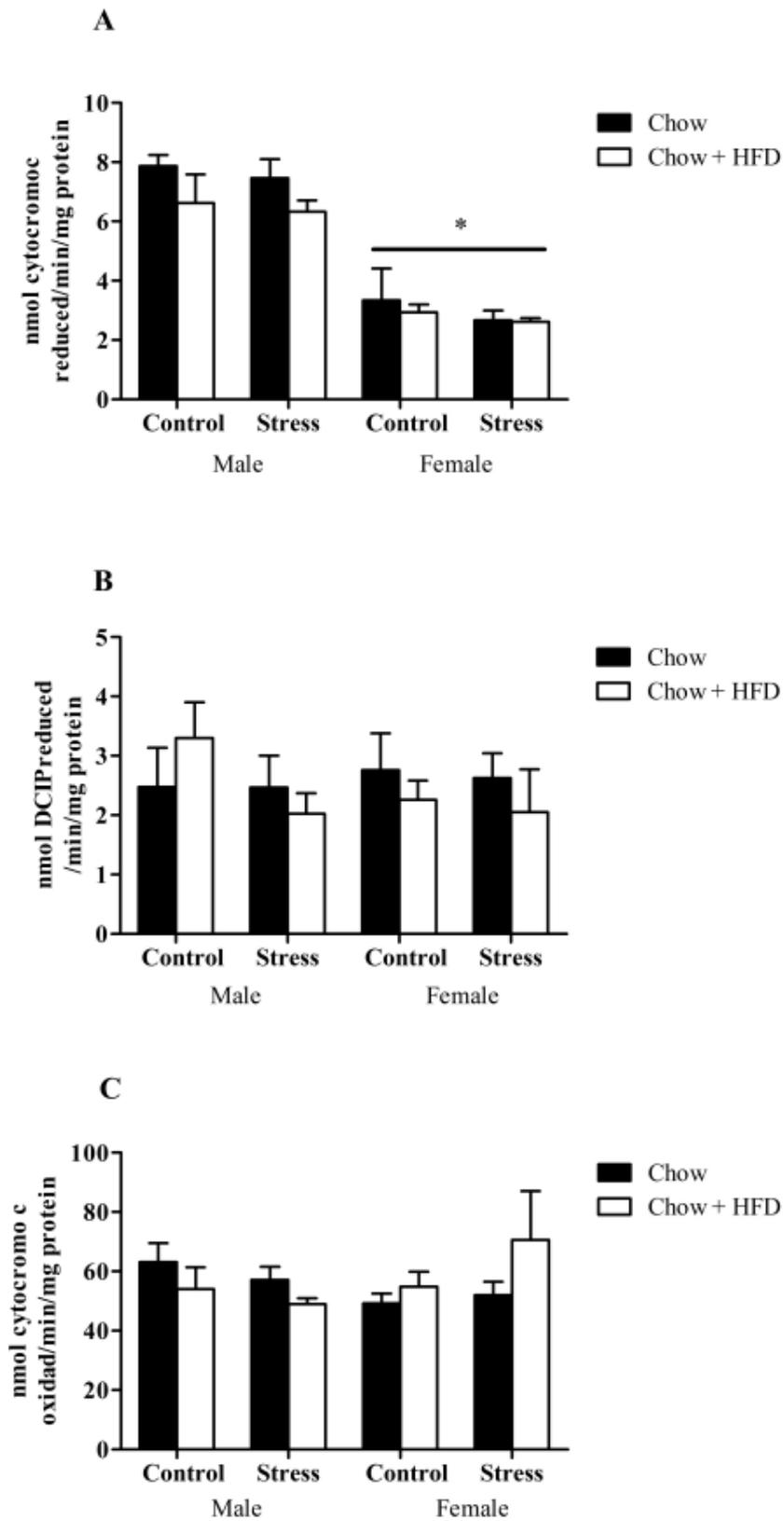
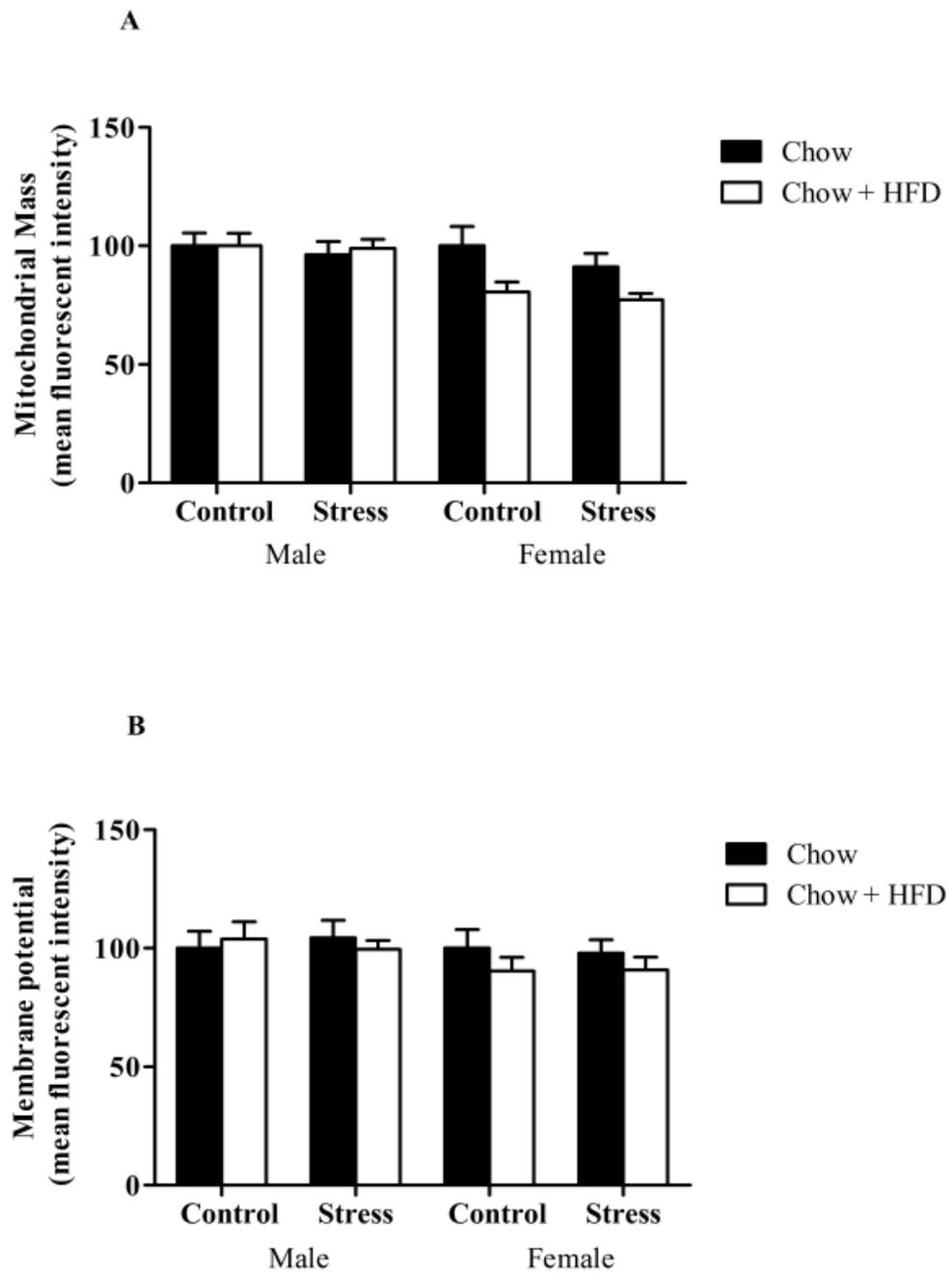


Fig 4.



4. DISCUSSÃO

A presente tese teve por objetivo investigar os efeitos sexo-específicos do isolamento social durante o período pré-púbere, associado ao consumo crônico de uma DRG, sobre: parâmetros de regulação do balanço energético, aspectos da função mitocondrial, o “status” oxidativo celular e danos a célula em ratos adultos. É importante destacar que o período do desenvolvimento no qual os animais foram expostos ao isolamento social, o período pré-púbere, é uma fase em que há uma intensa maturação de circuitos neuronais que controlam a homeostase energética e as respostas ao estresse (McCormick and Mathews, 2007). Durante esse período, a exposição a fatores ambientais pode alterar processos de maturação do sistema nervoso (McQuillen and Ferrero, 2004), assim como causar alterações endócrino-metabólicas permanentes (Schmidt et al., 2009). Nesse sentido, a hipótese dessa tese foi de que o isolamento social no período pré-púbere, associado ao consumo crônico de uma DRG, levaria a alterações importantes em longo prazo no metabolismo periférico e na sinalização central de hormônios relacionados ao metabolismo energético. Além disso, nos perguntamos se esses fatores poderiam causar disfunções mitocondriais e por consequência danos à célula, considerando-se a participação central da mitocôndria no metabolismo energético e seu grande envolvimento nas respostas ao estresse. Muitos de nossos achados mostraram que o isolamento no período pré-púbere associado ao consumo de uma DRG programaram o metabolismo dos animais de forma diferente entre os sexos, assim como observado em trabalhos anteriores do nosso grupo utilizando uma dieta palatável rica em carboidratos simples (Krolow et al., 2013a).

O estresse social é considerado um dos mais graves estressores durante o desenvolvimento e pode ter efeitos comportamentais e neuroquímicos persistentes. Nesse sentido, o paradigma de isolamento social precoce utilizado por esse trabalho visou mimetizar a perda dos pais ou uma privação social grave, experiências

encontradas em crianças expostas a negligência ou em crianças vítimas de “bullying”. É importante destacar que grande parte dos estudos da literatura utilizam uma exposição ao isolamento social de longo prazo, iniciando-se logo após o desmame e perdurando até a idade adulta. Poucos trabalhos investigam os efeitos de uma exposição mais curta ao isolamento social, durante o período pré-púbere. Adicionalmente, grande parte dos trabalhos envolve apenas um sexo, raros trabalhos investigam os efeitos do estresse e do consumo crônico de uma DRG comparando machos e fêmeas. Cabe ressaltar que nesse trabalho os animais foram submetidos a intervenções antes de entrarem na puberdade não havendo, portanto, grandes diferenças nos níveis de hormônios gonadais durante essa fase. Os níveis de estrógenos e andrógenos apresentam aumentos apenas após a puberdade, o que pode ter influenciado na predominância de efeitos do sexo na idade adulta.

Com relação aos achados metabólicos periféricos, observamos que, durante a semana do estresse, a exposição ao isolamento social aumentou o consumo calórico total (ração padrão + DRG). É importante considerar que o comportamento alimentar durante a exposição a um estressor pode variar dependendo da composição da dieta oferecida, do tempo de exposição e da gravidade do estressor. Nesse contexto, além de consumirem mais calorias totais, verificamos que a maior porcentagem das calorias foi obtida via DRG nos animais isolados, indicando uma maior preferência por alimentos hiperlipídicos em períodos de estresse. De acordo com essas observações, um estudo prévio com modelo animal mostrou a preferência por alimento palatável durante a exposição a um estressor crônico em período inicial da vida (Machado et al., 2013). Crescentes evidências estão de acordo com nosso achado, mostrando aumento na preferência pelo consumo de alimentos palatáveis durante períodos de estresse (Dallman et al., 2003, Pecoraro et al., 2004, Zellner et al., 2006, Machado et al., 2013). Alguns

desses trabalhos defendem a teoria da utilização do alimento como uma compensação, na qual o aumento de glicocorticoides liberados por consequência da ativação do eixo HHA em situações de estresse está associado a preferência por alimentos confortantes (alimentos altamente calóricos e saborosos ricos em açúcar e/ou gordura). Essa preferência por esses alimentos seria uma forma de adaptação do organismo para reduzir as respostas do eixo HHA ao estresse (Dallman et al., 2003, Pecoraro et al., 2004).

