

**RESTRIÇÃO NUTRICIONAL GESTACIONAL ALTERA A ORGANIZAÇÃO DA
GLÂNDULA ADRENAL EM RATAS**
*GESTATIONAL NUTRITIONAL RESTRICTION ALTERS ADRENAL GLAND ORGANIZATION IN
FEMALE RATS*

TELLES, Bruno dos Santos; REBELATO, Hércules Jonas;
ESQUISATTO, Marcelo Augusto Marretto; CATISTI, Rosana
Núcleo de Pesquisa em Ciências da Saúde, Centro Universitário da Fundação
Hermínio Ometto – FHO, Araras, São Paulo, Brasil.

marcelosquisatto@fho.edu.br

RESUMO. A má nutrição durante a gravidez causa adaptação metabólica e/ou estrutural permanente na prole. A glândula adrenal produz vários hormônios esteróides durante a gravidez. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a influência da dieta durante a gestação sobre as glândulas adrenais de ratas Wistar. Para isso, ratas Wistar prenhes de 10 semanas (p, n=15) e ratas não prenhes (np, n=15) foram divididas em três grupos e receberam dieta controle normoproteica (C, 17% de caseína, n=5), dieta hipocalórica isocalórica (PR, 6% de caseína, n=5) e 50% de restrição calórica (RC, 50% da dieta consumida pelo grupo C), durante um período de 21 dias. No 21º dia de gestação (grupos 21dG, p) ou no 21º dia de dieta (grupos np), após aprofundamento anestésico, a glândula adrenal direita foi coletada, pesada (massa total) e preparada para inclusão em Paraplast® para exame histomorfométrico e análise imuno-histoquímica (Ki-67, receptores de glicocorticóides (GR) e receptor de mineralocorticóide (MR)) nas diferentes áreas da glândula. Os dados, expressos como média ± DP, foram avaliados por análise de variância unidirecional com pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). CR na gravidez aumentou a quantidade de receptores GR, MR e Ki-67 na glândula adrenal. O grupo npRC apresentou maior reatividade de GR em comparação com os animais que receberam uma dieta normal. A restrição proteica na gravidez diminuiu a RM adrenal. Os resultados permitiram concluir que, mesmo sem alterar o peso das glândulas adrenais, o grupo pRC foi o que mais sofreu estresse durante o estudo, sugerindo que a RC associada à gravidez pode causar alterações morfofuncionais nas glândulas adrenais.

Palavras-chave: Restrição calórica, Restrição proteica, Gravidez, Adrenal, Receptores de glicocorticóides/mineralocorticóides.

ABSTRACT. Poor nutrition during pregnancy causes permanent metabolic and/or structural adaptation in offspring. The adrenal gland produces various steroid hormones during pregnancy. Thus, this study aimed to evaluate the influence of diet during pregnancy on the adrenal glands of Wistar female rats. For this, 10-week-old pregnant Wistar rats (p, n=15) and non-pregnant rats (np, n=15) were divided into three groups and received a normoproteic control diet (C, 17% casein, n=5), isocaloric low-protein diet (PR, 6% casein, n=5), or 50% calorie restriction (CR, 50% of the diet consumed by group C), over a period of 21 days. On the 21st day of gestation (21dG, p groups) or on the 21st day of diet (np groups), after anesthetic deepening, the right adrenal gland was collected, weighed (total mass), and prepared for inclusion in Paraplast® for histomorphometric and immunohistochemical analysis (Ki-67, glucocorticoid receptors (GR), and mineralocorticoid receptor (MR)) in the different areas of the gland. Data, expressed as the mean ± SD, were evaluated by one-way analysis of variance with Tukey's post-test ($p < 0.05$). CR in pregnancy increased the amount of GR, MR, and Ki-67 receptors in the adrenal gland. The npRC group showed highest GR staining compared to the animals that received a normal diet. Protein restriction in pregnancy decreases adrenal MR. The results allowed us to conclude that even without altering the weight of the adrenal

glands, the pRC group suffered the most from stress during the study, suggesting that CR associated with pregnancy can cause morphofunctional changes in the adrenal glands.

Keywords: Caloric restriction, Protein restriction, Pregnancy, Adrenal, Glucocorticoid/mineralocorticoid receptors.

INTRODUÇÃO

As glândulas adrenais (GA) são estruturas bilaterais localizadas acima do polo superior dos rins. Em mulheres jovens saudáveis, o GA é rosa, lisa e opaca. Nos homens, é um órgão menor e mais avermelhado que aparece levemente translúcido. Quando seccionado, o tecido é macio, e a medula, com aspecto arredondado a oval, é centralizada e de cor vermelho escuro. Em termos de peso, a glândula adrenal é aproximadamente 25% mais pesada nas mulheres do que nos homens, pois as mulheres têm um córtex mais largo, mas a medula tem o mesmo tamanho em ambos os sexos (HARDY; COOPER, 2010). Histologicamente, é dividida em córtex e medula e atua como um regulador essencial da resposta ao estresse (KANCZKOWSKI; SUE; BORNSTEIN, 2017). Em ratos, as glândulas adrenais estão emparelhadas acima dos rins; a direita está um pouco medial ao pólo superior e intimamente conectada a ele, enquanto a GA esquerda está acima deste órgão (DUNN, 1970).

A restrição calórica (CR) é definida como uma redução na ingestão calórica abaixo do habitual *ad libitum* sem desnutrição, o que geralmente representa uma diminuição de 10 a 40% na ingestão calórica sem redução no conteúdo nutricional da dieta (BAGHERNIYA *et al.*, 2018). Isso resulta em um atraso no envelhecimento, prolongamento da expectativa de vida máxima e média em animais de diferentes espécies e uma diminuição significativa de doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas e cânceres (AL-REGAIEY, 2016).

A restrição proteica (RP) pode ser definida como a restrição da ingestão de aminoácidos sem desnutrição (YOUNGMAN, 1993). Estudos em leveduras e moscas mostraram que a restrição de aminoácidos promove longevidade e proteção. Em roedores, a restrição de proteína prolonga a expectativa de vida e alivia os fenótipos nocivos associados ao envelhecimento (MIRZAEI; RAYNES; LONGO, 2016).

Outros benefícios significativos para a saúde da restrição nutricional também foram demonstrados, incluindo diminuição da angiogênese tumoral (HAWRYLEWICZ *et al.*, 1982; YOUNGMAN; CAMPBELL, 1992), enzimas antioxidantes que aumentam as defesas (LAMMI-KEEFE *et al.*, 1984), respostas imunológicas aprimoradas (JOSE; GOOD, 1973; BELL *et al.*, 1990) e redução do colesterol sérico total (TERPSTRA *et al.*, 1981; YOUNGMAN, 1987). Animais PR geralmente têm um tamanho corporal menor (YOUNGMAN; CAMPBELL, 1992) e mais ativos fisicamente (KRIEGER *et al.*, 1988). Além disso, tanto PR (YOUNGMAN; PARK; AMES, 1992) quanto RC (LOK *et al.*, 1990) diminuem significativamente as taxas de divisão celular em muitos tecidos (YOUNGMAN, 1993).

Durante o período gestacional, inúmeras mudanças ocorrem no corpo para atender às necessidades da mãe e do feto. Entre essas alterações estão o acúmulo de tecido adiposo materno, o aumento da taxa de metabolismo junto com o aumento do débito cardíaco e da frequência respiratória e uma maior ingestão calórica, o que é essencial para uma gravidez que não traga riscos para a gestante e muito menos para a prole (KING, 2000).