Os animais que receberam a DRG durante a semana de exposição ao estresse apresentaram reduzida eficiência calórica, ou seja, apesar desses animais terem consumido mais calorias totais, esse maior consumo calórico não foi acompanhado pelo ganho proporcional de peso corporal, indicando que esses animais não converteram as calorias provindas da DRG em ganho de massa corporal. Como o período em que os animais foram expostos ao estresse, o período pré-púbere, é considerado uma fase de intenso desenvolvimento físico, grande parte das calorias provindas da DRG pode estar sendo destinada para o crescimento físico ou utilizada como fonte energética através da oxidação lipídica. Adicionalmente, em fases precoces, o volume de tecido adiposo marrom é maior comparado a idades mais avançadas, possibilitando uma maior perda energética na forma de calor. A composição da dieta utilizada no presente trabalho pode estar induzindo um processo de termogênese adaptativa, aumentando a perda energética na forma de calor durante essa fase inicial da vida. Nesse sentido, estudos têm evidenciado que ocorre um aumento na capacidade de termogênese, especialmente em fases precoces do desenvolvimento, como o período pré-púbere, diminuindo gradativamente ao longo do tempo (Iossa et al., 2003).

Contudo, contrário ao que observamos na semana do isolamento, na idade adulta os animais com acesso a DRG apresentaram maior eficiência calórica e os machos tiveram maior eficiência calórica, quando comparadas às fêmeas. Além disso, machos que receberam a DRG cronicamente apresentaram maior deposição de gordura abdominal, considerando a soma da gordura retroperitoneal e gonadal. Verificamos nesse trabalho que o controle do balanço energético se modificou durante o desenvolvimento, pois na idade adulta os animais apresentaram um perfil metabólico diferente e mais poupador quando comparados aos animais no período pré-púbere. Nesse sentido, na idade adulta esses animais passaram a converter as calorias consumidas de forma mais voltada ao armazenamento, especialmente os machos, demonstraram maior susceptibilidade aos efeitos da dieta. Por outro lado, estudos mostram que ratas recebendo dietas hipercalóricas podem apresentar menor perda energética e maior facilidade de desenvolver obesidade que machos (Roca et al., 1999, Rodriguez et al., 2001). Deve-se considerar, todavia, que a composição da dieta e o período em que é oferecida podem influenciar diferentemente machos e fêmeas. Além disso, nossos achados estão de acordo com evidências que mostram diferenças entre os sexos na regulação da homeostase energética, nas respostas a sinais que regulam o consumo e o ganho de peso, na distribuição do tecido adiposo, assim como nos hormônios liberados em proporção ao tecido adiposo (Clegg et al., 2003, Clegg et al., 2006, Brown et al., 2010).

No capítulo I dessa tese, observamos que o consumo crônico de DRG levou a maior deposição de gordura abdominal e a maior liberação de adipocinas. Sabe-se que o tecido adiposo controla processos metabólicos por meio da liberação de adipocinas, dentre as quais a leptina e a adiponectina. A adiponectina possui propriedades anti-inflamatórias, antiaterogênicas e anti-diabéticas e geralmente seus níveis estão

reduzidos em indivíduos com acúmulo de gordura visceral, ou seja, seus níveis plasmáticos são negativamente correlacionados com o tecido adiposo visceral (Matsuzawa, 2010). De modo interessante, verificamos que as fêmeas que receberam a DRG cronicamente apresentaram níveis plasmáticos aumentados de adiponectina, sugerindo que essa adipocina pode estar agindo como um fator protetor, tornando as fêmeas menos susceptíveis aos efeitos da DRG e menos propensas a desenvolver a obesidade e suas comorbidades. De acordo, trabalho anterior do nosso grupo apontou que os níveis de adiponectina podem aumentar em fêmeas expostas a intervenções como a exposição ao isolamento social durante o desenvolvimento (Krolow et al., 2013a).

A leptina, por sua vez, teve seus níveis aumentados nos animais que tiveram acesso a DRG e de forma mais proeminente nos machos. Tendo em vista que a concentração de leptina no sangue é proporcional ao volume de tecido adiposo, o fato de que os animais com DRG apresentaram maior gordura abdominal está de acordo com os maiores níveis de leptina plasmáticos observados nesses animais. Entretanto, em ambos, roedores e humanos, a hiperleptinemia também é uma característica da obesidade (Frederich et al., 1995, Maffei et al., 1995). Em obesos, o excesso plasmático de leptina funciona como uma resposta compensatória para manter a homeostase energética em função da reduzida sensibilidade a esse hormônio. É importante salientar que a composição da dieta utilizada pelo nosso trabalho associado a fase do desenvolvimento em que começou a ser oferecida e o período que foi oferecida podem ser fatores preditores de alterações na sinalização da leptina. Adicionalmente, os machos tiveram maiores níveis de leptina plasmáticos quando comparados às fêmeas, fato que pode ser atribuído ao maior acúmulo de gordura abdominal nesses animais. Apesar desse aumento nos níveis plasmáticos de leptina, observamos que os machos continuaram consumindo mais calorias, o que nos fez questionar se estaria ocorrendo

um processo de resistência aos efeitos endógenos dessa adipocina, visto que, como já bem estabelecido, em níveis normais, a leptina regula o balanço energético diminuindo o consumo alimentar e aumentando a perda energética e alterações em sua sinalização ou sensibilidade podem causar alterações na regulação do balanço energético (Sainz et al., 2015).

É interessante ressaltar também que existem diferenças sexo-específicas na sensibilidade à leptina. Experimentos usando modelos animais sugerem que fêmeas são mais sensíveis aos efeitos anorexígenos da leptina quando comparadas aos machos (Clegg et al., 2003). Essa diferença na sensibilidade à leptina pode ser modulada por hormônios sexuais, com destaque para o estrógeno, que pode influenciar na expressão e na sensibilidade da leptina em vários tecidos (Al-Qahtani et al., 2017), incluindo o SNC (Ainslie et al., 2001). Assim como a leptina, o estrógeno também influencia no balanço energético e pode estar agindo como um facilitador da sinalização da leptina no hipotálamo, fazendo com que as fêmeas do nosso estudo não sofram os reflexos da resistência à leptina de forma tão intensa quanto os machos. Além disso, considerando que evidências mostram que existe uma co-localização de receptores de leptina e de estrógeno ($RE\alpha$) em algumas regiões do hipotálamo (Springer et al., 2014), possivelmente a interação entre as vias de sinalização desses dois hormônios pode resultar em uma distinta regulação do balanço energético.

Ao verificarmos que o consumo alimentar continuou aumentado mesmo com níveis plasmáticos de leptina elevados, nos propusemos a investigar no capítulo I a sinalização da leptina no hipotálamo para verificar se estaria ocorrendo algum processo de resistência a esse hormônio. Embora nossos achados referentes ao metabolismo periférico tenham nos direcionado a investigar as falhas na sinalização da leptina

causadas pela influência da DRG nos machos, as fêmeas também tiveram alterações nesta comunicação, porém foram mais influenciadas pelo estresse. A DRG, *per se*, causou um maior recrutamento do STAT3 nos machos e, quando associada ao fator estresse, estimulou sua maior fosforilação/ ativação, repercutindo em mais pSTAT3 e, portanto, maior relação pSTAT3/STAT3. No entanto, o aumento no pSTAT3 não foi convertido na maior transcrição do SOCS3, mostrando que, nos machos, o SOCS3 continuou fazendo a retroalimentação negativa da rota de sinalização da leptina como em uma situação basal, sem influência de nenhum fator. Nesse sentido, quando observada em conjunto, a rota de sinalização da leptina parece ativada no hipotálamo total dos machos. A ativação dessa rota, entretanto, pode ter acontecido apenas em algumas regiões específicas no hipotálamo, enquanto que em outras regiões pode ter ocorrido o processo de resistência. Os receptores de leptina são amplamente expressos em núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle da homeostase energética dentre eles o núcleo arqueado (ARC), núcleo ventromedial, o hipotálamo dorsomedial e a área hipotalâmica lateral (Elmqvist et al., 1998). O núcleo ARC é considerado o de mais fácil acesso à leptina circulante, esse núcleo regula o balanço energético, a homeostase da glicose e os níveis de insulina. O hipotálamo dorsomedial regula o comportamento alimentar, o ganho de peso corporal e a termogênese e o ventromedial também regula a homeostase energética e o ganho de peso. Especialmente os núcleos do PVN são altamente relacionados com a homeostase energética. Adicionalmente, o hipotálamo lateral regula o músculo esquelético e cardíaco e o tecido adiposo marrom (van Swieten et al., 2014). Um estudo mostrou que a diminuição nos receptores de leptina no hipotálamo lateral resultou em aumento no consumo alimentar e no ganho de peso de ratos com acesso a DRG (Davis et al., 2011). Semelhante ao que observamos, em consequência da resistência à leptina, os machos apresentaram maior consumo

alimentar e o maior ganho de peso corporal. Estudos com humanos e roedores têm evidenciado que o consumo crônico de DRG atenua a sinalização da leptina de forma região específica no encéfalo, enquanto algumas regiões permanecem sensíveis à leptina apesar dos efeitos da DRG (Morabito et al., 2017). Assim como no encéfalo, no hipotálamo o consumo crônico de uma DRG pode modular diferentemente a sinalização da leptina em diferentes regiões. Em animais, o consumo de uma DRG por 16 semanas demonstrou menor ativação da sinalização da leptina no núcleo arqueado enquanto que outros núcleos hipotalâmicos e extra hipotalâmicos permaneceram sensíveis à leptina (Munzberg et al., 2004).

A exposição ao estresse no período pré-púbere teve efeitos em todas etapas da sinalização da leptina no hipotálamo das fêmeas. O fator estresse aumentou o recrutamento do STAT3. Entretanto, esse aumento não foi acompanhado pela ativação/fosforilação do STAT3, que repercutiu em uma menor relação pSTAT3/STAT3. Embora não tenhamos observado uma elevação no imunocontéudo de pSTAT3 pelo estresse, verificamos um aumento na transcrição do SOCS3, o qual, através de retroalimentação negativa, pode ter causado uma atenuação na sinalização da leptina no hipotálamo das fêmeas. Adicionalmente, a ingestão alimentar e o ganho de peso não refletiram esse perfil de resistência à leptina desencadeado pela exposição ao estresse no período pré-púbere nas fêmeas que, assim como os machos, podem apresentar respostas diferentes dependendo da região do SN avaliada. É importante enfatizar que os fatores dieta e estresse tiveram efeitos distintos sobre a sinalização da leptina: nos machos a interação dos dois fatores ativou a via; por outro lado, nas fêmeas o estresse induziu uma resistência à leptina. No entanto, esses achados foram diferentes do que esperávamos, pois, associando os elevados níveis plasmáticos de leptina com o maior consumo e ganho de peso corporal esperávamos um aumento no SOCS3 e uma

atenuação na sinalização da leptina nos machos. Por outro lado, nos surpreendemos com os efeitos do estresse nas fêmeas, pois, embora o isolamento social tenha acontecido em uma fase precoce do desenvolvimento, seus efeitos perduraram até a idade adulta com grande influência na sinalização da leptina. Reforçando os dados da literatura, nossos achados mostraram que as fêmeas apresentaram maior volume das adrenais e maiores níveis de corticosterona mesmo em níveis basais e, portanto, podem ser mais susceptíveis ao estresse quando comparadas aos machos.

A divergência entre o balanço energético e a sinalização da leptina via JAK-STAT3 nos instigou a investigar uma rota alternativa de regulação endócrina do metabolismo, através da modulação do eixo HHT pela leptina. Como mencionamos na introdução, essa sinalização acontece de duas maneiras: uma direta por neurônios TRH no núcleo paraventricular e outra indireta, por neurônios POMC, no núcleo arqueado (Ghamari-Langroudi et al., 2010). Enquanto a via indireta pode ser afetada por uma possível resistência à leptina, a via direta pode permanecer ativada, reforçando a ideia de que a sinalização da leptina pode sofrer alterações causadas por diferentes fatores dependendo da região do sistema nervoso analisada. Diferente de animais magros, em animais obesos, a via direta permanece ativada e a indireta inativa devido a resistência à leptina (Perello et al., 2010). Baseados nessas informações, esperávamos encontrar um aumento na atividade do eixo HHT nos animais hiperleptinêmicos. Nesse sentido, o aumento nos níveis de T4 nos machos com acesso à DRG nos direcionou a formular a hipótese de que a via direta de sinalização da leptina no PVN estava ativada, enquanto que a via indireta, no ARC, estava pouco ativa ou inativa devido à resistência à leptina nesses animais. Essa resistência está associada ao maior consumo calórico, ganho de peso e ao maior nível de leptina observado nos machos. Além disso, a ativação do eixo HHT pela leptina, que resultou em um aumento do T4, pode ter sido um mecanismo

compensatório ao excesso de calorias consumidas através da DRG pelos machos. Concordando com nossos achados, evidências mostram aumentos nos níveis de hormônios da tireoide em animais com acesso a DRG (Almeida et al., 1996, Iossa et al., 2003). Embora em níveis aumentados, o T4 não foi convertido em T3 nos machos com acesso a DRG causando prejuízos metabólicos que estão de acordo com as características murinométricas encontradas nesses animais. O T4 é convertido em T3 pela ação de enzimas iodotironinas desiodases encontradas em diferentes estruturas, sendo que sua deficiência pode causar uma diminuição na disponibilidade local do T3, que é a forma biologicamente ativa desse hormônio. A deficiência no T3 pode levar a um declínio na taxa de metabolismo basal, assim como pode reduzir o catabolismo de proteínas e lipídeos. Os menores níveis de T3 plasmáticos, em conjunto com os níveis aumentados de T4 nos machos com DRG, sugerem uma falha na atividade das enzimas desiodases, o que repercutiu em um prejuízo metabólico que os tornou mais propensos à obesidade e à síndrome metabólica. Por outro lado, os maiores níveis de T3 encontrado nas fêmeas podem torná-las metabolicamente mais ativas e protegidas do acúmulo energético na forma de ganho de peso corporal e, conseqüentemente, de gordura corporal. De fato, a sinalização da leptina através do eixo HHT se mostrou mais efetiva em explicar nossos achados do metabolismo periférico do que a via JAK-STAT3.

A exposição ao isolamento no período pré-púbere teve efeitos marcantes sobre o eixo HHT, resultando em aumento no T4 em todos animais. Estudos prévios têm mostrado que distintos estressores agudos ou repetidos podem alterar a secreção de hormônios da tireoide (Cizza et al., 1996, Servatius et al., 2000). Nesse contexto, os GCs liberados pelo eixo HHA em resposta a um estressor podem afetar os níveis circulantes dos hormônios da tireoide, assim como a desiodação periférica desses hormônios, entretanto essa modulação depende do período da exposição ao estressor

(Helmreich et al., 2005, Van der Geyten and Darras, 2005). É importante destacar que, no nosso estudo, utilizamos um estressor social em um período sensível do desenvolvimento e que analisamos as consequências na idade adulta o que pode ter influenciado de forma distinta a modulação do eixo HHT nesses animais.

Os hormônios da tireoide participam da sinalização de fatores que influenciam no crescimento, desenvolvimento e na termogênese em mamíferos. Esses hormônios controlam a taxa metabólica basal ao aumentar a produção de ATP por meio de processos metabólicos e por manter o gradiente de íons na mitocôndria. Adicionalmente, os hormônios da tireoide mantêm a taxa metabólica basal via desacoplamento da fosforilação oxidativa na mitocôndria ou por reduzir a atividade de moléculas transportadoras de equivalentes redutores para as mitocôndrias (Harper and Seifert, 2008). Estudos com humanos (Clement et al., 2002) e ratos (Wiesner et al., 1992, Short et al., 2001) tratados com T3 têm demonstrado que os hormônios da tireoide estimulam a transcrição de genes relacionados a bioenergética mitocondrial, incluindo genes da cadeia transportadora de elétrons no músculo esquelético. Os efeitos dos hormônios da tireoide sobre a mitocôndria podem acontecer de forma direta através de seus receptores localizados na própria mitocôndria assim como de forma indireta através de receptores localizados no núcleo (Psarra and Sekeris, 2008). Em ratos, o tratamento com T3 por 4 semanas resultou em maior quantidade de mitocôndrias além de maior quantidade e atividade das enzimas mitocondriais (Bahi et al., 2005). As adipocinas leptina e adiponectina também têm sido relacionadas com a regulação energética mitocondrial. A adiponectina estimula a expressão de genes mitocondriais assim como aumenta a atividade mitocondrial e, em humanos e ratos, essa adipocina tem sido associada com aumentos na β -oxidação (Fruebis et al., 2001, Yamauchi et al., 2001). A leptina tem efeitos semelhantes aos da adiponectina sobre a mitocôndria e, em

animais, o tratamento agudo com leptina ativou a oxidação de ácidos graxos (Muioio et al., 1997).

A demanda energética celular envolve vários fatores e exige uma coordenação entre a função mitocondrial e os outros compartimentos celulares. A mitocôndria participa da manutenção da homeostase energética celular executando a fosforilação oxidativa e participando de múltiplas vias de sinalização metabólicas. Além de ter um papel fundamental no metabolismo celular, essa organela é uma das principais produtoras de EROs. Devido a sua importância fisiológica, a mitocôndria é uma das primeiras organelas a responder a fatores ambientais. Nesse sentido, nossos achados mostraram que tanto a dieta quanto o estresse tiveram efeitos sobre a função mitocondrial, sobre as defesas antioxidantes e sobre o funcionamento mitocondrial. Além disso, observamos que machos e fêmeas responderam de modo diferente a esses fatores. Como já bem estabelecido, a exposição ao estresse demanda uma mobilização energética para o processo de “luta ou fuga”, do qual a mitocôndria é a principal responsável. Adicionalmente, a utilização dos lipídeos provindos da DRG como fonte energética pode causar um aumento no vazamento de elétrons na cadeia transportadora de elétrons aumentando a produção de EROs, mostrando que ambos fatores, estresse e dieta, podem levar a alterações na função mitocondrial que podem repercutir em danos à célula e podem levar à obesidade.

Tais conhecimentos nos levaram a questionar se o isolamento social no período pré-púbere e o consumo de uma DRG poderiam influenciar o metabolismo energético da célula, visto que ambos fatores apresentaram efeitos na regulação do balanço energético central e periférico. No capítulo II, inicialmente investigamos se esses fatores estariam influenciando a atividade de enzimas antioxidantes, pois a mitocôndria é a principal

produtora de EROs e um desequilíbrio na atividade dessas enzimas pode ter consequências metabólicas importantes, relacionadas com o desenvolvimento da obesidade. Em ambos, nos capítulos I e II dessa tese, avaliamos o hipotálamo total por se tratar de uma estrutura envolvida no controle metabólico e na regulação do consumo alimentar e por serem raros os estudos que investigaram os efeitos sexo-específicos de fatores ambientais sobre o status oxidativo nessa estrutura. Além disso, o tecido nervoso é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo devido a sua alta taxa de consumo de oxigênio, ao grande conteúdo de lipídeos e sua baixa atividade antioxidante (Halliwell, 2006). A partir dessas medidas, observamos que predominaram diferenças sexo-específicas, sendo que a atividade da SOD, assim como a relação SOD/CAT e SOD/GPx, foram maiores no hipotálamo das fêmeas. A SOD é uma enzima responsável por dismutar o ânion superóxido, produzido pelo escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, em H_2O_2 , que posteriormente é degradado em H_2O através da CAT e da GPx (Halliwell, 2006). Esse aumento na atividade da SOD, sem o aumento proporcional da atividade da GPx e da CAT, pode ter levado a um acúmulo de H_2O_2 nas fêmeas. Apesar desse possível acúmulo de H_2O_2 , não observamos um aumento no DCF. De fato, a medida da (2', 7'- diclorofluoresceína) DCF é mais indicada para avaliar radicais livres não-específicos, sendo que a oxidação da H_2DCF (di-hidroclorofluoresceína) em DCF é resultado da exposição a espécies reativas. Nesse sentido, a medida do DCF depende das reações de Fenton ou da oxidação não enzimática pelo citocromo c para oxidar o H_2DCF em DCF. Assim sendo, o H_2O_2 é incapaz de oxidar diretamente o H_2DCF (Karlsson et al., 2010). Essas considerações poderiam explicar como, apesar de as fêmeas serem mais propensas a acumular H_2O_2 , não mostraram alterações no DCF. O fato de as fêmeas não apresentarem alterações na produção de EROs também pode ser devido à menor atividade do complexo I-III

observada, quando comparadas aos machos. Evidências mostram que o complexo I-III possui grande capacidade de produzir EROs (Leloup et al., 2011). Portanto, sua menor atividade pode estar relacionada ao menor fluxo de elétrons através da cadeia respiratória e à menor produção de superóxido, explicando assim a ausência de alterações na produção de radicais livres nas fêmeas.

É interessante observar que as fêmeas com acesso à DRG apresentaram aumento na atividade do complexo IV, que também pode ser uma resposta ao excesso de energia suprido pela DRG nas fêmeas. Nesse contexto, estudos mostram que, no músculo esquelético, o consumo prolongado de dietas hiperlipídicas aumenta o conteúdo das proteínas que compõem os complexos da cadeia respiratória, assim como aumenta a atividade de enzimas que participam da β -oxidação (Turner et al., 2007). Essas diferenças sexo-específicas observadas na atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons podem ter acontecido pela modulação mitocondrial mediada por hormônios sexuais. De acordo com a literatura, assim como hormônios da tireoide, hormônios sexuais incluindo o estrógeno são importantes reguladores do metabolismo energético, atuando no núcleo e na mitocôndria ao induzir a transcrição de genes da cadeia transportadora de elétrons. O estrógeno (E2) possui efeitos em diversos tecidos, agindo diretamente através de seus receptores na própria mitocôndria e, indiretamente, através de seus receptores no núcleo. Evidências mostram que esse hormônio sexual induz a transcrição de genes dos complexos da cadeia transportadora de elétrons incluindo subunidades da ATP sintase (Klinge, 2008), o citocromo c e subunidades do complexo IV, além de aumentar a atividade enzimática do complexo IV (Duckles et al., 2006).