Durante a gestação, o metabolismo dos nutrientes sofre ajustes decorrentes das alterações hormonais, da demanda do feto e da oferta materna de nutrientes, principalmente na última metade da gestação, período de maior crescimento do feto. Essas transições, juntamente com hábitos comportamentais, mudanças na quantidade de alimentos consumidos ou gastos de energia, escolhas alimentares ou tipo de atividade física das mães, aumentam os ajustes fisiológicos necessários

durante a gravidez. Entretanto, quando a adaptação fisiológica do organismo é ultrapassada nessa fase, o desenvolvimento fetal pode ser prejudicado (KING, 2000).

A nutrição deficiente durante a gravidez resulta em adaptações metabólicas e/ou estruturais permanentes na prole. Fêmeas com deficiência calórica ou desnutrição durante a gravidez afetam sua prole, aumentando o risco de desenvolver patologias na vida adulta, como síndrome metabólica, obesidade, doenças cardiovasculares e *diabetes mellitus* tipo 2 (CHANGO; POGRIBNY, 2015). Sabe-se que as fêmeas grávidas podem sofrer aumento da pressão arterial (GAO; YALLAMPALLI; YALLAMPALLI, 2012), juntamente com alterações no sistema imunológico (THIELE; DIAO; ARK, 2017), além de estarem sujeitas às alterações em sua GA durante o período gestacional.

Embora progressiva, houve uma redução do número de indivíduos desnutridos na sociedade atual. Os padrões alimentares da sociedade contemporânea têm sofrido mudanças devido aos avanços nas tecnologias de produção e industrialização de alimentos. Outros fatores também mudaram, como a assimilação de padrões culturais e modificação de hábitos de vida. Assim, hoje, questões importantes relacionadas ao impacto da restrição nutricional no metabolismo devem ser avaliadas em modelos animais. As mudanças no GA durante a gravidez em ratas são pouco compreendidas. Dada a importância dessa glândula na produção de hormônios no sexo feminino, descrever as alterações induzidas pela restrição alimentar na gravidez é essencial para entender sua fisiologia. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a organização morfofuncional da glândula adrenal em ratas Wistar adultas jovens submetidas à restrição nutricional (CR e PR), independentemente do estado de gestação.

METODOLOGIA

Procedimento experimental

O estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela Lei Arouca, aprovadas pelos princípios éticos de pesquisa com animais adotados pelo COBEA e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário da Fundação Hermínio Ometto-FHO, parecer 062/2016. Ratos Wistar fêmeas (10 semanas de idade, pesando aproximadamente 250-300 g) foram submetidos a acasalamento. Uma vez verificada a presença de espermatozoides no lavado vaginal, esses animais foram denominados grupo prenhe (p, n = 15) e o outro grupo de ratas não prenhes foi denominado grupo não prenhe (np, n = 15). Após a separação dos grupos, os ratos foram divididos em três subgrupos: os que receberam uma dieta controle normoproteica (C, 17% caseína, n=5), uma dieta isocalórica hipoproteica (RP, 6% caseína, n=5), ou restrição calórica de 50% (RC, 50% da dieta consumida pelo grupo C, n=5) por um período de 21 dias. As dietas foram calculadas diariamente, considerando o peso da quantidade ofertada e a quantidade que sobrou para os controles, ou seja, a quantidade ingerida pelo grupo controle. A partir disso, 50% foi calculado para o grupo RC. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ \text{C}$) com ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água. No 21º dia de gestação (animais 21dG, P) ou no 21º dia de dieta (grupos NP), após anestesia profunda com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), as adrenais direitas dos animais foram coletadas, pesadas e processadas para análise estrutural.

Crescimento corporal e consumo de alimentos

Os ratos foram pesados uma vez por semana nos dias 0, 7, 14 e 21 do estudo experimental (ou gestacional). A dieta foi pesada diariamente durante 21 dias. Além da curva de crescimento, foi determinado o ganho de massa após a subtração das massas iniciais. O consumo de ração foi determinado pela diferença entre o peso da ração adicionada e a ração restante nas gaiolas.

Processamento para o estudo histomorfométrico da adrenal

Após a remoção, as adrenais foram pesadas e imersas em solução fixadora contendo formaldeído a 10% em tampão Millonig pH 7,4 por 24 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as peças foram lavadas em tampão e submetidas aos procedimentos padrão de inclusão em parafina (Paraplast® - Merck). Cortes transversais de 5 µm de espessura foram submetidos à coloração de hematoxilina-eosina. Foram utilizadas três amostras para cada um dos cinco cortes obtidos da região mediana de cada um dos três animais em cada tratamento. As imagens de biópsia foram capturadas em um microscópio Leica DM2000 usando o software Leica Application Slite (versão 3.3.0).

A partir das imagens, o programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) foi calibrado para medir as áreas do córtex e da medula, medindo a barra de escala dividida pelo seu valor (50 µm), o que resultou em um valor de 8,68 µm/pixel. Após esse processo, iniciaram-se as medidas pelo contorno e mensuração da área total e área medular. A área total foi subtraída da área medular, que deu a área cortical adrenal. Após a medição, foram calculadas as seguintes razões: área cortical/área total, área medular/área total e massa adrenal/massa do animal. Todo o processo foi realizado para todos os grupos, e os resultados foram comparados estatisticamente.

Quantificação de fibras colágenas

Cortes transversais de 5 µm de espessura foram corados pela técnica de tricrômio de Mallory. Foram utilizadas três amostras para cada um dos cinco cortes obtidos da região mediana de cada um dos três animais em cada tratamento. As imagens de biópsia foram capturadas em um microscópio Leica DM2000 usando o software Leica Application Slite (versão 3.3.0). As imagens foram analisadas com o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) por deconvolução de cores e analisadas estatisticamente.

Análise imuno-histoquímica

Foram avaliados a expressão de receptores de glicocorticoides (GR), receptores de mineralocorticoides (MR) e do antígeno Ki-67 nas glândulas adrenais de ratas adultas jovens gestantes e não gestantes submetidas a diferentes protocolos nutricionais. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por GIANCHINI *et al.* (2007). Resumidamente, a recuperação antigênica foi realizada por imersão da lâmina silanizada em solução de citrato de sódio (10 mM, pH 6,0) por 40 min a 95°C. Cada etapa foi seguida por lavagem com PBS. Todas as etapas foram realizadas em câmara úmida sob cuidados para evitar a desidratação dos cortes. A incubação com o anticorpo primário foi realizada incubando os cortes com anti-GR (camundongo monoclonal, Santa Cruz, EUA), anti-MCR (camundongo monoclonal, Santa Cruz, EUA) e anti-Ki-67 (camundongo monoclonal, Santa Cruz, EUA) que foram diluídos 1:200 em PBS contendo 3% de albumina bovina (v/v) durante a noite a 4°C. Após a reação do anticorpo primário, foi utilizado um kit Novolink Polymer Detection Systems (RE7280K; Leica Biosystems Newcastle L10, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) contendo o anticorpo secundário. Após lavagem em PBS, a reação da peroxidase foi visualizada utilizando DAB (3,3'-diaminobenzidina) do mesmo kit. Para cada reação imuno-histoquímica foi realizado um controle negativo omitindo-se o anticorpo primário. Os cortes foram examinados em fotomicroscópio Leica DM2000 em imagens digitalizadas com o auxílio do programa Sigma Scan Pro 5.0™ e avaliadas por área (µm²) com o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). A quantificação baseou-se na decomposição da imagem imuno-histoquímica em três cores básicas: marrom (imuno-histoquímica), roxo (hematoxilina de Harris) e verde (fundo de lâminas de vidro). A análise morfométrica, correspondente à cor marrom, foi realizada por meio da função limiar (ImageJ), e os anticorpos/marcadores foram medidos como a porcentagem do total de pixels em cada imagem

(LANDINI; MARTINELLI; PICCININI, 2021). Os dados são relatados como a área percentual do respectivo anticorpo.