Observamos também que o consumo da DRG diminuiu a atividade da GPx nos machos e nas fêmeas. Em neurônios, essa enzima é a principal responsável pela

detoxificação do H_2O_2 (Dringen et al., 1999) e sua deficiência representa uma grande ameaça à homeostase neuronal. Especialmente nas fêmeas recebendo DRG, a associação entre o aumento da atividade da SOD sem alterações na atividade da CAT e diminuição na atividade da GPx pode levar a um acúmulo de H_2O_2 . A GPx detoxifica o H_2O_2 através de uma reação de óxido-redução em que a GSH doa elétrons produzindo GSSG, que posteriormente é reduzida pela atividade da glutathione redutase (GR) na presença de NADPH (Townsend et al., 2003). Portanto, essa diminuição da atividade da GPx ou a menor concentração de GSH podem contribuir para o acúmulo de H_2O_2 , aumentando o dano oxidativo celular (Walczewska et al., 2010). Embora os radicais livres sejam considerados tóxicos para a célula, evidências têm indicado que em concentrações normais eles participam de diversas vias de sinalização celular. Em células do SNC, o H_2O_2 é um regulador da atividade e do crescimento neuronal (Gerich et al., 2009), entretanto em concentrações elevadas pode induzir a um estresse oxidativo (Armogida et al., 2012) e conseqüentemente a danos celulares e a morte neuronal (Teepker et al., 2007). Nesse sentido, estudos mostraram que a curta exposição de neurônios a concentrações micromolares de H_2O_2 podem diminuir o conteúdo de GSH e ATP (Hoyt et al., 1997). Adicionalmente, evidências têm mostrado que a emissão de H_2O_2 mitocondrial é significativamente maior quando a respiração basal é mantida pela oxidação de ácidos graxos, em comparação a carboidratos (St-Pierre et al., 2002). Além disso, estudos têm mostrado que o consumo crônico de DRG aumenta o estresse oxidativo celular e causa disfunções mitocondriais em diversos tecidos, incluindo o tecido muscular e o SN (Yokota et al., 2009, Ballal et al., 2010). É interessante observar que outro estudo relatou que o consumo de DRG aumenta a produção mitocondrial de H_2O_2 (Anderson et al., 2009). O H_2O_2 tem a capacidade de se difundir e atuar em diferentes compartimentos (Miller et al., 2010, Leloup et al., 2011): no citosol, o H_2O_2

pode reagir com resíduos de tiol em proteínas ou na glutathiona e alterar a relação da glutathiona reduzida para glutathiona oxidada (GSH/GSSG) (Schafer and Buettner, 2001). No entanto, nesse estudo não verificamos reduções nos grupos tiólicos nos animais com acesso à DRG. No conjunto, nossos achados sugerem que o hipotálamo das fêmeas é mais susceptível ao desequilíbrio oxidativo e conseqüentemente ao dano celular, sendo que o acesso à DRG reforçou esse desequilíbrio, facilitando o estresse oxidativo nesses animais.

O estresse oxidativo pode causar a oxidação de biomoléculas como lipídeos, proteínas e o DNA, o que pode resultar em danos a organelas celulares, tais como a mitocôndria (Miao and St Clair, 2009). A oxidação de resíduos proteicos, especialmente de resíduos sulfidril, causa mudanças conformacionais, desdobramento da estrutura proteica e degradação de proteínas (Lyras et al., 1997). No nosso estudo, as fêmeas apresentaram maior quantidade de tióis totais que os machos, sugerindo que as fêmeas foram, portanto, mais protegidas de danos proteicos que os machos. Por outro lado, como discutido previamente, as fêmeas parecem mais susceptíveis ao desequilíbrio oxidativo, o qual pode estar associado ao fato de as fêmeas apresentarem menor quantidade de tióis não-proteicos que os machos. O tiol não-proteico mais prevalente nas células animais é a GSH, um antioxidante não-enzimático importante para a detoxificação de peróxidos (Anderson, 1998). A baixa concentração da GSH pode estar relacionada com o maior dano oxidativo e com o desenvolvimento de patologias (Lu, 2000, Townsend et al., 2003). Esse achado nos levou a hipotetizar que a redução na GSH nas fêmeas induziu a potenciação no acúmulo do H_2O_2 , causou o desequilíbrio oxidativo e conseqüentemente levou ao dano oxidativo. Contrário ao nosso achado, estudos mostram que o estrógeno tem efeitos protetores reduzindo o estresse oxidativo e a produção de radicais livres no

tecido nervoso, de modo que as fêmeas estariam mais protegidas do desequilíbrio oxidativo que os machos (Razmara et al., 2007, Irwin et al., 2008, Vina et al., 2011).

No capítulo II dessa tese ainda observamos que o isolamento social no período pré-púbere diminuiu a peroxidação lipídica no hipotálamo dos machos. Contrário a esse resultado, ratos expostos ao estresse crônico variado apresentaram aumento na peroxidação lipídica no córtex pre-frontal (Herbet et al., 2017). Nesse sentido, outros estudos prévios mostraram que o estresse por imobilização aguda aumentou a peroxidação lipídica no córtex, cerebelo, hipocampo (Liu et al., 1996) e hipotálamo (Sosnovskii and Kozlov, 1992), assim como a imobilização mais prolongada também causou aumento na peroxidação lipídica (Solín and Liashev Iu, 2013). Embora nossos achados sejam contrários aos da literatura, é importante enfatizar que, como exposto anteriormente, o tipo, a gravidade e a duração do estressor podem ter diferentes consequências, e em nosso estudo investigamos os efeitos em longo-prazo da exposição ao estresse por isolamento social durante o período pré-púbere. É importante ainda considerar que o SN exibe uma vulnerabilidade região-específica a insultos causados pelo estresse oxidativo (Baek et al., 1999). Embora não tenhamos encontrado alterações na produção de espécies reativas, evidências têm mostrado que estressores ambientais podem induzir um desequilíbrio na atividade de enzimas antioxidantes e, por consequência, levar ao estresse oxidativo (Madrigal et al., 2001) devido ao aumento na liberação de GCs pelas glândulas adrenais (Simsek et al., 2016). Estudos em animais tratados com corticosterona têm relatado que o excesso de GCs pode induzir uma depleção ou inibição na atividade das enzimas antioxidantes e levar ao aumento da peroxidação lipídica no hipocampo (Sato et al., 2010). É interessante salientar que as avaliações foram realizadas na idade adulta, muito tempo após a exposição ao estresse, o que pode ter induzido um processo de adaptação desses animais, que podem ter se

tornado mais resilientes e, por consequência, mais resistentes ao dano oxidativo. Entretanto, verificamos que apenas os machos desenvolveram essa adaptação ao estresse e se tornaram mais protegidos da peroxidação lipídica no hipotálamo. De fato, a exposição ao isolamento social no período pré-púbere diminuiu a peroxidação lipídica nos machos, contudo, por outro lado, a DRG aumentou a peroxidação lipídica nas fêmeas quando comparadas ao controle. Esse aumento as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como consequência do consumo crônico de DRG nas fêmeas pode estar associado à diminuição no conteúdo de GSH (Radi et al., 1991). A GSH doa equivalentes redutores às membranas lipídicas e as protege de oxidantes (Curello et al., 1985), e sua depleção pode induzir a peroxidação lipídica e causar danos estruturais nas membranas, incluindo as membranas mitocondriais, levando consequentemente a disfunções mitocondriais (Madrigal et al., 2001). Além disso, o prejuízo na detoxificação do H_2O_2 pela GPx e pela CAT também podem causar um aumento na peroxidação lipídica e comprometer as membranas celulares e a integridade mitocondrial, potencializando a falha bioenergética (Demarest and McCarthy, 2015). Assim, como avaliamos nesse trabalho, o acesso a uma DRG causou possivelmente um acúmulo de H_2O_2 no hipotálamo das fêmeas. Esse excesso de H_2O_2 pode estar relacionado com a diminuição de resíduos sulfidríla na GSH, resultando em um maior dano lipídico.

Nesse contexto, a DRG pode comprometer as membranas mitocondriais e levar a perturbações na fluidez (Tsalouhidou et al., 2006), em transportadores (Hoch, 1992), na dinâmica do cálcio (Patergnani et al., 2011), na expressão de genes (Flachs et al., 2006) e em modificações pós-traducionais de proteínas (Hasselbaink et al., 2002). Portanto, a DRG pode causar alterações na função mitocondrial e na produção de EROs (Yu et al., 2014). Como descrito detalhadamente na introdução desta tese, a mitocôndria, por meio

da cadeia transportadora de elétrons, é responsável pela produção de ATP, além de nela ocorrerem diversas vias ligadas ao balanço energético (Manoli et al., 2007). A cadeia transportadora de elétrons também é uma importante produtora de EROs incluindo o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o oxigênio singlet (Wallace et al., 1995). Estudos prévios com camundongos têm mostrado que a DRG pode diminuir a expressão de genes envolvidos na fosforilação oxidativa, genes que codificam as proteínas que compõem os supercomplexos I, II, III e IV da cadeia transportadora de elétrons, assim como a transcrição de fatores e cofatores no músculo esquelético (Sparks et al., 2005). Sabe-se que a estrutura e a função dos componentes mitocondriais dependem da expressão de genes nucleares e mitocondriais e a cooperação entre esses genes é indispensável para regular a cadeia respiratória (Kelly and Scarpulla, 2004). O DNA mitocondrial codifica proteínas dos complexos I, III e IV da cadeia transportadora de elétrons e o complexo II é totalmente codificado pelo genoma nuclear (Kelly and Scarpulla, 2004), sendo que o DNA mitocondrial é mais susceptível a alterações oxidativas (Wallace, 2005). De fato, o desequilíbrio oxidativo observado nas fêmeas pode ter danificado o DNA mitocondrial, prejudicando a síntese de importantes proteínas, o que pode ter resultado na atividade alterada do complexo I-III.

Outro importante modulador da função mitocondrial é o coativador transcricional 1α do receptor nuclear gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- γ), ou pelo cofator de transcrição 1α (PGC- 1α) (Manoli et al., 2007). O PGC- 1α é altamente expresso em neurônios (Andersson and Scarpulla, 2001) e esse cofator ativa a biogênese mitocondrial, aumenta a expressão de genes da fosforilação oxidativa e a transcrição de enzimas da cadeia transportadora de elétrons (Sparks et al., 2005). Entretanto, estudos mostram que a expressão do PGC- 1α é inversamente correlacionada com as

concentrações de lipídeos. Em humanos, a infusão de lipídeos diminui a expressão de PGC-1 α no músculo esquelético (Richardson et al., 2005), e em camundongos o consumo de DRG reduz o RNAm do PGC-1 α no músculo esquelético (Sparks et al., 2005). De acordo com esses estudos, nós observamos que a DRG diminuiu a massa mitocondrial nas fêmeas, o que pode estar relacionado com uma diminuição na ativação do PGC-1 α e, conseqüentemente, diminuição na biogênese mitocondrial. Além disso, já foi relatado que existem diferenças na biogênese mitocondrial entre machos e fêmeas (Sharma et al., 2014). A biogênese mitocondrial envolve processos de proliferação e diferenciação que resultam no aumento da massa mitocondrial e da capacidade bioenergética mitocondrial (Wenz, 2013). Estudos com tecido muscular mostram que o consumo prolongado de DRG pode interferir na dinâmica mitocondrial e causar disfunções, resultando em prejuízos na oxidação lipídica mitocondrial (Duca and Yue, 2014).

5. CONCLUSÕES

- Nossos achados indicam que machos e fêmeas adotam diferentes estratégias fisiológicas e metabólicas em resposta ao estresse no período pré-púbere e ao consumo crônico de uma DRG.
- Os machos apresentaram um prejuízo da comunicação do metabolismo periférico com o central em resposta a esses fatores. Como observado especialmente nos machos com acesso à DRG, os dados periféricos de consumo, ganho de peso, gordura abdominal e eficiência calórica associados aos maiores níveis de leptina circulante indicaram características de animais obesos com deficiência ou resistência à leptina. Esses dados divergiram dos achados centrais nesses animais, que indicaram uma ativação na sinalização da leptina pela via JAK-STAT no hipotálamo, assim como uma ativação do eixo HHT pela leptina. Entretanto, nosso trabalho destacou que, especialmente nos machos com acesso crônico à DRG, a ativação do eixo HHT pela leptina não foi acompanhada da conversão do T4 em T3, refletido assim o prejuízo metabólico periférico observado nas características murinométricas desses animais.
- Por outro lado, a exposição precoce ao isolamento social teve impactos mais pronunciados nas fêmeas. O estresse no período pré-púbere teve efeitos em longo-prazo nas fêmeas ao causar uma deficiência na sinalização da leptina no hipotálamo através da via JAK-STAT. Apesar desse prejuízo na sinalização da leptina pela via JAK-STAT causado pelo estresse precoce, observamos a ativação do eixo HHT nas fêmeas estressadas que apresentaram maiores níveis de T3 que os machos,

indicando uma atividade metabólica periférica protegida dos efeitos desses fatores ambientais. Embora a modulação da via JAK-STAT3 tenha apresentado prejuízos, a sinalização da leptina pelo eixo HHT apresentou-se ativada, o que repercutiu no eficiente metabolismo periférico das fêmeas.

- Além de repercutir em alterações na sinalização de hormônios relacionados com o controle metabólico, o consumo crônico da DRG e o estresse precoce tiveram efeitos sobre aspectos oxidativos e sobre o funcionamento mitocondrial. Especialmente as fêmeas apresentaram prejuízos nas defesas antioxidantes, com aumento da atividade da SOD sem o proporcional aumento nas atividades da CAT e da GPx. Ainda, o acesso à DRG reforçou o desequilíbrio oxidativo nas fêmeas, possivelmente facilitando o acúmulo de H_2O_2 devido à deficiência no sistema antioxidante. Como consequência desse desequilíbrio, as fêmeas apresentaram danos a biomoléculas celulares, pois o consumo crônico da dieta levou a maior peroxidação lipídica, o que repercutiu em alterações nas funções mitocondriais.
- Além disso, o consumo crônico da DRG levou a alterações no funcionamento mitocondrial como observado pela menor atividade do complexo I-III e pela menor massa mitocondrial.

6. PERSPECTIVAS

- Investigar a influência de uma DRG sobre a permeabilidade da BHE, com foco no transporte da leptina e na influência dos lipídeos no SNC;
- Investigar os efeitos sexo–específicos do estresse e da DRG estudando os efeitos de hormônios gonadais, como o estrógeno, sobre a sinalização da leptina em diferentes núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação metabólica e sobre a função mitocondrial em ratos machos e fêmeas;
- Investigar os efeitos dos fatores ambientais estresse e dieta sobre a dinâmica mitocondrial, incluindo aspectos de fusão e fissão mitocondrial através de microscopia confocal;
- Avaliar a influência dos fatores dieta e estresse sobre diferentes núcleos hipotalâmicos através da técnica de imuno-histoquímica;
- Avaliar a atividade respiratória mitocondrial de ratos machos e fêmeas sob a influência das intervenções ambientais utilizadas nessa tese, usando-se distintos substratos e o aparelho Oroborus.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization (WHO) (2016). Obesity and overweight–Fact sheet. Updated October 2017. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> Accessed 10 Jan 2018
- World Obesity Federation (2015). About obesity. Page Updated: 10th October 2015. <http://www.worldobesity.org/resources/aboutobesity>
- Ainslie DA, Morris MJ, Wittert G, Turnbull H, Proietto J, Thorburn AW (2001) Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1680-1688.
- Al-Qahtani SM, Bryzgalova G, Valladolid-Acebes I, Korach-Andre M, Dahlman-Wright K, Efendic S, Berggren PO, Portwood N (2017) 17beta-Estradiol suppresses visceral adipogenesis and activates brown adipose tissue-specific gene expression. *Horm Mol Biol Clin Investig* 29:13-26.
- Alfadda AA, Sallam RM (2012) Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol* 2012:936486.
- Almeida NG, Levitsky DA, Strupp B (1996) Enhanced thermogenesis during recovery from diet-induced weight gain in the rat. *Am J Physiol* 271:R1380-1387.
- Amat J, Alekseyev RM, Paul E, Watkins LR, Maier SF (2010) Behavioral control over shock blocks behavioral and neurochemical effects of later social defeat. *Neuroscience* 165:1031-1038.
- Andersen SL (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27:3-18.
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW, 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH, Neuffer PD (2009) Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest* 119:573-581.
- Anderson ME (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* 111-112:1-14.
- Andersson U, Scarpulla RC (2001) Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21:3738-3749.
- Aragones G, Ardid-Ruiz A, Ibars M, Suarez M, Blade C (2016) Modulation of leptin resistance by food compounds. *Mol Nutr Food Res* 60:1789-1803.
- Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Ferreira AG, Scherer E, Wyse AT, Dalmaz C (2014) Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiol Behav* 124:23-32.
- Armogida M, Nistico R, Mercuri NB (2012) Therapeutic potential of targeting hydrogen peroxide metabolism in the treatment of brain ischaemia. *Br J Pharmacol* 166:1211-1224.
- Auvinen HE, Romijn JA, Biermasz NR, Havekes LM, Smit JW, Rensen PC, Pereira AM (2011) Effects of high fat diet on the Basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice: a systematic review. *Horm Metab Res* 43:899-906.
- Baek BS, Kwon HJ, Lee KH, Yoo MA, Kim KW, Ikeno Y, Yu BP, Chung HY (1999) Regional difference of ROS generation, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activity in rat brain and their dietary modulation. *Arch Pharm Res* 22:361-366.

- Bahi L, Garnier A, Fortin D, Serrurier B, Veksler V, Bigard AX, Ventura-Clapier R (2005) Differential effects of thyroid hormones on energy metabolism of rat slow- and fast-twitch muscles. *J Cell Physiol* 203:589-598.
- Ballal K, Wilson CR, Harmancey R, Taegtmeier H (2010) Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. *Mol Cell Biochem* 344:221-230.
- Banks WA, DiPalma CR, Farrell CL (1999) Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 20:1341-1345.
- Baram TZ, Davis EP, Obenaus A, Sandman CA, Small SL, Solodkin A, Stern H (2012) Fragmentation and unpredictability of early-life experience in mental disorders. *Am J Psychiatry* 169:907-915.
- Barnes PJ (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 94:557-572.
- Baydoun AR, Markham A, Morgan RM, Sweetman AJ (1990) Bay K 8644, modifier of calcium transport and energy metabolism in rat heart mitochondria: a new intracellular site of action. *Br J Pharmacol* 101:15-20.
- Bhatnagar S, Huber R, Nowak N, Trotter P (2002) Lesions of the posterior paraventricular thalamus block habituation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to repeated restraint. *J Neuroendocrinol* 14:403-410.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 5:9-19.
- Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS (1999) The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274:30059-30065.
- Blundell JE, Goodson S, Halford JC (2001) Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 1:S29-34.
- Boitard C, Cavaroc A, Sauvant J, Aubert A, Castanon N, Laye S, Ferreira G (2014) Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun* 40:9-17.
- Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chansaume E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 118:789-800.
- Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, Hu XX, Aziz S, Johnson JJ, Bugger H, Zaha VG, Abel ED (2007) Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. *Diabetes* 56:2457-2466.
- Boukouvelas G, Gerozissis K, Kitraki E (2010) Fat feeding of rats during pubertal growth leads to neuroendocrine alterations in adulthood. *Cell Mol Neurobiol* 30:91-99.
- Bouret SG (2010) Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behavior and hypothalamic development. *J Nutr* 140:653-657.
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004) Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304:108-110.
- Bournat JC, Brown CW (2010) Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17:446-452.
- Bremner JD, Randall P, Vermetten E, Staib L, Bronen RA, Mazure C, Capelli S, McCarthy G, Innis RB, Charney DS (1997) Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to

- childhood physical and sexual abuse--a preliminary report. *Biol Psychiatry* 41:23-32.
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., Krause KH (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 142:w13659.
- Brown LM, Gent L, Davis K, Clegg DJ (2010) Metabolic impact of sex hormones on obesity. *Brain Res* 1350:77-85.
- Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC (2007) High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15:798-808.
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV (1996) Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348:159-161.
- Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP (2003) Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Horm Res* 59:161-179.
- Cheng Z, Ristow M (2013) Mitochondria and metabolic homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 19:240-242.
- Chrousos GP (1995) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332:1351-1362.
- Chugani HT, Behen ME, Muzik O, Juhasz C, Nagy F, Chugani DC (2001) Local brain functional activity following early deprivation: a study of postinstitutionalized Romanian orphans. *Neuroimage* 14:1290-1301.
- Cirulli F, Francia N, Berry A, Aloe L, Alleva E, Suomi SJ (2009) Early life stress as a risk factor for mental health: role of neurotrophins from rodents to non-human primates. *Neurosci Biobehav Rev* 33:573-585.
- Civitaresse AE, Smith SR, Ravussin E (2007) Diet, energy metabolism and mitochondrial biogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:679-687.
- Cizza G, Brady LS, Esclapes ME, Blackman MR, Gold PW, Chrousos GP (1996) Age and gender influence basal and stress-modulated hypothalamic-pituitary-thyroidal function in Fischer 344/N rats. *Neuroendocrinology* 64:440-448.
- Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, Benoit SC (2006) Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 55:978-987.
- Clegg DJ, Riedy CA, Smith KA, Benoit SC, Woods SC (2003) Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* 52:682-687.
- Clement K, Viguerie N, Diehn M, Alizadeh A, Barbe P, Thalamas C, Storey JD, Brown PO, Barsh GS, Langin D (2002) In vivo regulation of human skeletal muscle gene expression by thyroid hormone. *Genome Res* 12:281-291.
- Convit A (2012) Obesity is associated with structural and functional brain abnormalities: where do we go from here? *Psychosom Med* 74:673-674.
- Couto-Pereira NS, Ferreira CF, Lampert C, Arcego DM, Toniazzo AP, Bernardi JR, da Silva DC, Von Poser Toigo E, Diehl LA, Krolow R, Silveira PP, Dalmaz C (2016) Neonatal interventions differently affect maternal care quality and have sexually dimorphic developmental effects on corticosterone secretion. *Int J Dev Neurosci* 55:72-81.
- Crews F, He J, Hodge C (2007) Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86:189-199.
- Curello S, Ceconi C, Bigoli C, Ferrari R, Albertini A, Guarnieri C (1985) Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. *Experientia* 41:42-43.

- Dahl RE (2004) Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci* 1021:1-22.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S (2003) Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11696-11701.
- Danese A, Tan M (2014) Childhood maltreatment and obesity: systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry* 19:544-554.
- Davidson TL, Monnot A, Neal AU, Martin AA, Horton JJ, Zheng W (2012) The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. *Physiol Behav* 107:26-33.
- Davis JF, Choi DL, Schurdak JD, Fitzgerald MF, Clegg DJ, Lipton JW, Figlewicz DP, Benoit SC (2011) Leptin regulates energy balance and motivation through action at distinct neural circuits. *Biol Psychiatry* 69:668-674.
- De Bellis MD, Keshavan MS (2003) Sex differences in brain maturation in maltreatment-related pediatric posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 27:103-117.
- De Bellis MD, Keshavan MS, Shifflett H, Iyengar S, Beers SR, Hall J, Moritz G (2002) Brain structures in pediatric maltreatment-related posttraumatic stress disorder: a sociodemographically matched study. *Biol Psychiatry* 52:1066-1078.
- de Ferranti S, Mozaffarian D (2008) The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 54:945-955.
- Demarest TG, McCarthy MM (2015) Sex differences in mitochondrial (dys)function: Implications for neuroprotection. *J Bioenerg Biomembr* 47:173-188.
- Demonacos C, Tsawdaroglou NC, Djordjevic-Markovic R, Papalopoulou M, Galanopoulos V, Papadogeorgaki S, Sekeris CE (1993) Import of the glucocorticoid receptor into rat liver mitochondria in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46:401-413.
- Dietz WH (1994) Critical periods in childhood for the development of obesity. *Am J Clin Nutr* 59:955-959.
- Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP (2004) Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: impact of social versus isolate housing of subjects and partners. *Dev Psychobiol* 45:153-162.
- Dringen R, Kussmaul L, Gutterer JM, Hirrlinger J, Hamprecht B (1999) The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem* 72:2523-2530.
- Drougard A, Fournel A, Valet P, Knauf C (2015) Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. *Front Neurosci* 9:56.
- Duca FA, Yue JT (2014) Fatty acid sensing in the gut and the hypothalamus: in vivo and in vitro perspectives. *Mol Cell Endocrinol* 397:23-33.
- Duckles SP, Krause DN, Stirone C, Procaccio V (2006) Estrogen and mitochondria: a new paradigm for vascular protection? *Mol Interv* 6:26-35.
- Duclos M, Gouarne C, Martin C, Rocher C, Mormede P, Letellier T (2004) Effects of corticosterone on muscle mitochondria identifying different sensitivity to glucocorticoids in Lewis and Fischer rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E159-167.
- Eiland L, Romeo RD (2013) Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience* 249:162-171.