Análise estatística

Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey usando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, EUA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$, $n=5$). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão ($X \pm DP$) e posteriormente representados como percentual de variação em relação aos controles, aos quais foi atribuído o valor de 100%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito da restrição nutricional nas características anatômicas

O ganho de massa corporal dos ratos foi analisado por meio da pesagem semanal dos animais no tempo 0 (dia de acasalamento) e no 7º, 14º e 21º dias de gestação (Figura 1). Ao longo do período de estudo, o grupo de animais pC apresentou curva de peso ascendente, indicando que o crescimento esperado ocorreu durante a gestação, enquanto no grupo pRC houve perda de peso nos primeiros 14 dias em relação ao peso inicial, com ganho de massa apenas na última semana de gravidez. O grupo pRP também apresentou menor ganho de massa corporal. Houve diminuição gradativa do consumo semanal de dieta nos grupos quando avaliados da 1ª à 3ª semana gestacional. A gestação e/ou dieta não alteraram a massa da glândula adrenal direita.

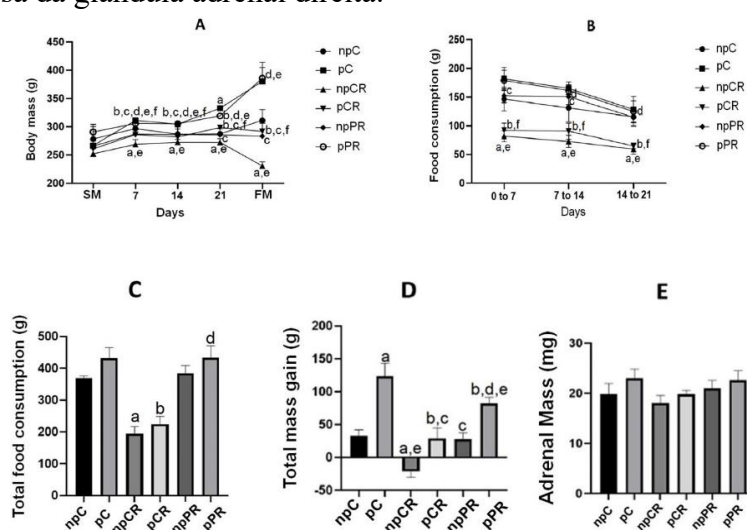


Figura 1. Restrição nutricional em ratas prenhes e não prenhes. A) Massa corporal de animais gestantes e não gestantes. B) Consumo de alimentos. C) Consumo alimentar total dos animais. D) Ganho de peso total dos animais ($n = 5$). E) Massa das glândulas adrenais direitas após eutanásia. Média \pm DP ($n = 6$; $p < 0,05$). (ANOVA, pós-teste de Tukey).

Efeito da restrição calórica na histomorfometria da glândula adrenal

Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais para as áreas cortical, medular e total. No entanto, a diferença foi evidente na relação massa adrenal/massa animal, com os grupos npC, pC e pRP apresentando valores menores do que o grupo npRC. Os grupos pRC e npRP apresentaram valores superiores a pRP e pC, que foram estatisticamente menores que os de npRP (Figura 2).

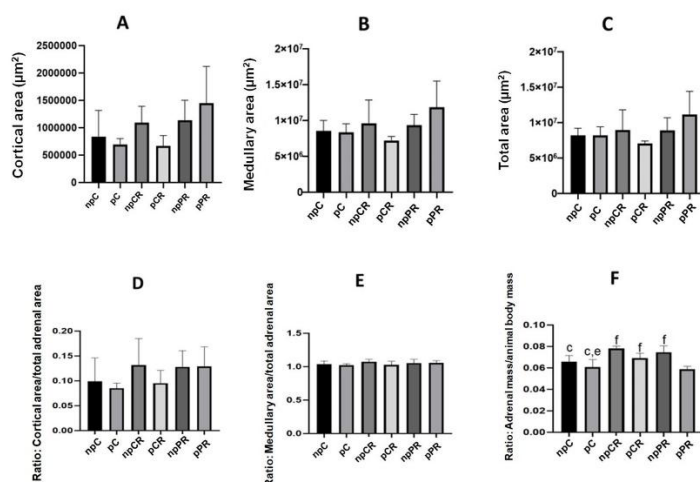


Figura 2. Histomorfometria das glândulas adrenais . A) Área cortical. B) Área medular. C) Área total. D) Razão entre a área cortical e a área adrenal total. E) Razão entre a área medular e a área adrenal total. F) Razão entre a massa adrenal e a massa corporal do animal (n = 5). Média \pm DP (n = 6; p < 0,05). (ANOVA, pós-teste de Tukey).

Quantificação de fibras colágenas

Na quantificação de fibras colágenas pelo tricrômico de Mallory, a zona glomerular do grupo pRC apresentou a menor quantidade de área de tecido conjuntivo (colágeno) em relação ao grupo npC (Figura 3A). Nas demais áreas, não houve diferença entre os grupos (Figura 3).

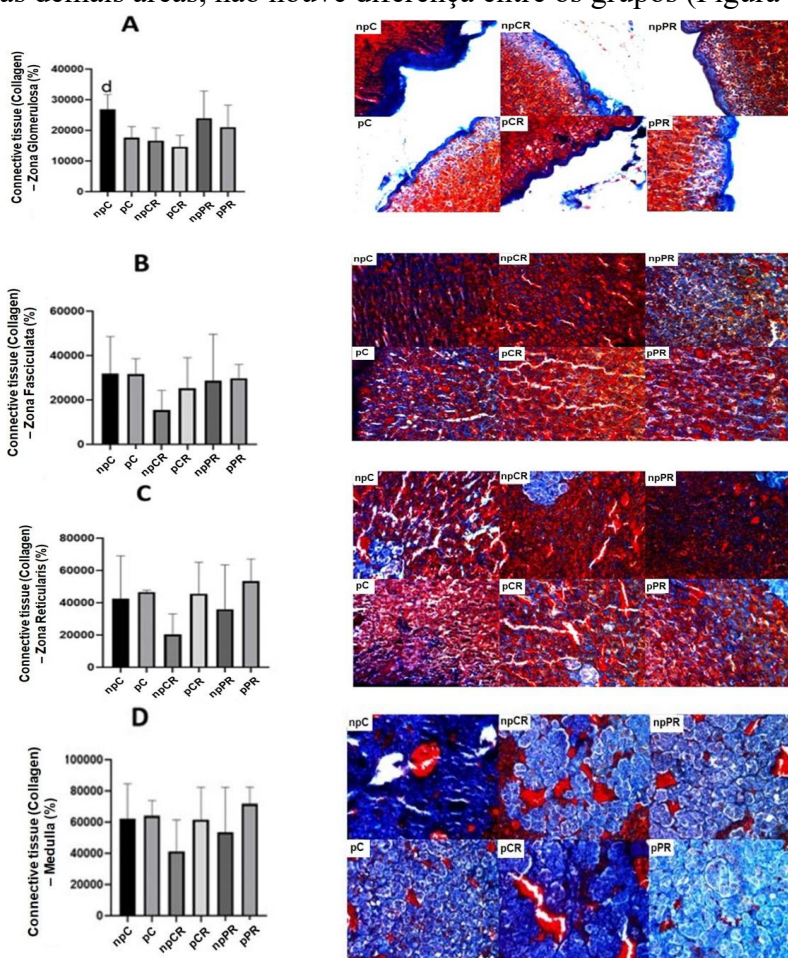


Figura 3. Área analisada de tecido conjuntivo (colágeno) na glândula adrenal. Quantificação de tecido conjuntivo (colágeno em azul), em porcentagem, nas áreas das glândulas adrenais pela coloração Tricrômico de Mallory. Ampliação final – 200x. A) Zona glomerular. B) Zona fasciculada. C) Zona reticulada. D) Zona medular. Média \pm DP (n = 5; p < 0,05). (ANOVA, pós-teste de Tukey).

Divisão celular nas glândulas adrenais avaliada usando o marcador Ki-67

O grupo pRP teve um número reduzido de células em divisão na zona glomerular em comparação com os grupos pC e pRC. Entre os grupos controle, o pC apresentou maior proliferação celular do que o npC. Na zona reticular, os grupos nutricionalmente restritos, npRC e npRP, apresentaram maior reatividade ao Ki-67 do que o grupo npC. Nas zonas reticular e medular, o grupo npRP apresentou maior número de células em divisão do que o grupo pRP (Figura 4).

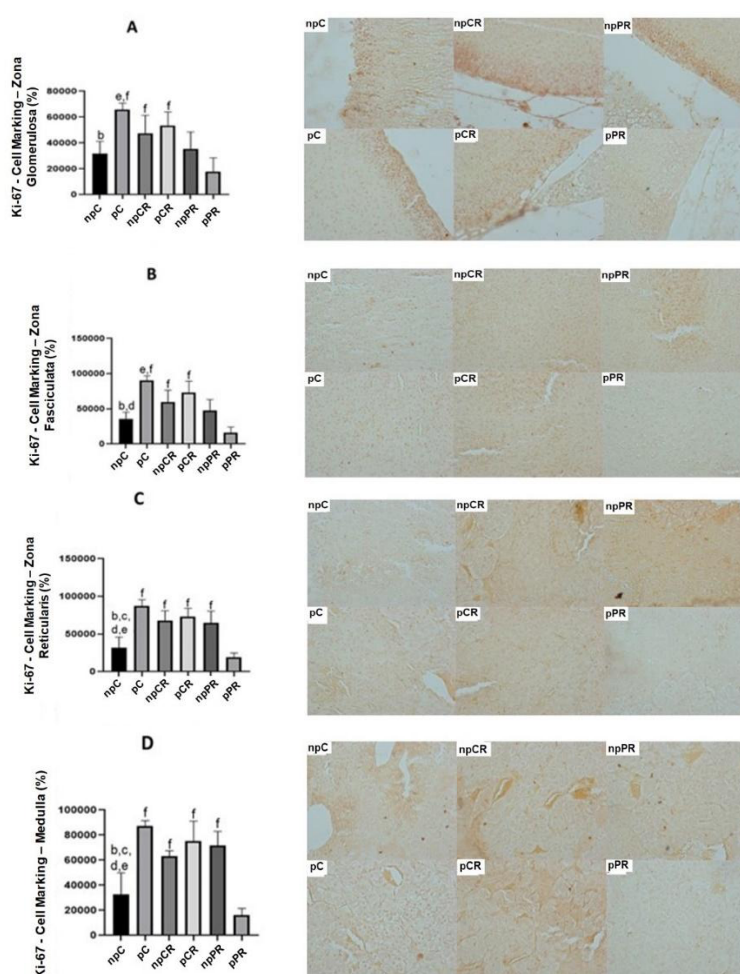


Figura 4. Imuno-histoquímica para níveis de antígeno Ki-67 (em porcentagem). Marcações de núcleo marrom escuro (marcações mais fortes) e marrom claro (marcações mais fracas) em suas respectivas áreas da glândula adrenal. Ampliação final – 200x. A) Zona glomerular. B) Zona fasciculada. C) Zona reticular, D) Zona medular. Média \pm DP (n = 5; p < 0,05). (ANOVA, pós-teste de Tukey).

Efeito das dietas em GRs nas glândulas adrenais

A zona glomerulosa (Figura 5A) do grupo npRC apresentou a menor expressão de GR em comparação com os grupos npC, pC e pRC. Os grupos npRP e pRP apresentaram menor quantidade de marcação para este receptor do que os grupos npC, pC e pRC. A expressão do receptor GR foi

menos marcada no grupo npRP do que no grupo npC . O grupo pRP apresentou mais RG na zona glomerulosa e fasciculada do que os grupos pC e pRC (Figura 5).

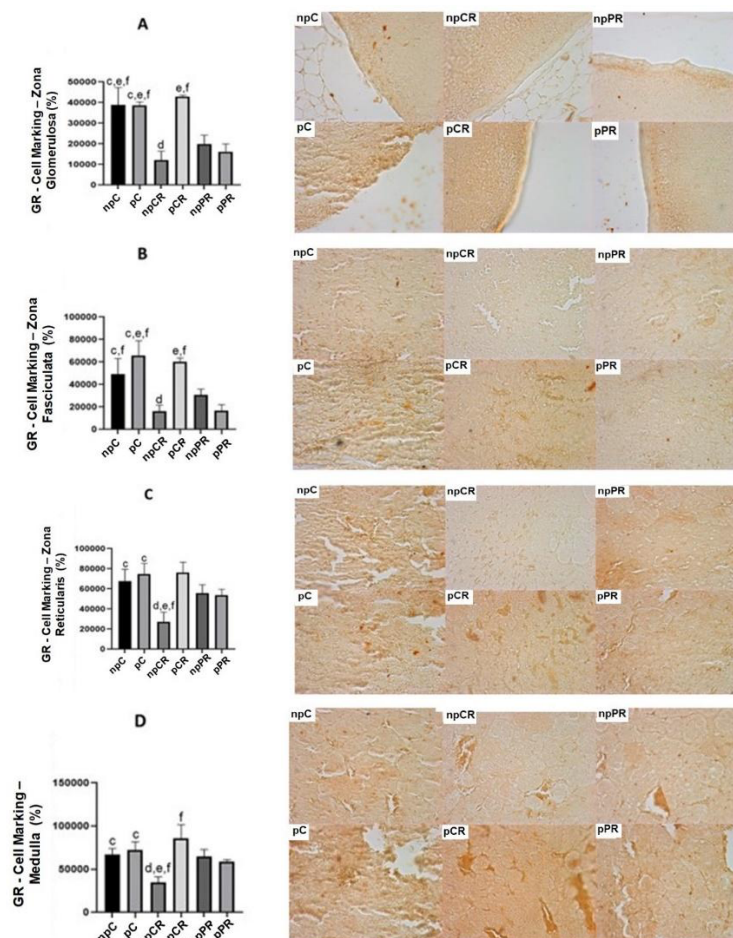


Figura 5. Imuno-histoquímica para receptor de glicocorticóide (GR) (em porcentagem). Marcações tanto no citoplasma quanto no núcleo: marrom escuro (marcações mais fortes) e marcas marrom claro (marcações mais fracas) em suas respectivas áreas da glândula adrenal. Ampliação final – 200x. A) Zona Glomerular. B) Zona fasciculada. C) Zona reticular. D) Zona medular. Média ± DP (n = 5; p < 0,05). (ANOVA, pós-teste de Tukey).

Efeito da dieta nos receptores de mineralocorticóides (MR) nas glândulas adrenais

Não houve diferença entre os grupos de controle nas quatro zonas da glândula adrenal. No entanto, o grupo pRC apresentou maior presença de marcações RM do que os outros cinco grupos. As zonas fasciculadas e reticuladas no grupo pRP mostraram menos receptores do que as do grupo npRP (Figura 6).

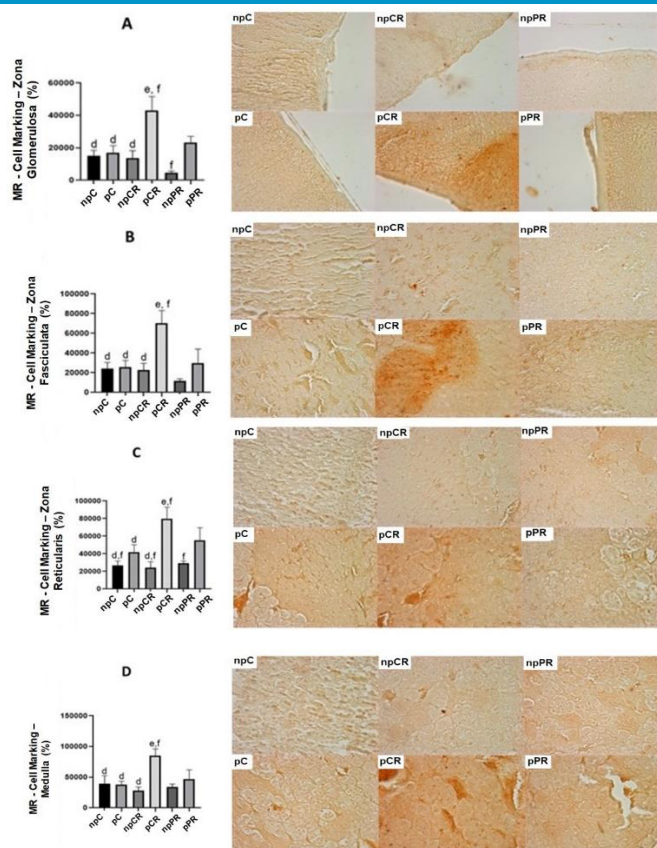


Figura 6. Imuno-histoquímica para receptor de mineralocorticoide (MR) (em porcentagem). Marcações no citoplasma e no núcleo; marrom escuro (marcações mais fortes) e marrom claro (marcações mais fracas) em suas respectivas áreas da glândula adrenal. Ampliação final – 200x. A) Zona glomerulosa. B) Zona fasciculada. C) Zona reticular. D) Zona medular. Média \pm DP (n = 5; p < 0,05). (ANOVA, pós-teste de Tukey).

Neste estudo, investigamos se RP e RC durante a gravidez poderiam modificar a morfologia da glândula adrenal, bem como a expressão de receptores de glicocorticóides e mineralocorticóides. Durante todo o período experimental, os animais apresentaram curvas ascendentes de massa corporal, indicando crescimento gestacional normal.

A RC foi validada pela menor ingestão alimentar do grupo pRC durante o período experimental. De acordo com a literatura, as mães submetidas à RC, além de terem filhos com menor peso ao nascer, também apresentam menor massa corporal durante a gravidez (BARKER, 2002). Outro achado que valida nosso estudo é a curva ascendente do grupo pC, o grupo de gestantes que mais ganhou massa durante a gestação. Uma dieta materna pobre em proteínas reduziu significativamente o ganho de peso durante a gravidez (COTTRELL *et al.*, 2012).

Vários estudos na literatura têm demonstrado que a massa da glândula adrenal é restrita, seja na prole ou nas mães, corroborando os dados encontrados neste estudo (ROSENBROCK *et al.*, 2005). HUSEBY *et al.* (1945) e BOUTWELL *et al.* (1948) mostraram que CR em ratos resultou em hipertrofia adrenal sem necessariamente aumentar o peso do rato (KRITCHEVSKY, 2001). Resultados contrários foram observados em outros estudos, nos quais foi observado um aumento da massa adrenal no RC materna de 50% durante a última semana de gravidez (ELEFTHERIADES; CREATSAS; NICOLAIDES, 2006) e uma menor massa adrenal foi observada (LIANG; ZHANG; ZHANG, 2004).

Não há estudos específicos sobre relações de massa adrenal/massa animal com restrição de calorias ou restrição de proteínas. Curiosamente, entre os grupos de gravidez com restrição nutricional, o grupo pRP apresentou uma relação massa adrenal/massa animal menor do que o grupo pRC. Em um estudo de restrição de sódio durante a gravidez, houve um aumento de 33% na

espessura da zona glomerulosa em ratos. A combinação de restrição dietética de sódio e gravidez causou um aumento de 167% na espessura da zona glomerulosa. Há uma relação direta entre o número de células e a largura da zona, indicando que a hiperplasia acompanha a hipertrofia da zona glomerulosa (POHANKA; PIKE, 1970), o que não foi observado neste estudo, e as áreas corticais e medulares não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Estudos futuros são necessários para se verificar a presença de hiperplasia em uma zona específica.

Na presença de inflamação ou dano tecidual, o colágeno tipo I está presente na remodelação do local danificado (GONZÁLEZ *et al.*, 2016). Para verificar se a restrição em conjunto com a gravidez resultaria em aumento da deposição de fibras colágenas na GA foi empregada a técnica de tricrômio de Mallory. Não foram observadas diferenças entre os grupos gestante e com restrição nutricional, o que confirma os dados anteriores sobre a ausência de alterações na espessura das áreas corticais e medulares. Somente na zona glomerulosa, o grupo npC apresentou maior deposição de fibras colágenas em relação aos grupos pRC. O cortisol é conhecido por ser responsável pela degradação de proteínas (SILVERTHOR, 2010). Notamos, mesmo que discretamente, que o grupo nRC apresentou menor quantidade de fibras colágenas nas áreas GA, o que pode indicar que o RC aumenta o estresse e consequentemente o cortisol.

O Ki-67 é expresso em núcleos celulares durante a proliferação (SUN; KAUFMAN, 2018), como uma forma do tecido reparar células danificadas ou atender às demandas do órgão. Sua expressão foi maior nos grupos com gestação sem restrição, com maior proliferação celular em todas as quatro áreas da glândula adrenal quando comparada às ratas não gestantes, corroborando os dados da literatura (POHANKA; PIKE, 1970).

Em relação à zona glomerular, observou-se que a gestação com alimentação controlada e com RC tiveram aumento da proliferação celular no GA em relação às não gestantes, sugerindo possível hiperplasia e hipertrofia nestes grupos. O inverso ocorreu na gestação com RP, que apresentou menor proliferação celular do que os grupos npRP. Apesar da literatura não relatar estudos específicos do KI-67 na RP, alguns estudos sobre a proliferação celular na RC podem explicar esse fenômeno. Estudos desse tipo indicaram uma redução na proliferação celular em queratinócitos, células hepáticas, células epiteliais mamárias, células T esplênicas e células prostáticas em 30 a 50% RC (BRUSS *et al.*, 2011; HSIEH *et al.*, 2004; LOK *et al.*, 1990), diminuição da proliferação de células basais na mucosa olfatória de camundongos (IWAMURA *et al.*, 2019), e diminuição da proliferação celular e aumento da morte celular apoptótica (DUNN *et al.*, 1997). O resultado oposto foi observado apenas em algumas áreas do cérebro, como aumento da neurogênese no giro denteado do hipocampo e na zona subventricular (KUMAR *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2013; IWAMURA *et al.*, 2019). Em estudos com ovelhas no último trimestre de gestação, o córtex adrenal mostrou figuras mitóticas dispersas ocasionais na zona glomerulosa (HILL *et al.*, 1984).

O único estudo que abordou os resultados da proliferação celular na GA foi conduzido com uma dieta pobre em sódio, onde foi observado um aumento nas células da zona glomerulosa juntamente com um aumento na secreção de aldosterona (ENNEN; LEVAY-YOUNG; ENGELAND, 2005). INOMATA e SASANO (2015) identificaram maior atividade mitótica no AG humano na região entre a zona glomerulosa e a zona fasciculada.

COLINA *et al.* (1984) observaram que animais submetidos a restrição nutricional, sem prenhez, apresentaram maior atividade proliferativa nas zonas reticular e medular em relação ao grupo npC, embora em animais alimentados com dieta normal não prenhe, a atividade mitótica estava ausente em todo o córtex adrenal. Esse achado indica que as dietas RC e RP podem aumentar o número de células nessas zonas GA.

Níveis elevados de Ki-67 e expressão de aldosterona circulante foram associados ao tratamento com antagonistas de MR em ratos hipertensos, o que foi observado por imunohistoquímica de células ZG. Isso sugere que quanto maior a demanda hormonal pelo organismo, mais as células se multiplicam para suprir os hormônios (PEREIRA *et al.*, 2021). Isso pode ter ocorrido nos grupos que apresentaram maior proliferação celular, principalmente no grupo pRC.

Os glicocorticóides sintetizados ou secretados podem desempenhar um papel importante na regulação direta da proliferação e função das células adrenocorticais em condições fisiológicas (SAITO *et al.*, 1979). A expressão de GR no córtex adrenal humano foi originalmente demonstrada por LOOSE *et al.* (1980) e posteriormente confirmado em investigações mais recentes (PAUST *et al.*, 2006; ASSER *et al.*, 2014). Em humanos, o GR é expresso no córtex adrenal com funções paralelas às encontradas em outros tecidos (BRIASSOULIS *et al.*, 2011; SPIGA *et al.*, 2017). Além de seu efeito na hipófise e no hipotálamo, o cortisol pode afetar sua própria síntese por meio de um mecanismo de *feedback* local dentro da glândula adrenal (GJERSTAD; LIGHTMAN; SPIGA, 2018). MR e GR estão presentes nas zonas glomerulosa, fasciculada e reticulada da GA em humanos (BOULKROUN *et al.*, 2010), e em camundongos com restrição de sódio/sem sódio foram altamente expressos em células ZG e ZF/ZR (CHONG *et al.*, 2017).

GR e receptores MR foram observados em ratos recém-nascidos cujas mães sofreram restrição alimentar de 50% durante uma semana de gestação. A restrição alimentar induz um atraso em crescimento intrauterino, interrompe o eixo HPA e diminui o peso adrenal, o que não foi observado neste estudo. Além disso, camundongos recém-nascidos mostraram uma redução no mRNA MR e GR no hipocampo, redução do mRNA do CRH nos núcleos paraventriculares do hipotálamo e redução do plasma níveis de hormônio adrenocorticotrófico (LÉONHARDT *et al.*, 2002). O mesmo foi observado no hipotálamo da prole com PR materna (BERTRAM *et al.*, 2001), o que confirmou nossos resultados para GR no grupo pRP, que foi menor do que no grupo pC. O inverso ocorreu nos níveis de expressão de GR mRNA, que foram significativamente maiores no rim, pulmão, fígado e hipocampo de filhotes fetais e neonatais no final da gestação (20 dias) e em filhotes de 12 semanas expostos a RP materno, sugerindo que esse aumento é persistente ao longo da vida (BERTRAM *et al.*, 2001). A marcação de RM mostrou que na zona glomerulosa e reticular, houve maior marcação no grupo pRP do que no grupo npRP, o que sugere que a gravidez influencia o aumento de RM, com os glicocorticóides ativando RM na maioria dos tecidos em níveis basais e o GR em estresse níveis (GOMEZ-SANCHEZ; GOMEZ-SANCHEZ, 2014).

Os tecidos adiposos adrenal, renal, hepático, pulmonar e perirenal, onde foi demonstrada a persistência de aumentos específicos de tecido em GR, tipo 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase. 1-11bHSD1 (que transforma a cortisona em cortisol) e o receptor da angiotensina II tipo 1 (AT1), foram observados aumento na expressão da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2-11bHSD2pa (que oxida o cortisol). Já nas adrenais e rins de recém-nascidos, em resposta a um período definido da restrição materna de nutrientes durante o início da gravidez, foi observado redução. Os autores inferiram que a expressão gênica é programada pela disponibilidade de nutrientes para o feto antes do nascimento (BERTRAM *et al.*, 2001). Isso pode explicar o grande aumento dos receptores MR e GR no grupo pRC; devido à restrição alimentar, houve maior produção de cortisol e estresse pela maior expressão de MR e GR.

Desnutrição em ratas prenhes causa uma diminuição na expressão de GR mRNA na GA devido ao estresse, o que aumenta a produção materna de corticosterona. Isso torna os tecidos mais sensíveis à concentração de corticosteróides. Isto por sua vez estimula a expressão de HSD11B1 em ratos (KHORRAM *et al.*, 2011) causando excesso de corticosterona no plasma materno e fetal, regulando negativamente GR e RM fetais e comprometendo o eixo de *feedback* HPA na infância e na idade adulta (VALSAMAKIS; CHROUSOS; MASTORAKOS, 2019). Embora os grupos não tenham sofrido desnutrição nas zonas glomerular, fasciculada e medular, o grupo pRC apresentou maior marcação para GR quando comparado ao grupo pRP, e o mesmo se repetiu para a coloração MR nas quatro zonas da GA. Os resultados sugerem que os grupos podem ter experimentado estresse de restrição, com o CR tendo um impacto nas ratas durante a gravidez em comparação com o RP. No entanto, os resultados foram diferentes dos encontrados na literatura, pois não houve regulação negativa dos receptores, pois os níveis de expressão de MR e GR foram maiores no grupo pRC.

A regulação negativa dos receptores foi notada pela marcação GR mais baixa no grupo npRC do que no grupo npC. Embora não existam estudos comparativos entre PR e CR na literatura,

apresentamos neste estudo que nas zonas reticular e medular, o grupo npRC teve marcações mais baixas para GR em comparação com o grupo npRP, e o oposto ocorreu na zona medular quando em comparação com os grupos de grávidas CR e os grupos PR. Os níveis de expressão de MR não foram afetados pela dieta materna nos rins da prole de PR materna e foram indetectáveis nos pulmões (BERTRAM *et al.*, 2001).

Em todos os GA, tanto GR quanto MR foram expressos mais em pRC do que em npRC, sugerindo que a gravidez é um estressor adicional porque em primatas grávidas, houve um aumento no cortisol materno (RECABARREN; VALENZUELA; SERON -FERRER, 1997). No entanto, em um estudo em ratos machos adultos com desnutrição perinatal, os níveis de expressão de mRNA de GR e MR e a capacidade de ligação ou afinidade não mostraram diferença entre os grupos no AG (DUTRIEZ-CASTELOOT *et al.*, 2008).

Na prole de hamsters grávidas, a taxa de esteroidogênese aumentou em ratas desnutridas (LIANG; ZHANG; ZHANG, 2004) e, embora não tenhamos medido o cortisol diretamente, os resultados do grupo de grávidas com RC mostraram um aumento no número de GR e RM receptores, aumento da proliferação celular e características indiretas para um aumento na produção de cortisol pelas células GA.

Tem sido sugerido que a secreção de aldosterona no rato ZG pode ser regulada por RM através de um *feedback* ultracurto dentro da glândula adrenal, onde a aldosterona regula sua própria produção, e porque pode ser ativada pelo mesmo hormônio, GR também pode regular a produção de glicocorticóides na ZF e ZR (CHONG *et al.*, 2017). Esse fenômeno pode explicar nossos resultados sobre o aumento do número de receptores que podem regular a produção de cortisol sem necessariamente aumentar o número de células para essa função.

No entanto, há discordância sobre se o *feedback* exercido pelos receptores MR/GR dentro da glândula adrenal é positivo ou negativo. A pesquisa *in vitro* com células H295R (uma linhagem de células adrenocorticais secretoras de cortisol humano) revelou a presença de uma alça de *feedback* positivo intra-adrenal que regula a produção de esteroides. Esses resultados foram confirmados quando o GR foi inativado pelo antagonista farmacológico RU486 ou *knockdown de GR* por siRNA, o que levou à supressão da esteroidogênese, sugerindo fortemente uma alça reguladora positiva autócrina ultracurta mediada por GR (ASSER *et al.*, 2014). Este tipo de *feedback* corresponde aos resultados dos grupos pRC, nos quais houve aumento dos receptores GR e MR em resposta ao estresse passado durante a gravidez e os períodos de RC.

CHONG *et al.* (2017) apontaram que essa regulação ocorre por *feedback* negativo porque MR e GR regulam negativamente a produção de glicocorticóides nas células ZF/ZR (*feedback* intra-adrenal – circuito curto). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a exposição prévia da glândula adrenal a glicocorticóides resulta em uma resposta diminuída ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), resultante de um *feedback* negativo intra-adrenal *que pode constituir um mecanismo adicional de controle regulado por GR para a esteroidogênese* (PERON *et al.*, 1960; CARSIA; MALAMED, 1979; CHONG *et al.*, 2017; GJERSTAD; LIGHTMAN; SPIGA, 2018). Isso pode justificar que mesmo com aumento da replicação celular, medidas aumentadas nas zonas adrenais em alguns grupos não são suficientes para aumentar a produção de cortisol, pois são reguladas por *feedback* intra-adrenal negativo por RM e GR.

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que RP e RC durante a gravidez não alteraram o peso das glândulas adrenais quando comparadas as fêmeas não grávidas. RC aumentou a expressão de receptores GR e MR em GA durante a prenhez, enquanto RP diminuiu a marcação de GR e MR na zona glomerulosa e fasciculada. Concluímos que a RC durante a gestação causou mais estresse às ratas, alterando a presença de RM e GR, o que pode sugerir uma alteração na funcionalidade do GA e, conseqüentemente, no eixo HPA.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Herminio Ometto pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- AL-REGAIEY, K.A. The effects of calorie restriction on aging: a brief review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2468-2473, 2016.
- ASSER, L. *et al.* Autocrine positive regulatory feedback of glucocorticoid secretion: glucocorticoid receptor directly impacts h295r human adrenocortical cell function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 395, n. 1-2, p. 1-9, 2014.
- BAGHERNIYA, M. *et al.* The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: a review of the literature. **Ageing Research Reviews**, v. 47, n. 1, p. 183-197, 2018.
- BARKER, D.J. Fetal programming of coronary heart disease. **Cell Press**, v. 13, n. 9, p. 364-368, 2002.
- BELL, R.C. *et al.* Natural killer cell activity and tumorigenesis in animals fed low protein diets. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 4, p. A1043, 1990.
- BERTRAM, C. *et al.* The Maternal Diet during Pregnancy Programs Altered Expression of the Glucocorticoid Receptor and Type 2 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. **Endocrinology**, v. 142, n. 7, p. 2841-2853, 2001.
- BOULKROUN, S. *et al.* Adrenal Cortex Remodeling and Functional Zona Glomerulosa Hyperplasia in Primary Aldosteronism. **Hypertension**, v. 56, n. 5, p. 885-892, 2010.
- BOUTWELL, B.K.; BRUSH, M.K.; RUSCH, H.P. Some physiological effects associated with chronic caloric restriction. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 154, n. 3, p. 517-524, 1948.
- BRIASSOULIS, G. *et al.* The Glucocorticoid Receptor and its Expression in the Anterior Pituitary and the Adrenal Cortex: a source of variation in hypothalamic-pituitary-adrenal axis function; implications for pituitary and adrenal tumors. **Endocrine Practice**, v. 17, n. 6, p. 941-948, 2011.
- BRUSS, M.D. *et al.* The effects of physiological adaptations to calorie restriction on global cell proliferation rates. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism** v. 300, n. 4, p. 735-745, 2011.
- CARSIA, R.V.; MALAMED, S. Acute Self-Suppression of Corticosteroidogenesis in Isolated Adrenocortical Cells. **Endocrinology**, v. 105, n. 4, p. 911-914, 1979.
- CHANGO, A.; POGRIBNY, I. (2015) Considering Maternal Dietary Modulators for Epigenetic Regulation and Programming of the Fetal Epigenome. **Nutrients**, v. 7, n. 4, p. 2748-2770, 2015.

CHONG, C. *et al.* Regulation of aldosterone secretion by mineralocorticoid receptor–mediated signaling. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 3, p. 525-534, 2017.

COTTRELL, E.C. *et al.* Reconciling the nutritional and glucocorticoid hypotheses of fetal programming. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 5, p. 1866-1874, 2012.

DUNN, T.B. Normal and Pathologic Anatomy of the Adrenal Gland of the Mouse, Including Neoplasms. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 44, n. 6, p. 1323-1389, 1970.

DUTRIEZ-CASTELOOT, I. *et al.* Tissue-specific Programming Expression of Glucocorticoid Receptors and 11 β -HSDs by Maternal Perinatal Undernutrition in the HPA Axis of Adult Male Rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 40, n. 4, p. 257-261, 2008.

ELEFThERIADES, M.; CREATSAS, G.; NICOLAIDES, K. Fetal Growth Restriction and Postnatal Development. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1092, n. 1, p. 319-330, 2006.

ENNEN, W.B.; LEVAY-YOUNG, B.K.; ENGELAND, W.C. Zone-specific cell proliferation during adrenocortical regeneration after enucleation in rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 5, p. 883-891, 2005.

GAO, H.; YALLAMPALLI, U.; YALLAMPALLI, C. Protein Restriction to Pregnant Rats Increases the Plasma Levels of Angiotensin II and Expression of Angiotensin II Receptors in Uterine Arteries. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 3, p. 1-8, 2012.

GIANCHINI, F.R.C. *et al.* Maternal diabetes affects specific extracellular matrix components during placentation. **Journal of Anatomy**, v. 212, n. 1, p. 31-41, 2007.

GJERSTAD, J.K.; LIGHTMAN, S.L.; SPIGA, F. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 403-416, 2018.

GOMEZ-SANCHEZ, E.; GOMEZ-SANCHEZ, C.E. The Multifaceted Mineralocorticoid Receptor. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 3, p. 965-994, 2014.

GONZÁLEZ, A.C.O. *et al.* Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614-620, 2016.

HARDY, R.; COOPER, M.S. Adrenal gland and bone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 503, n. 1, p. 137-145, 2010.

HAWRYLEWICZ, E.J. *et al.* Enhancement of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) mammary tumorigenesis by high dietary protein in rats. **Nutrition Reports International**, v. 26, n. 5, p. 793-806, 1982.

HILL, P.A. *et al.* Functional and morphologic studies of the adrenal cortex and kidney in ovine toxemia of pregnancy. **The Journal of Pathology**, v. 144, n. 1, p. 1-13, 1984.

HSIEH, E.A. *et al.* Dynamics of Keratinocytes in Vivo using $2\text{H}_2\text{O}$ Labeling: a sensitive marker of epidermal proliferation state. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 123, n. 3, p. 530-536, 2004.

HUSEBY, R.A.; BALL, Z.B.; VISSCHER, M.B. Further observations on the influence of simple caloric restriction on mammary cancer incidence and related phenomena in C3H mice. **American Association for Cancer Research**, v. 5, n. 1, p. 40-46, 1945.

INOMATA, A.; SASANO, H. (2015) Practical approaches for evaluating adrenal toxicity in nonclinical safety assessment. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 28, n. 3, p. 125-132, 2015.

IWAMURA, H. *et al.* Caloric restriction reduces basal cell proliferation and results in the deterioration of neuroepithelial regeneration following olfactotoxic mucosal damage in mouse olfactory mucosa. **Cell and Tissue Research**, v. 378, n. 2, p. 175-193, 2019.

JOSE, D.G.; GOOD, R.A. Quantitative effects of nutritional essential amino acid deficiency upon immune responses to tumors in mice. **Journal of Experimental Medicine** 137(1): 1-9, 1973.

KANCZKOWSKI, W.; SUE, M.; BORNSTEIN, S.R. (2017) The adrenal gland microenvironment in health, disease and during regeneration. **Hormones**, v. 13, n. 3, p. 251-265, 2017.

KHORRAM, N.M. *et al.* Maternal Undernutrition Programs Offspring Adrenal Expression of Steroidogenic Enzymes. **Reproductive Sciences**, v. 18, n. 10, p. 931-940, 2011.

KING, J.C. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 5, p. 1218-1225, 2000.

KRIEGER, E.; YOUNGMAN, L.D.; CAMPBELL, T.C. The modulation of aflatoxin B1 (AFB1)-induced preneoplastic lesions by dietary protein and voluntary exercise in Fischer 344 rats. **The Faseb Journal** v. 2, n. 4, p. 3304, 1988.

KRITCHEVSKY, D. Caloric Restriction and Cancer. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 47, n. 1, p. 13-19, 2001.

KUMAR, S. *et al.* Interactive effect of excitotoxic injury and dietary restriction on neurogenesis and neurotrophic factors in adult male rat brain. **Neuroscience Research**, v. 65, n. 4, p. 367-374, 2009.

LAMMI-KEEFE, C.J.; SWAN, P.B.; HEGARTY, P.V. Effect of Level of Dietary Protein and Total or Partial Starvation on Catalase and Superoxide Dismutase Activity in Cardiac and Skeletal Muscles in Young Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 114, n. 12, p. 2235-2240, 1984.

LANDINI, G.; MARTINELLI, G.; PICCININI, F. Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging. **Bioinformatics**, v. 37, n. 10, p. 1485-1487, 2020.

LAPERLE, K.M.D.; DINTZIS, S.M. **Endocrine System. Comparative Anatomy and Histology.** Elsevier, Netherlands, 2018.

LÉONHARDT, M. *et al.* Perinatal Maternal Food Restriction Induces Alterations in Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Activity and in Plasma Corticosterone-Binding Globulin Capacity of Weaning Rat Pups. **Neuroendocrinology**, v. 75, n. 1, p. 45-54, 2002.

LIANG, H.; ZHANG, J.; ZHANG, Z. Food restriction in pregnant rat-like hamsters (*Cricetulus triton*) affects endocrine, immune function and odor attractiveness of male offspring. **Physiology and Behavior**, v. 82, n. 2-3, p. 453-458, 2004.

LOK, E. *et al.* Calorie restriction and cellular proliferation in various tissues of the female Swiss Webster mouse. **Cancer Letters**, v. 51, n. 1, p. 67-73, 1990.

LOOSE, D.S. *et al.* Demonstration of Glucocorticoid Receptors in the Adrenal Cortex: evidence for a direct dexamethasone suppressive effect on the rat adrenal gland. **Endocrinology**, v. 107, n. 1, p. 137-146, 1980.

MIRZAEI, H.; RAYNES, R.; LONGO, V.D. The conserved role of protein restriction in aging and disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 19, n. 1, p. 74-79, 2016.

PARK, J.H. *et al.* Calorie restriction alleviates the age-related decrease in neural progenitor cell division in the aging brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 12, p. 1987-1993, 2013.

PAUST, H.J. *et al.* Expression of the Glucocorticoid Receptor in the Human Adrenal Cortex. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 114, n. 1, p. 6-10, 2006.

PEREIRA, S.S. *et al.* Mineralocorticoid Receptor Antagonists Eplerenone and Spironolactone Modify Adrenal Cortex Morphology and Physiology. **Biomedicines**, v. 9, n. 4, p. A441, 2021.

PÉRON, F.G. *et al.* Studies on the possible inhibitory effect of corticosterone on corticosteroidogenesis at the adrenal level in the rat. **Endocrinology**, v. 67, n. 3, p. 379-388, 1960.

POHANK, D.G.; PIKE, R.L. Effects of dietary sodium restriction during pregnancy on the histochemistry of the rat zona glomerulosa. **Experimental Biology and Medicine**, v. 133, n. 1, p. 246-251, 1970.

RECARBARREN, M.P.; VALENZUELA, G.J.; SERON-FERRER, M. Protein-caloric restriction during pregnancy affects the adrenal-placental axis and decreases newborn weight in a primate, the *Cebus apella*. **Prenatal and Neonatal Medicine**, v. 3, n. 3, p. 309-313, 1997.

ROSENBROCK, H. *et al.* Effect of chronic intermittent restraint stress on hippocampal expression of marker proteins for synaptic plasticity and progenitor cell proliferation in rats. **Brain Research**, v. 1040, n. 1-2, p. 55-63, 2005.

SAITO, E. *et al.* Inhibitory Effects of Corticosterone on Cell Proliferation and Steroidogenesis in the Mouse Adrenal Tumor Cell Line Y-1. **Endocrinology** v. 104, n. 2, p. 487-492, 1979.

SILVERTHORN, D.U. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SPIGA, F. *et al.* Dynamic responses of the adrenal steroidogenic regulatory network. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 31, p. 1-9, 2017.

TERPSTRA, A.H.M.; HARKES, L.; VAN DER VEEN, F.H. The effect of different proportions of casein in semipurified diets on the concentration of serum cholesterol and the lipoprotein composition in rabbits. **Lipids**, v. 16, n. 2, p. 114-119, 1981.

THIELE K, DIAO L, ARCK PC (2017) Immunometabolism, pregnancy, and nutrition. **Seminars in Immunopathology**, v. 40, n. 2, p. 157-174, 2017

VALSAMAKIS, G.; CHROUSOS, G.; MASTORAKOS, G. Stress, female reproduction and pregnancy. **Psychoneuroendocrinology**, v. 100, n. 1, p. 48-57, 2019.

YOUNGMAN, L.D. **Recall, memory, persistence, and the sequential modulation of preneoplastic lesion development by dietary protein**. New York: Cornell University Press, 1997.

YOUNGMAN, L.D. Protein restriction (PR) and caloric restriction (CR) compared: effects on DNA damage, carcinogenesis, and oxidative damage. **Mutation Research**, v. 295, n. 4-, p. 165-179, 1993.

YOUNGMAN, L.D.; CAMPBELL, T.C. The sustained development of preneoplastic lesions depends on high protein intake. **Nutrition and Cancer**, v. 18, n. 2, p. 131-142, 1992.

YOUNGMAN, L.D.; PARK, J.Y.; AMES, B.N. Protein oxidation associated with aging is reduced by dietary restriction of protein or calories. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 19, p. 9112-9116, 1992.

Publicado em 11/09/2023.