- Elmqvist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB (1998) Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395:535-547.
- Ely DR, Dapper V, Marasca J, Correa JB, Gamaro GD, Xavier MH, Michalowski MB, Catelli D, Rosat R, Ferreira MB, Dalmaz C (1997) Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiol Behav* 61:395-398.
- Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nilni EA, Grove KL, Cowley MA (2007) Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 5:181-194.
- Epel E, Jimenez S, Brownell K, Stroud L, Stoney C, Niaura R (2004) Are stress eaters at risk for the metabolic syndrome? *Ann N Y Acad Sci* 1032:208-210.
- Felitti VJ, Anda RF, Nordenberg D, Williamson DF, Spitz AM, Edwards V, Koss MP, Marks JS (1998) Relationship of childhood abuse and household dysfunction to many of the leading causes of death in adults. The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study. *Am J Prev Med* 14:245-258.
- Ferdman N, Murmu RP, Bock J, Braun K, Leshem M (2007) Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behav Brain Res* 180:174-182.
- Fink BD, Herlein JA, Almind K, Cinti S, Kahn CR, Sivitz WI (2007) Mitochondrial proton leak in obesity-resistant and obesity-prone mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1773-1780.
- Flachs P, Mohamed-Ali V, Horakova O, Rossmeisl M, Hosseinzadeh-Attar MJ, Hensler M, Ruzickova J, Kopecky J (2006) Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 49:394-397.
- Fone KC, Porkess MV (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1087-1102.
- Fox RM, Morgan RM, Markham A (1993) Calcium antagonists and Bay K8644 promote depolarization of the rat heart mitochondrial membrane potential. Further evidence for a role in alteration of oxidative metabolism. *Biochem Pharmacol* 45:1995-2001.
- Frazier CR, Mason P, Zhuang X, Beeler JA (2008) Sucrose exposure in early life alters adult motivation and weight gain. *PLoS One* 3:e3221.
- Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS (1995) Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1:1311-1314.
- Frohnert BI, Bernlohr DA (2013) Protein carbonylation, mitochondrial dysfunction, and insulin resistance. *Adv Nutr* 4:157-163.
- Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF (2001) Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2005-2010.
- Fuemmeler BF, Dedert E, McClernon FJ, Beckham JC (2009) Adverse childhood events are associated with obesity and disordered eating: results from a U.S. population-based survey of young adults. *J Trauma Stress* 22:329-333.
- Funato H, Oda S, Yokofujita J, Igarashi H, Kuroda M (2011) Fasting and high-fat diet alter histone deacetylase expression in the medial hypothalamus. *PLoS One* 6:e18950.

- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR (2010) Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316:129-139.
- Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Fasshauer M, Muller M (2009) H₂O₂-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Pflugers Arch* 458:937-952.
- Ghamari-Langroudi M, Vella KR, Srisai D, Sugrue ML, Hollenberg AN, Cone RD (2010) Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol Endocrinol* 24:2366-2381.
- Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ (2002) Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obes Res* 10:956-963.
- Giedd JN, Lalonde FM, Celano MJ, White SL, Wallace GL, Lee NR, Lenroot RK (2009) Anatomical brain magnetic resonance imaging of typically developing children and adolescents. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48:465-470.
- Gladstone GL, Parker GB, Malhi GS (2006) Do bullied children become anxious and depressed adults?: A cross-sectional investigation of the correlates of bullying and anxious depression. *J Nerv Ment Dis* 194:201-208.
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, 3rd, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8174-8179.
- Goldman L, Winget C, Hollingshead GW, Levine S (1973) Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology* 12:199-211.
- Guo F, Bakal K, Minokoshi Y, Hollenberg AN (2004) Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology* 145:2221-2227.
- Gustafson TB, Sarwer DB (2004) Childhood sexual abuse and obesity. *Obes Rev* 5:129-135.
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623.
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634-1658.
- Hamann A, Matthaei S (1996) Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104:293-300.
- Haring SJ, Harris RB (2011) The relation between dietary fructose, dietary fat and leptin responsiveness in rats. *Physiol Behav* 104:914-922.
- Hariri N, Thibault L (2010) High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23:270-299.
- Harper ME, Seifert EL (2008) Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. *Thyroid* 18:145-156.
- Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjoorbaek C, Elmquist JK, Flier JS, Hollenberg AN (2001) Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 107:111-120.
- Hasselbaink DM, Roemen TH, van der Vusse GJ (2002) Protein acylation in the cardiac muscle like cell line, H9c2. *Mol Cell Biochem* 239:101-112.
- Heim C, Nemeroff CB (2002) Neurobiology of early life stress: clinical studies. *Semin Clin Neuropsychiatry* 7:147-159.

- Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Nemeroff CB (2008) The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 33:693-710.
- Heinonen S, Buzkova J, Muniandy M, Kaksonen R, Ollikainen M, Ismail K, Hakkarainen A, Lundbom J, Lundbom N, Vuolteenaho K, Moilanen E, Kaprio J, Rissanen A, Suomalainen A, Pietilainen KH (2015) Impaired Mitochondrial Biogenesis in Adipose Tissue in Acquired Obesity. *Diabetes* 64:3135-3145.
- Helmreich DL, Parfitt DB, Lu XY, Akil H, Watson SJ (2005) Relation between the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology* 81:183-192.
- Henry BA, Clarke IJ (2008) Adipose tissue hormones and the regulation of food intake. *J Neuroendocrinol* 20:842-849.
- Herbet M, Korga A, Gawronska-Grzywacz M, Izdebska M, Piatkowska-Chmiel I, Poleszak E, Wrobel A, Matysiak W, Jodlowska-Jedrych B, Dudka J (2017) Chronic Variable Stress Is Responsible for Lipid and DNA Oxidative Disorders and Activation of Oxidative Stress Response Genes in the Brain of Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2017:7313090.
- Hernandez-Aguilera A, Rull A, Rodriguez-Gallego E, Riera-Borrull M, Luciano-Mateo F, Camps J, Menendez JA, Joven J (2013) Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm* 2013:135698.
- Hoch FL (1992) Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta* 1113:71-133.
- Hoyt KR, Gallagher AJ, Hastings TG, Reynolds IJ (1997) Characterization of hydrogen peroxide toxicity in cultured rat forebrain neurons. *Neurochem Res* 22:333-340.
- Hryhorczuk C, Decarie-Spain L, Sharma S, Daneault C, Rosiers CD, Alquier T, Fulton S (2017) Saturated high-fat feeding independent of obesity alters hypothalamus-pituitary-adrenal axis function but not anxiety-like behaviour. *Psychoneuroendocrinology* 83:142-149.
- Huneault L, Mathieu ME, Tremblay A (2011) Globalization and modernization: an obesogenic combination. *Obes Rev* 12:e64-72.
- Iossa S, Lionetti L, Mollica MP, Crescenzo R, Botta M, Barletta A, Liverini G (2003) Effect of high-fat feeding on metabolic efficiency and mitochondrial oxidative capacity in adult rats. *Br J Nutr* 90:953-960.
- Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J (2008) Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology* 149:3167-3175.
- Ismail FY, Fatemi A, Johnston MV (2017) Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. *Eur J Paediatr Neurol* 21:23-48.
- Jahng JW, Yoo SB, Ryu V, Lee JH (2012) Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. *Int J Dev Neurosci* 30:47-53.
- Jequier E (2002) Pathways to obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 2:S12-17.
- Jheng HF, Huang SH, Kuo HM, Hughes MW, Tsai YS (2015) Molecular insight and pharmacological approaches targeting mitochondrial dynamics in skeletal muscle during obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1350:82-94.
- Joels M (2008) Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 583:312-321.
- Joels M, Baram TZ (2009) The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10:459-466.

- Johnson AR, Milner JJ, Makowski L (2012) The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev* 249:218-238.
- Jones AC, Schinka KC, van Dulmen MH, Bossarte RM, Swahn MH (2011) Changes in loneliness during middle childhood predict risk for adolescent suicidality indirectly through mental health problems. *J Clin Child Adolesc Psychol* 40:818-824.
- Kabra DG, Pfuhlmann K, Garcia-Caceres C, Schriever SC, Casquero Garcia V, Kebede AF, Fuente-Martin E, Trivedi C, Heppner K, Uhlenhaut NH, Legutko B, Kabra UD, Gao Y, Yi CX, Quarta C, Clemmensen C, Finan B, Muller TD, Meyer CW, Paez-Pereda M, Stemmer K, Woods SC, Perez-Tilve D, Schneider R, Olson EN, Tschop MH, Pfluger PT (2016) Hypothalamic leptin action is mediated by histone deacetylase 5. *Nat Commun* 7:10782.
- Karlsson M, Kurz T, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson CI (2010) What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show? *Biochem J* 428:183-190.
- Kaur H, Hyder ML, Poston WS (2003) Childhood overweight: an expanding problem. *Treat Endocrinol* 2:375-388.
- Kelly DP, Scarpulla RC (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 18:357-368.
- Kent A, Waller G, Dagnan D (1999) A greater role of emotional than physical or sexual abuse in predicting disordered eating attitudes: the role of mediating variables. *Int J Eat Disord* 25:159-167.
- Klinge CM (2008) Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. *J Cell Biochem* 105:1342-1351.
- Knight JA (2011) Diseases and disorders associated with excess body weight. *Ann Clin Lab Sci* 41:107-121.
- Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM (2010) Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS One* 5:e11376.
- Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS (2005) The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev* 29:3-38.
- Kos K, Harte AL, da Silva NF, Tonchev A, Chaldakov G, James S, Snead DR, Hoggart B, O'Hare JP, McTernan PG, Kumar S (2007) Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1129-1136.
- Krolow R, Noschang C, Arcego DM, Huffell AP, Marcolin ML, Benitz AN, Lampert C, Fitarelli RD, Dalmaz C (2013a) Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism* 62:1268-1278.
- Krolow R, Noschang C, Arcego DM, Pettenuzzo LF, Weis SN, Marcolin ML, Huffell AP, Mota CS, Dalmaz C (2013b) Isolation stress exposure and consumption of palatable diet during the prepubertal period leads to cellular changes in the hippocampus. *Neurochem Res* 38:262-272.
- Krolow R, Noschang C, Weis SN, Pettenuzzo LF, Huffell AP, Arcego DM, Marcolin M, Mota CS, Kolling J, Scherer EB, Wyse AT, Dalmaz C (2012) Isolation stress during the prepubertal period in rats induces long-lasting neurochemical changes in the prefrontal cortex. *Neurochem Res* 37:1063-1073.
- Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K,

- Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T (2007) Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 6:55-68.
- Kwon O, Kim KW, Kim MS (2016) Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci* 73:1457-1477.
- Kyrou I, Chrousos GP, Tsigos C (2006) Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Ann N Y Acad Sci* 1083:77-110.
- Ladyman SR, Grattan DR (2013) JAK-STAT and feeding. *JAKSTAT* 2:e23675.
- Lavoie J, Pereira LC, Talwar V (2016) Children's Physical Resilience Outcomes: Meta-Analysis of Vulnerability and Protective Factors. *J Pediatr Nurs* 31:701-711.
- Leloup C, Casteilla L, Carriere A, Galinier A, Benani A, Carneiro L, Penicaud L (2011) Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. *Antioxid Redox Signal* 14:519-530.
- Leon-Cabrera S, Solis-Lozano L, Suarez-Alvarez K, Gonzalez-Chavez A, Bejar YL, Robles-Diaz G, Escobedo G (2013) Hyperleptinemia is associated with parameters of low-grade systemic inflammation and metabolic dysfunction in obese human beings. *Front Integr Neurosci* 7:62.
- Levine AS, Billington CJ (1997) Why do we eat? A neural systems approach. *Annu Rev Nutr* 17:597-619.
- Liang S, Byers DM, Irwin LN (2007) Chronic mild stressors and diet affect gene expression differently in male and female rats. *J Mol Neurosci* 33:189-200.
- Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN (1996) Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB J* 10:1532-1538.
- Loman MM, Gunnar MR, Early Experience S, Neurobehavioral Development C (2010) Early experience and the development of stress reactivity and regulation in children. *Neurosci Biobehav Rev* 34:867-876.
- Lu SC (2000) Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul* 36:95-116.
- Lucas M, Ilin Y, Anunu R, Kehat O, Xu L, Desmedt A, Richter-Levin G (2014) Long-term effects of controllability or the lack of it on coping abilities and stress resilience in the rat. *Stress* 17:423-430.
- Lucassen PJ, Naninck EF, van Goudoever JB, Fitzsimons C, Joels M, Korosi A (2013) Perinatal programming of adult hippocampal structure and function; emerging roles of stress, nutrition and epigenetics. *Trends Neurosci* 36:621-631.
- Lukkes J, Vuong S, Scholl J, Oliver H, Forster G (2009a) Corticotropin-releasing factor receptor antagonism within the dorsal raphe nucleus reduces social anxiety-like behavior after early-life social isolation. *J Neurosci* 29:9955-9960.
- Lukkes JL, Mokin MV, Scholl JL, Forster GL (2009b) Adult rats exposed to early-life social isolation exhibit increased anxiety and conditioned fear behavior, and altered hormonal stress responses. *Horm Behav* 55:248-256.
- Lukkes JL, Summers CH, Scholl JL, Renner KJ, Forster GL (2009c) Early life social isolation alters corticotropin-releasing factor responses in adult rats. *Neuroscience* 158:845-855.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C (2009) Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:434-445.
- Lustig RH (2001) The neuroendocrinology of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 30:765-785.
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell B (1997) An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 68:2061-2069.

- Machado TD, Dalle Molle R, Laureano DP, Portella AK, Werlang IC, Benetti Cda S, Noschang C, Silveira PP (2013) Early life stress is associated with anxiety, increased stress responsivity and preference for "comfort foods" in adult female rats. *Stress* 16:549-556.
- Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, Leza JC (2001) Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24:420-429.
- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161.
- Mainardi M, Scabia G, Vottari T, Santini F, Pinchera A, Maffei L, Pizzorusso T, Maffei M (2010) A sensitive period for environmental regulation of eating behavior and leptin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16673-16678.
- Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Su YA, Rennert OM, Chrousos GP (2007) Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 18:190-198.
- Marco EM, Macri S, Laviola G (2011) Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. *Neurotox Res* 19:286-307.
- Marti O, Marti J, Armario A (1994) Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav* 55:747-753.
- Martin-Gronert MS, Ozanne SE (2013) Early life programming of obesity. *Med Wieku Rozwoj* 17:7-12.
- Martin RL, Perez E, He YJ, Dawson R, Jr., Millard WJ (2000) Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. *Metabolism* 49:1479-1484.
- Matheny M, Shapiro A, Tumer N, Scarpace PJ (2011) Region-specific diet-induced and leptin-induced cellular leptin resistance includes the ventral tegmental area in rats. *Neuropharmacology* 60:480-487.
- Matsuda M, Shimomura I (2013) Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract* 7:e330-341.
- Matsuzawa Y (2010) Adiponectin: a key player in obesity related disorders. *Curr Pharm Des* 16:1896-1901.
- Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A (2008) Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60:748-766.
- McCormick CM, Mathews IZ (2007) HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacol Biochem Behav* 86:220-233.
- McCormick CM, Mathews IZ, Thomas C, Waters P (2010) Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. *Brain Cogn* 72:73-85.
- McCormick CM, Smith C, Mathews IZ (2008) Effects of chronic social stress in adolescence on anxiety and neuroendocrine response to mild stress in male and female rats. *Behav Brain Res* 187:228-238.
- McEwen BS (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 886:172-189.
- McLaughlin KA, Fox NA, Zeanah CH, Sheridan MA, Marshall P, Nelson CA (2010) Delayed maturation in brain electrical activity partially explains the association

- between early environmental deprivation and symptoms of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 68:329-336.
- McLaughlin KA, Sheridan MA, Winter W, Fox NA, Zeanah CH, Nelson CA (2014) Widespread reductions in cortical thickness following severe early-life deprivation: a neurodevelopmental pathway to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 76:629-638.
- McQuillen PS, Ferriero DM (2004) Selective vulnerability in the developing central nervous system. *Pediatr Neurol* 30:227-235.
- Melnick I, Pronchuk N, Cowley MA, Grove KL, Colmers WF (2007) Developmental switch in neuropeptide Y and melanocortin effects in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuron* 56:1103-1115.
- Miao L, St Clair DK (2009) Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic Biol Med* 47:344-356.
- Miller EW, Dickinson BC, Chang CJ (2010) Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15681-15686.
- Morabito MV, Ravussin Y, Mueller BR, Skowronski AA, Watanabe K, Foo KS, Lee SX, Lehmann A, Hjorth S, Zeltser LM, LeDuc CA, Leibel RL (2017) Weight Perturbation Alters Leptin Signal Transduction in a Region-Specific Manner throughout the Brain. *PLoS One* 12:e0168226.
- Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, Velloso LA (2009) High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* 4:e5045.
- Mulet T, Pico C, Oliver P, Palou A (2003) Blood leptin homeostasis: sex-associated differences in circulating leptin levels in rats are independent of tissue leptin expression. *Int J Biochem Cell Biol* 35:104-110.
- Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG, Jr. (2005) Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci* 62:642-652.
- Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C (2004) Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145:4880-4889.
- Munzberg H, Myers MG, Jr. (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 8:566-570.
- Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Jr., Tapscott EB, Coleman RA (1997) Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 46:1360-1363.
- Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA (2011) Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol Metab Syndr* 3:17.
- Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P (2006) Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 110:267-278.
- Orzechowski A, Grizard J, Jank M, Gajkowska B, Lokociejewska M, Zaron-Teperek M, Godlewski M (2002) Dexamethasone-mediated regulation of death and differentiation of muscle cells. Is hydrogen peroxide involved in the process? *Reprod Nutr Dev* 42:197-216.
- Ouyang S, Hsueh H, Kastin AJ, Wang Y, Yu C, Pan W (2014) Diet-induced obesity suppresses expression of many proteins at the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:43-51.
- Pagani LS, Fitzpatrick C, Barnett TA, Dubow E (2010) Prospective associations between early childhood television exposure and academic, psychosocial, and physical well-being by middle childhood. *Arch Pediatr Adolesc Med* 164:425-431.

- Paizanis E, Kelai S, Renoir T, Hamon M, Lanfumey L (2007) Life-long hippocampal neurogenesis: environmental, pharmacological and neurochemical modulations. *Neurochem Res* 32:1762-1771.
- Panksepp JB, Jochman KA, Kim JU, Koy JJ, Wilson ED, Chen Q, Wilson CR, Lahvis GP (2007) Affiliative behavior, ultrasonic communication and social reward are influenced by genetic variation in adolescent mice. *PLoS One* 2:e351.
- Panksepp JB, Lahvis GP (2007) Social reward among juvenile mice. *Genes Brain Behav* 6:661-671.
- Pariante CM, Miller AH (2001) Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry* 49:391-404.
- Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, Bonora M, De Marchi E, Giorgi C, Marchi S, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P (2011) Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal* 9:19.
- Patti ME, Corvera S (2010) The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 31:364-395.
- Paus T, Keshavan M, Giedd JN (2008) Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci* 9:947-957.
- Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC (2011) The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism* 60:1500-1510.
- Peckham SC, Entenman C (1962) The influence of a hypercaloric diet on gross body and adipose tissue composition in the rat. *Res Dev Tech Rep* 23.
- Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF (2004) Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145:3754-3762.
- Perello M, Cakir I, Cyr NE, Romero A, Stuart RC, Chiappini F, Hollenberg AN, Nillni EA (2010) Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E976-989.
- Pervanidou P, Chrousos GP (2012) Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism* 61:611-619.
- Pesonen AK, Raikkonen K, Feldt K, Heinonen K, Osmond C, Phillips DI, Barker DJ, Eriksson JG, Kajantie E (2010) Childhood separation experience predicts HPA axis hormonal responses in late adulthood: a natural experiment of World War II. *Psychoneuroendocrinology* 35:758-767.
- Pintus F, Floris G, Rufini A (2012) Nutrient availability links mitochondria, apoptosis, and obesity. *Aging (Albany NY)* 4:734-741.
- Pires KM, Ilkun O, Valente M, Boudina S (2014) Treatment with a SOD mimetic reduces visceral adiposity, adipocyte death, and adipose tissue inflammation in high fat-fed mice. *Obesity (Silver Spring)* 22:178-187.
- Pliner P, Mann N (2004) Influence of social norms and palatability on amount consumed and food choice. *Appetite* 42:227-237.
- Popkin BM, Duffey K, Gordon-Larsen P (2005) Environmental influences on food choice, physical activity and energy balance. *Physiol Behav* 86:603-613.
- Psarra AM, Sekeris CE (2008) Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. *IUBMB Life* 60:210-223.
- Putti R, Sica R, Migliaccio V, Lionetti L (2015) Diet impact on mitochondrial bioenergetics and dynamics. *Front Physiol* 6:109.

- Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS (2004) Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 10:524-529.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266:4244-4250.
- Razmara A, Duckles SP, Krause DN, Procaccio V (2007) Estrogen suppresses brain mitochondrial oxidative stress in female and male rats. *Brain Res* 1176:71-81.
- Reinehr T (2010) Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol* 316:165-171.
- Reinehr T, Roth C, Menke T, Andler W (2004) Adiponectin before and after weight loss in obese children. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3790-3794.
- Remmers F, Deleamarre-van de Waal HA (2011) Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocr Rev* 32:272-311.
- Rezin GT, Cardoso MR, Goncalves CL, Scaini G, Fraga DB, Riegel RE, Comim CM, Quevedo J, Streck EL (2008) Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem Int* 53:395-400.
- Rice D, Barone S, Jr. (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3:511-533.
- Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, Cusi K, Mandarino SJ, Finlayson J, DeFronzo RA, Jenkinson CP, Mandarino LJ (2005) Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle. *J Biol Chem* 280:10290-10297.
- Roca P, Rodriguez AM, Oliver P, Bonet ML, Quevedo S, Pico C, Palou A (1999) Brown adipose tissue response to cafeteria diet-feeding involves induction of the UCP2 gene and is impaired in female rats as compared to males. *Pflugers Arch* 438:628-634.
- Rodriguez E, Monjo M, Rodriguez-Cuenca S, Pujol E, Amengual B, Roca P, Palou A (2001) Sexual dimorphism in the adrenergic control of rat brown adipose tissue response to overfeeding. *Pflugers Arch* 442:396-403.
- Romeo RD, Bellani R, Karatsoreos IN, Chhua N, Vernov M, Conrad CD, McEwen BS (2006a) Stress history and pubertal development interact to shape hypothalamic-pituitary-adrenal axis plasticity. *Endocrinology* 147:1664-1674.
- Romeo RD, Karatsoreos IN, McEwen BS (2006b) Pubertal maturation and time of day differentially affect behavioral and neuroendocrine responses following an acute stressor. *Horm Behav* 50:463-468.
- Romeo RD, Lee SJ, Chhua N, McPherson CR, McEwen BS (2004a) Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats. *Neuroendocrinology* 79:125-132.
- Romeo RD, Lee SJ, McEwen BS (2004b) Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology* 80:387-393.
- Romeo RD, McEwen BS (2006) Stress and the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 1094:202-214.
- Rose AJ, Rudolph KD (2006) A review of sex differences in peer relationship processes: potential trade-offs for the emotional and behavioral development of girls and boys. *Psychol Bull* 132:98-131.

- Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, Jinagouda SD, el-Tawil K, Rude RK, Kamdar V (1997) Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 82:579-584.
- Sainz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA (2015) Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* 64:35-46.
- Sato H, Takahashi T, Sumitani K, Takatsu H, Urano S (2010) Glucocorticoid Generates ROS to Induce Oxidative Injury in the Hippocampus, Leading to Impairment of Cognitive Function of Rats. *J Clin Biochem Nutr* 47:224-232.
- Schafer FQ, Buettner GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30:1191-1212.
- Scherer PE (2006) Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55:1537-1545.
- Schmidt MV, Czisch M, Sterlemann V, Reinel C, Samann P, Muller MB (2009) Chronic social stress during adolescence in mice alters fat distribution in late life: prevention by antidepressant treatment. *Stress* 12:89-94.
- Seo MK, Ly NN, Lee CH, Cho HY, Choi CM, Nhu le H, Lee JG, Lee BJ, Kim GM, Yoon BJ, Park SW, Kim YH (2016) Early life stress increases stress vulnerability through BDNF gene epigenetic changes in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 105:388-397.
- Servatius RJ, Natelson BH, Moldow R, Pogach L, Brennan FX, Ottenweller JE (2000) Persistent neuroendocrine changes in multiple hormonal axes after a single or repeated stressor exposures. *Stress* 3:263-274.
- Shao SS, Zhao YF, Song YF, Xu C, Yang JM, Xuan SM, Yan HL, Yu CX, Zhao M, Xu J, Zhao JJ (2014) Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. *Acta Pharmacol Sin* 35:1411-1420.
- Shapiro A, Tumer N, Gao Y, Cheng KY, Scarpance PJ (2011) Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. *Br J Nutr* 106:390-397.
- Sharma J, Johnston MV, Hossain MA (2014) Sex differences in mitochondrial biogenesis determine neuronal death and survival in response to oxygen glucose deprivation and reoxygenation. *BMC Neurosci* 15:9.
- Shefer G, Marcus Y, Stern N (2013) Is obesity a brain disease? *Neurosci Biobehav Rev* 37:2489-2503.
- Sheridan MA, Fox NA, Zeanah CH, McLaughlin KA, Nelson CA, 3rd (2012) Variation in neural development as a result of exposure to institutionalization early in childhood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:12927-12932.
- Shi H, Seeley RJ, Clegg DJ (2009) Sexual differences in the control of energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol* 30:396-404.
- ShklyaeV S, Aslanidi G, Tennant M, Prima V, Kohlbrenner E, Kroutov V, Campbell-Thompson M, Crawford J, Shek EW, Scarpance PJ, Zolotukhin S (2003) Sustained peripheral expression of transgene adiponectin offsets the development of diet-induced obesity in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14217-14222.
- Short KR, Nygren J, Barazzoni R, Levine J, Nair KS (2001) T(3) increases mitochondrial ATP production in oxidative muscle despite increased expression of UCP2 and -3. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E761-769.
- Silveira PP, Xavier MH, Souza FH, Manoli LP, Rosat RM, Ferreira MB, Dalmaz C (2000) Interaction between repeated restraint stress and concomitant midazolam

- administration on sweet food ingestion in rats. *Braz J Med Biol Res* 33:1343-1350.
- Simsek S, Kaplan I, Uysal C, Yuksel T, Alaca R (2016) The Levels of Cortisol, Oxidative Stress, and DNA Damage in the Victims of Childhood Sexual Abuse: A Preliminary Study. *J Child Sex Abus* 25:175-184.
- Solin AV, Liashev Iu D (2013) [Lipid peroxidation in the immobilization stress of different duration]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 99:751-755.
- Sosnovskii AS, Kozlov AV (1992) [Increased lipid peroxidation in the rat hypothalamus after short-term emotional stress]. *Biull Eksp Biol Med* 113:486-488.
- Sparks LM, Xie H, Koza RA, Mynatt R, Hulver MW, Bray GA, Smith SR (2005) A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes* 54:1926-1933.
- Springer AM, Foster-Schubert K, Morton GJ, Schur EA (2014) Is there evidence that estrogen therapy promotes weight maintenance via effects on leptin? *Menopause* 21:424-432.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277:44784-44790.
- St Germain DL, Galton VA, Hernandez A (2009) Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 150:1097-1107.
- Stein CJ, Colditz GA (2004) The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2522-2525.
- Stranahan AM (2015) Models and mechanisms for hippocampal dysfunction in obesity and diabetes. *Neuroscience* 309:125-139.
- Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman MF, McArthur MD, Meaney MJ (1997) High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am J Physiol* 273:E1168-1177.
- Teegarden SL, Bale TL (2008) Effects of stress on dietary preference and intake are dependent on access and stress sensitivity. *Physiol Behav* 93:713-723.
- Teegarden SL, Scott AN, Bale TL (2009) Early life exposure to a high fat diet promotes long-term changes in dietary preferences and central reward signaling. *Neuroscience* 162:924-932.
- Teepker M, Anthes N, Fischer S, Krieg JC, Vedder H (2007) Effects of oxidative challenge and calcium on ATP-levels in neuronal cells. *Neurotoxicology* 28:19-26.
- Teicher MH, Anderson CM, Polcari A (2012) Childhood maltreatment is associated with reduced volume in the hippocampal subfields CA3, dentate gyrus, and subiculum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E563-572.
- Teicher MH, Tomoda A, Andersen SL (2006) Neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment: are results from human and animal studies comparable? *Ann N Y Acad Sci* 1071:313-323.
- Tomiyama AJ, Dallman MF, Epel ES (2011) Comfort food is comforting to those most stressed: evidence of the chronic stress response network in high stress women. *Psychoneuroendocrinology* 36:1513-1519.
- Torres SJ, Nowson CA (2007) Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23:887-894.

- Tottenham N, Hare TA, Quinn BT, McCarry TW, Nurse M, Gilhooly T, Millner A, Galvan A, Davidson MC, Eigsti IM, Thomas KM, Freed PJ, Booma ES, Gunnar MR, Altemus M, Aronson J, Casey BJ (2010) Prolonged institutional rearing is associated with atypically large amygdala volume and difficulties in emotion regulation. *Dev Sci* 13:46-61.
- Townsend DM, Tew KD, Tapiero H (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 57:145-155.
- Trayhurn P, Bing C (2006) Appetite and energy balance signals from adipocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1237-1249.
- Tryon MS, DeCant R, Laugero KD (2013) Having your cake and eating it too: a habit of comfort food may link chronic social stress exposure and acute stress-induced cortisol hyporesponsiveness. *Physiol Behav* 114-115:32-37.
- Tsalouhidou S, Argyrou C, Theofilidis G, Karaoglanidis D, Orfanidou E, Nikolaidis MG, Petridou A, Mougios V (2006) Mitochondrial phospholipids of rat skeletal muscle are less polyunsaturated than whole tissue phospholipids: implications for protection against oxidative stress. *J Anim Sci* 84:2818-2825.
- Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53:865-871.
- Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS, Cooney GJ (2007) Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* 56:2085-2092.
- Tyrka AR, Wier L, Price LH, Ross NS, Carpenter LL (2008) Childhood parental loss and adult psychopathology: effects of loss characteristics and contextual factors. *Int J Psychiatry Med* 38:329-344.
- Ulrich-Lai YM, Herman JP (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10:397-409.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT (2009) Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7:65-74.
- Valle A, Catala-Niell A, Colom B, Garcia-Palmer FJ, Oliver J, Roca P (2005) Sex-related differences in energy balance in response to caloric restriction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E15-22.
- Valzelli L (1973) The "isolation syndrome" in mice. *Psychopharmacologia* 31:305-320.
- van den Berg CL, Hol T, Van Ree JM, Spruijt BM, Everts H, Koolhaas JM (1999) Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Dev Psychobiol* 34:129-138.
- Van der Geyten S, Darras VM (2005) Developmentally defined regulation of thyroid hormone metabolism by glucocorticoids in the rat. *J Endocrinol* 185:327-336.
- van Swieten MM, Pandit R, Adan RA, van der Plasse G (2014) The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 61-62:207-220.
- Velloso LA, Schwartz MW (2011) Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 35:1455-1465.
- Vina J, Gambini J, Lopez-Gruoso R, Abdelaziz KM, Jove M, Borras C (2011) Females live longer than males: role of oxidative stress. *Curr Pharm Des* 17:3959-3965.
- Von Frijtag JC, Schot M, van den Bos R, Spruijt BM (2002) Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats. *Dev Psychobiol* 41:58-69.
- Vythilingam M, Heim C, Newport J, Miller AH, Anderson E, Bronen R, Brummer M, Staib L, Vermetten E, Charney DS, Nemeroff CB, Bremner JD (2002)

- Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. *Am J Psychiatry* 159:2072-2080.
- Walczewska A, Dziedzic B, Stepień T, Swiatek E, Nowak D (2010) Effect of dietary fats on oxidative-antioxidative status of blood in rats. *J Clin Biochem Nutr* 47:18-26.
- Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39:359-407.
- Wallace DC, Shoffner JM, Trounce I, Brown MD, Ballinger SW, Corral-Debrinski M, Horton T, Jun AS, Lott MT (1995) Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. *Biochim Biophys Acta* 1271:141-151.
- Wang HT, Liu CF, Tsai TH, Chen YL, Chang HW, Tsai CY, Leu S, Zhen YY, Chai HT, Chung SY, Chua S, Yen CH, Yip HK (2012) Effect of obesity reduction on preservation of heart function and attenuation of left ventricular remodeling, oxidative stress and inflammation in obese mice. *J Transl Med* 10:145.
- Weiss IC, Pryce CR, Jongen-Relo AL, Nanz-Bahr NI, Feldon J (2004) Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav Brain Res* 152:279-295.
- Wenz T (2013) Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1alpha under cellular stress. *Mitochondrion* 13:134-142.
- Wiesner RJ, Kurowski TT, Zak R (1992) Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 6:1458-1467.
- Williams LM (2012) Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc* 71:521-533.
- Wunderlich CM, Hovelmeyer N, Wunderlich FT (2013) Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT* 2:e23878.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7:941-946.
- Yokota T, Kinugawa S, Hirabayashi K, Matsushima S, Inoue N, Ohta Y, Hamaguchi S, Sobirin MA, Ono T, Suga T, Kuroda S, Tanaka S, Terasaki F, Okita K, Tsutsui H (2009) Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1069-1077.
- Young EA, Altemus M, Parkison V, Shastry S (2001) Effects of estrogen antagonists and agonists on the ACTH response to restraint stress in female rats. *Neuropsychopharmacology* 25:881-891.
- Yu L, Fink BD, Herlein JA, Oltman CL, Lamping KG, Sivitz WI (2014) Dietary fat, fatty acid saturation and mitochondrial bioenergetics. *J Bioenerg Biomembr* 46:33-44.
- Zannas AS, West AE (2014) Epigenetics and the regulation of stress vulnerability and resilience. *Neuroscience* 264:157-170.
- Zellner DA, Loaiza S, Gonzalez Z, Pita J, Morales J, Pecora D, Wolf A (2006) Food selection changes under stress. *Physiol Behav* 87:789-793.
- Zylan KD, Brown SD (1996) Effect of stress and food variety on food intake in male and female rats. *Physiol Behav* 59:165-169.

8. ANEXO



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 27714

Título: Estudo da função mitocondrial em hipocampo e córtex de ratos Wistar adultos submetidos ao estresse por isolamento no período pré-púbere: possíveis interações com dieta hiperlipídica

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARLA DALMAZ - coordenador desde 01/08/2014
Rachel Krolow Santos Silva Bast - pesquisador desde 01/08/2014
Danusa Mar Arcego - Aluno de Doutorado desde 01/08/2014
Camilla Lazzaretti - Aluno de Doutorado desde 01/08/2014
Carine Lampert - Aluno de Doutorado desde 01/08/2014
Ana Paula Toniazco - Aluno de Doutorado desde 01/08/2014
ISABELA GUERRA DE CARVALHO - desde 01/08/2014

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 01/09/2014, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 264 Ratos Wistar (132 machos e 132 fêmeas), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 10 de Setembro de 2014

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética