



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

Dayse Gomes Corrêa de Almeida

**Ambiente enriquecido na prevenção dos prejuízos  
comportamentais e endócrinos no modelo de  
hiperleptinemia neonatal**

Rio de Janeiro  
2014

Dayse Gomes Corrêa de Almeida

**Ambiente enriquecido na prevenção dos prejuízos comportamentais e endócrinos no modelo de hiperleptinemia neonatal**

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

Orientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Mabel Carneiro Fraga

Rio de Janeiro

2014

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

A447 Almeida, Dayse Gomes Corrêa de.

Ambiente enriquecido na prevenção dos prejuízos comportamentais e endócrinos no modelo de hiperleptinemia neonatal. / Dayse Gomes Corrêa de Almeida. - 2014.  
137 f.

Orientador: Egberto Gaspar de Moura  
Coorientadora: Mabel Carneiro Fraga

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas, Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Leptina – Metabolismo - Teses. 2. Lactação - Teses. 3. Obesidade - Teses. 4. Sistema cardiovascular - Doenças - Teses. 5. Ansiedade - Teses. I. Moura, Egberto Gaspar de. II. Fraga, Mabel Carneiro III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 612.43

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

---

Assinatura

---

Data

Dayse Gomes Corrêa de Almeida

**Ambiente enriquecido na prevenção dos prejuízos comportamentais e  
endócrinos no modelo de hiperleptinemia neonatal**

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

Aprovada em 15 de dezembro de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Mabel Carneiro Fraga  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Patricia Pelufo Silveira  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Yael Abreu Villaça  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Ricardo Reis  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

## DEDICATÓRIA

A Deus pelo seu infinito amor e misericórdia, que nunca me desamparou, pai eterno e melhor amigo. E a minha família, pelo apoio sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Egberto Gaspar de Moura, por servir de exemplo, para pesquisadores iniciantes e antigos. Meu agradecimento pela oportunidade de aprender um pouco ao seu lado, e ter me aceitado como sua aluna, sem antes me conhecer.

A Mabel Fraga, minha professora, que me acompanha desde a graduação, e é responsável por boa parte da minha formação acadêmica e profissional. Agradeço pela oportunidade de aprender mais um pouco ao seu lado.

A Professora Patrícia Lisboa, sempre atenta em todas as etapas de elaboração deste trabalho, mesmo não sendo orientadora oficialmente. Pela atenção dedicada a mim e pela sua disponibilidade, sempre. Obrigada por tudo!!

A Professora Elaine pela ajuda sempre que possível.

A Viviane Younes, que bem de perto acompanhou e contribui muito para minha formação acadêmica.

A todos os alunos e ex-alunos de pós-graduação do laboratório de Fisiologia Endócrina, Nathália, Lígia, Nayara, Janaíne, Deysla, Mariana, Xu, Patrícia, Ellen, Fernanda, Jéssica, Ana, que de maneira direta ou indireta contribuíram para conclusão deste trabalho.

Aos professores do laboratório de Neurofisiologia, Alex, Cláudio e Yaell que disponibilizaram seu espaço físico e material para realização dos testes comportamentais apresentados neste trabalho. E em especial ao professor Alex, por disponibilizar o programa adequado para avaliação dos testes.

Aos alunos de iniciação científica, indispensáveis à realização deste trabalho, Lizandra, Aline, Mariana, Mylena e Victor.

Aos funcionários e técnicos.

Ao bioterista Ulisses, pelo cuidado com os animais e organização do biotério.

A Marilene e Dionízio, meus pais, que me ensinaram muito, amor, força, dedicação, trabalho, seriedade.

A minha irmã Dayane e meu cunhado Fábio pelas palavras de incentivo e companheirismo.

Ao meu marido e eterno namorado, Fernando Almeida, pela cumplicidade sempre. Por ter sido meu porto seguro, em tantos momentos difíceis!

Aos meus amigos, que continuam sendo amigos, mesmo com a minha ausência. Obrigada pela paciência de vocês! Quem tem os amigos tem tesouros nessa terra. Amo vocês!

Aos meus pastores que sempre tiveram uma palavra de Deus para consolar meu coração.

A Deus, pela oportunidade de passar por mais uma fase, e cumprir mais uma etapa de um sonho.

Ouçã também, o sábio e cresça em ciência, e o entendido adquira habilidade, para entender provérbios e parábolas, as palavras dos sábios e seus enigmas. O temor do Senhor é o princípio do conhecimento, mas os insensatos desprezam a sabedoria e a instrução.

*Provérbios 1.5:7*



## RESUMO

ALMEIDA, Dayse Gomes Corrêa de. *Ambiente enriquecido na prevenção dos prejuízos comportamentais e endócrinos no modelo de hiperleptinemia neonatal*. 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Há uma associação importante entre alterações em parâmetros nutricionais, hormonais ou ambientais no início da vida (gestação e lactação) e o surgimento de doenças crônicas na vida adulta tais como doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, ansiedade e depressão. Previamente demonstramos que ratos tratados com injeções de leptina (8µg/100g, dia, sc) nos 10 primeiros dias de lactação apresentaram aumento da ansiedade e da atividade exploratória, hiperleptinemia, sobrepeso, resistência a leptina, hiperinsulinemia, hipercorticosteronemia e hipertrigliceridemia quando adultos. Propomos então investigar, através de estudo longitudinal, as alterações comportamentais e endócrino-metabólicas ocasionadas pela programação pela hiperleptinemia nos 10 primeiros dias de vida e avaliar se estas alterações podem ser prevenidas pela exposição ao ambiente enriquecido durante a adolescência. Inicialmente foram obtidos 2 grupos experimentais que foram tratados durante os 10 primeiros dias da lactação (PN1-PN10) com: salina (50 µL, dia, sc) ou leptina (8µg/100g, dia, sc). Em PN30, parte das ninhadas foi alocada em novas condições de habitação (gaiola de ambiente enriquecido), enquanto outra parte permaneceu em gaiola padrão. As ninhadas foram subdivididas em 4 grupos: 1) Grupo C: exposto a salina no período neonatal; 2) Grupo L: exposto a leptina no período neonatal; 3) Grupo CAE: exposto a salina no período neonatal e ao ambiente enriquecido na adolescência (PN30 – PN45); 4) Grupo LAE: exposto a leptina no período neonatal e ao ambiente enriquecido na adolescência. Avaliamos o perfil endócrino-metabólico e os comportamentos associados à ansiedade e à busca pela novidade através do labirinto em cruz elevado (LCE) e campo vazado (CV), respectivamente, antes e após a exposição ao ambiente enriquecido. Em relação aos níveis de ansiedade, foi observado inicialmente um efeito ansiolítico da leptina em PN21 e PN30 o qual foi perdido ao longo do desenvolvimento, e contraditoriamente resultou em maior ansiedade em PN150. Foi observado aumento da atividade exploratória em PN30 e PN150. Os prejuízos comportamentais na idade adulta foram acompanhados disfunções endócrino-metabólicas, como: hiperleptinemia, sobrepeso, resistência a leptina, hipertrigliceridemia, hipercorticosteronemia e aumento de T4 livre, os quais foram prevenidos pela exposição ao ambiente enriquecido durante a adolescência. Assim, evidenciamos que a exposição ao ambiente enriquecido por 15 dias no período da adolescência, se mostrou uma estratégia de tratamento não-farmacológica promissora na prevenção de alterações comportamentais e endócrino-metabólicas a longo prazo induzidas pela hiperleptinemia neonatal.

Palavras-chave: Hiperleptinemia. Programação. Ansiedade. Busca pela novidade. Ambiente enriquecido. Ratos.

## ABSTRACT

ALMEIDA, Dayse Gomes Corrêa de. *Enriched environment in the prevention of behavioral and endocrine damage in the neonatal hyperleptinaemia model*. 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

There is an important association between nutritional, hormonal and environmental parameters during early life (pregnancy and lactation periods) and development of chronic diseases during adult life such as: cardiovascular diseases, obesity, diabetes, anxiety and depression. Previously we demonstrated that rats treated with leptin injections (8µg/100g/day, sc) during the first 10 days of lactation presented increase of anxiety, exploratory activity, hyperleptinemia, overweight, leptin resistance, hyperinsulemia, hypercorticosteronemia and hypertriglyceridemia at adulthood. We propose to investigate, through longitudinal study, behavioral and metabolic-endocrine programming caused by hyperleptinemia exposure during the first 10 days of lactation and evaluate if these changes can be prevented by exposure to enriched environment during adolescence period. Initially were obtained 2 experimental groups treated during the first 10 days of lactation (PN1-PN10) with: Saline (50µL/day, sc) or leptin (8µg/100g/day, sc). At PN30, some litters were allocated at new environment conditions (enriched environment cage), while other litters remained in a standard cage. Litters were subdivided into 4 groups: 1) C Group: Neonatal exposure to saline; 2) L Group: Neonatal exposure to leptin; 3) CEE Group: Neonatal exposure to saline and adolescent exposure to an enriched environment (PN30-PN45); 4) LEE Group: Neonatal exposure to leptin and adolescent exposure to an enriched environment. We evaluated the metabolic endocrine profile as well as anxiety-like and novelty-seeking behaviors using Elevated Plus Maze (EPM) and Hole Board (HB), respectively, before and after to enriched environment exposure. Regarding anxiety, it was initially observed an anxiolytic effect of leptin on PN21 and PN30, which was lost during development and contradictorily resulted in higher anxiety on PN150. Was observed a higher exploratory activity in PN30 and PN150. Behavioral disorders in adulthood were accompanied by metabolic-endocrine dysfunction, such as: hyperleptinemia, overweight, leptin resistance, hypertriglyceridemia, hypercorticosteronemia and increase of free T4, which were prevented by enriched environment exposure during adolescence. Therefore, it was demonstrated that enriched environment exposure for 15 days during adolescence, showed itself a promising non-farmacologic treatment strategy in prevention of long-lasting behavioral and metabolic endocrine disorders induced by neonatal hyperleptinemia.

Keywords: Hyperleptinemia. Programming. Anxiety. Novelty-seeking. Enriched environment. Rats.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de sinalização da leptina no hipotálamo.....	23
Figura 2 – Neurônios hipotalâmicos responsivos à leptina, NPY e $\alpha$ -MSH .....	26
Figura 3 – Vista de uma das gaiolas de Ambiente Enriquecido.....	48
Figura 4 – Vista superior do labirinto em cruz elevado.....	49
Figura 5 – Vista superior do campo vazado.....	50
Figura 6 – Animal sendo analisado no aparelho Lunar DXA 200368 .....	52

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Evolução da massa corporal do primeiro dia pós-natal (PN0 até PN150.....	57
Gráfico 2 –	MGV em PN10, PN21, PN30, PN45, PN75 e PN150.....	58
Gráfico 3 –	Massa corporal e adiposidade da prole aos 21 dias.....	59
Gráfico 4 –	Massa corporal e adiposidade da prole aos 45 dias.....	60
Gráfico 5 –	Massa corporal e adiposidade da prole aos 150 dias.....	61
Gráfico 6 –	Leptinemia em PN10.....	62
Gráfico 7 –	Leptinemia em PN21.....	62
Gráfico 8 –	Leptinemia em PN30.....	63
Gráfico 9 –	Leptinemia em PN45.....	63
Gráfico 10 –	Leptinemia em PN75 .....	64
Gráfico 11 –	Leptinemia em PN150.....	65
Gráfico 12 –	Corticosteronemia em PN10, PN21 e PN30.....	65
Gráfico 13 –	Corticosteronemia em PN45.....	66
Gráfico 14 –	Corticosteronemia em PN75.....	66
Gráfico 15 –	Corticosteronemia em PN150.....	67
Gráfico 16 –	Concentrações plasmáticas de T3 Total em PN30, PN45, PN75 e PN150.....	68
Gráfico 17 –	Concentrações plasmáticas de T4 livre em PN30, PN45, PN75 e PN150.....	69
Gráfico 18 –	Ansiedade avaliada no LCE em PN21.....	75
Gráfico 19 –	Tomada de decisão avaliada no LCE em PN21.....	76
Gráfico 20 –	Ansiedade avaliada no LCE em PN30.....	77
Gráfico 21 –	Tomada de decisão avaliada no LCE em PN30.....	78
Gráfico 22 –	Ansiedade avaliada no LCE em PN45.....	79
Gráfico 23 –	Tomada de decisão avaliada no LCE em PN45.....	80
Gráfico 24 –	Ansiedade avaliada no LCE em PN75.....	82
Gráfico 25 –	Tomada de decisão avaliada no LCE em PN75.....	83
Gráfico 26 –	Ansiedade avaliada no LCE em PN150.....	84
Gráfico 27 –	Tomada de decisão avaliada no LCE em PN150.....	85

Gráfico 28 – Atividade exploratória no CV em PN21.....	86
Gráfico 29 – Atividade exploratória no CV em PN30.....	87
Gráfico 30 – Atividade exploratória no CV em PN45.....	88
Gráfico 31 – Atividade exploratória no CV em PN75.....	88
Gráfico 32 – Atividade exploratória no CV em PN150.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Localização e expressão do receptor de leptina no cérebro .....	22
Tabela 2 – Perfil lipídico, a glicemia de jejum, e a insulinemia nas diferentes idades.....	70
Tabela 3 – Efeito da idade nas variáveis medidas no labirinto em cruz elevado.....	72
Tabela 4 – Efeito do tratamento nas variáveis medidas no labirinto em cruz elevado.....	73
Tabela 5 - Interação (Idade e Tratamento) nas variáveis medidas no labirinto em cruz elevado.....	73
Tabela 6 – Efeito da idade, do tratamento e interação na variável medida no campo vazado.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

“Rs”	<i>Redução, Refinamento e Substituição</i>
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AE	Ambiente Enriquecido
AgRP	Proteína agouti
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
A $\beta$	Peptídeo beta-amilóide
BA	Braço aberto
BF	Braço Fechado
C	Grupo Controle
CA1	Neurônios hipocampais
CAE	Grupo Controle Ambiente Enriquecido
CART	Fator de transcrição celular regulado por cocaína e anfetamina
CCK1	Receptores da Colecistoquinina tipo 1
CN	Centro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
CV	Campo vazado
<i>db/db</i>	Camundongos com deleção do gene <i>lepr</i>
DMN	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DXA	Dual-energy X-ray absorptiometry
Elisa	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GDS	<i>Godelieve Deny' Strof</i>
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HHT	Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
i.c.v	Intracerebroventricular
IMC	Índice de Massa Corporal
JAK	Janus-kinase

L	Grupo Leptina
LAE	Grupo Leptina Ambiente Enriquecido
LCE	Labirinto em cruz elevado
<i>Lepr</i>	Gene do receptor de leptina
LHA	Hipotálamo lateral
LTP	Potenciação de longa duração
MCH	Hormônio concentrador de melanina
MGV	Massa de Gordura Visceral
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MSH	Hormônio estimulador de alfa-melanócito
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPY	Neuropeptídeo Y
<i>Ob</i>	Gene da obesidade (leptina)
<i>ob/ob</i>	Camundongos com deleção do gene <i>ob</i>
ObR	Receptor de leptina
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORX	Orexinas
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinase
POMC	Pró-ópiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RIE	Radioimunoensaio
RNAi	Ácido ribonucleico de interferência
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SHR	Ratos Espontaneamente hipertensos
SM	Síndrome metabólica
SN	Sistema nervosa
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
SOCS	Supressores de sinalização de citocinas
STAT	Proteína do sinal de transdução e transcrição
TDAH	Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Tireotrofina
VMN	Núcleo ventromedial do hipotálamo



$\alpha$ MSH

Hormônio estimulador de alfa-melanócito

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	44
1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	44
2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	45
2.1	<b>Modelo experimental</b> .....	45
2.2	<b>Ambiente enriquecido</b> .....	47
2.3	<b>Testes comportamentais</b> .....	48
2.3.1	<u>Labirinto em cruz elevado (LCE)</u> .....	49
2.3.2	<u>Campo vazado (CV)</u> .....	50
2.4	<b>Análise da massa e composição corporal</b> .....	51
2.4.1	<u>Peso corporal</u> .....	51
2.4.2	<u>DXA</u> .....	51
2.4.3	<u>Massa de gordura visceral (MGV)</u> .....	52
2.5	<b>Dosagens plasmáticas</b> .....	52
2.5.1	<u>Glicemia</u> .....	53
2.5.2	<u>Leptina</u> .....	53
2.5.3	<u>Corticosterona</u> .....	53
2.5.4	<u>Hormônios tireoidianos</u> .....	53
2.5.5	<u>Insulina</u> .....	54
2.5.6	<u>Perfil lipídico</u> .....	54
2.6	<b>Análise estatística</b> .....	54
2.6.1	<u>Composição corporal e análises plasmáticas</u> .....	54
2.6.2	<u>Comportamento</u> .....	55
3	<b>RESULTADOS</b> .....	57
3.1	<b>Peso corporal e composição corporal</b> .....	57
3.1.1	<u>Evolução da massa corporal</u> .....	57
3.1.2	<u>Massa de tecido adiposo</u> .....	58
3.1.3	<u>DXA</u> .....	59
3.2	<b>Avaliações plasmáticas</b> .....	62
3.2.1	<u>Leptina</u> .....	62

3.2.2	<u>Corticoesterona</u> .....	65
3.2.3	<u>Concentrações plasmáticas de T3 total</u> .....	67
3.2.4	<u>Concentrações de T4 livre</u> .....	68
3.2.5	<u>Perfil lipídico, glicemia e insulinemia</u> .....	70
3.3	<b>Resultados comportamentais</b> .....	72
3.3.1	<u>Labirinto em cruz elevado (LCE)</u> .....	72
3.3.2	<u>Campo vazado (CV)</u> .....	85
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	90
4.1	<b>Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a massa e composição corporal</b> .....	91
4.2	<b>Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a ansiedade</b> .....	92
4.3	<b>Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a tomada de decisão</b> .....	96
4.4	<b>Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a atividade locomotora</b> .....	97
4.5	<b>Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a atividade exploratória</b> .....	98
4.6	<b>Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a leptinemia</b> .....	100
4.7	<b>Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a corticosteronemia</b> .....	101
4.8	<b>Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre os hormônios tireoidianos</b> .....	103
4.9	<b>Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre o perfil lipídico, glicemia de jejum e insulinemia</b> .....	103
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	105
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	106

## INTRODUÇÃO

### Obesidade

A obesidade é altamente prevalente, sendo um sério problema sócio-econômico. Os índices de obesidade têm crescido em diversos países, inclusive no Brasil, tanto em crianças como em adultos (Lopes et al., 2010). Nos Estados Unidos, por exemplo, 64% dos adultos estão acima do peso e 33% desses adultos são obesos. Em 2010, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) publicou dados de uma pesquisa realizada em 2008/2009, onde confirma-se que uma em cada três crianças de 5 a 9 anos estavam acima do peso recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A parcela dos meninos e adolescentes de 10 a 19 anos de idade com excesso de peso passou de 3,7% (1974-75) para 21,7% (2008-09), já entre as meninas e moças o excesso de peso foi de 7,6% para 19,4%.

A obesidade, em muitos casos, é caracterizada por uma ingestão calórica excessiva (Berger et al., 2014). Em seres humanos, a gordura é armazenada nos dois principais depósitos, tecido subcutâneo e tecido visceral (Sacks e Fain, 2007). Segundo Rush e Simmons (2014), o acúmulo de gordura além de alterar o tamanho do corpo, pode alterar a estrutura e o funcionamento de órgãos e tecidos.

A absorptometria radiológica de dupla energia (DXA) é um método bem estabelecido, com acurácia e reprodutibilidade válida para estimar a gordura corporal, porém, é uma técnica que necessita de elevado custo operacional e técnicos especializados (Eiholzer et al., 2000). Além do DXA também é utilizado a impedância bioelétrica (Rom et al., 2014), ou mesmo a pesagem subaquática (Sparks et al., 2014). Porém na prática clínica, poucas são as medidas para determinar a obesidade de forma precisa (Rush e Simmons, 2014). Um dos parâmetros muito utilizados na prática clínica com seres humanos, para classificar a obesidade é o IMC (Peso em kg / Altura em m<sup>2</sup>) (Farias et al., 2014). Porém estudos apontam para perda da sensibilidade de alguns métodos indiretos, devido a presença, por exemplo, da massa muscular (Page et al., 2009). Dentre as técnicas utilizadas para mensurar a composição corporal (medidas antropométricas), tem-se a circunferência da cintura, circunferência do abdômem, recomendados pela OMS, razão cintura quadril, razão cintura estatura, espessura das pregas cutâneas e

percentual de gordura corporal (Farias et al., 2014). Além da relação cintura-altura, que seria um método de baixo custo, utilizado para definir pessoas com riscos de saúde, devido excesso de peso (Rush e Simmons, 2014).

Sabe-se que uma grande diversidade de fatores leva ao aumento da adiposidade (Rogers, 2003; Gluckman e Hanson, 2004; Cripps et al., 2005; Zheng e Berthoud, 2008). Há um papel importante dos genes, mas há uma forte influência, dos fatores ambientais (o estilo de vida como a ausência da prática de atividade física e maus hábitos alimentares), além da interação entre ambos (Stenvinkel, 2014). Estes fatores são particularmente importantes durante a fase de desenvolvimento do indivíduo, especialmente nos períodos fetal e perinatal (Rogers, 2003; Gluckman e Hanson, 2004; Cripps et al., 2005). Muito importante e amplamente estudado para controle do equilíbrio energético é o hormônio leptina (Friedman e Halaas 1998, Elmquist et al., 2005). A leptina é produzida pelo tecido adiposo, que também produz outros hormônios conhecidos como adipocinas, e atua diminuindo o consumo alimentar e aumentando o gasto energético (Ahima e Flier, 2000; Ahima, 2005). Entre os aspectos da fisiologia humana que está alterada no obeso, e que cada vez mais frequentemente tem sido associado às alterações na função do sistema nervoso (SN) estão as concentrações séricas da leptina (Banks, 2003; Figlewicz, 2003; Blüher e Mantzoros, 2009; Leininger, 2009). Assim a deficiência congênita de leptina (Xia et al., 2014) ou mutações do receptor de leptina podem causar fome excessiva, e levar a obesidade (Farooqi e O'Rahilly, 2014). No entanto, apenas um pequeno percentual dos seres humanos obesos são hipoleptinêmicos, por algum tipo de deficiência genética ou apresentam mutação no receptor para a leptina (Considine et al., 1996). O que frequentemente tem sido observado em seres humanos e animais obesos é a presença de hiperleptinemia que ao longo da doença gera uma resistência tecidual a ação da leptina (Considine et al., 1996; Banks, 2003; Leininger, 2009).

## **Leptina**

A leptina, do grego leptos, que significa magro (Denver et al., 2011), pertence a família das citocinas (Zhang, 1997; Giby, 2014), é derivada do gene LEP, localiza-se no cromossoma 7, transcreve um péptido de 167 aminoácidos de peso molecular 16kD. O gene LEP (*ob*) muitas vezes tem sua sequência preservada. Sua função é

conservada em mamíferos e não mamíferos, devido a preservação de estruturas fundamentais. A leptina também está presente em outras espécies como anfíbios, répteis e peixe cada um com suas particularidades nas sequências dos aminoácidos (Denver et al., 2011). Na década de 50, Gordon Kennedy propôs uma relação direta entre fatores circulantes e depósitos de gordura e sua influência no consumo alimentar e gasto energético de forma a regularem o peso corporal (Kennedy, 1953). Foram realizados experimentos de parabiose, onde ratos magros e obesos tiveram a circulação sangüínea interligada, comprovando assim existência de um fator circulante sinalizador (Coleman, 1973). Porém somente em dezembro de 1994, a leptina foi descoberta oficialmente por Jeffrey Friedman da Universidade Rockefeller em Nova Iorque por meio de uma técnica denominada “*positional cloning*” (Negrão e Licínio, 2000). Este fato foi primordial para os avanços dos estudos, sobre os processos moleculares relacionados com o controle da ingestão e peso corporal.

A leptina é um hormônio secretado principalmente por adipócitos maduros. Porém, foi encontrada em concentrações menores no estômago, no intestino, na placenta, no músculo esquelético, na glândula mamária e no cérebro (Ahima, 2005; Münzberg e Morrison, 2014).

A atuação da leptina ocorre principalmente no cérebro, em especial no hipotálamo. Sua ação é integrada a de outras adipocinas, e outras sinalizações para o controle da homeostase energética (Friedman e Halaas, 1998; Myers et al., 2009; Ring e Zeltser, 2010).

A leptina é regulada através do tamanho das reservas de gordura do corpo e também pelos hormônios envolvidos com a homeostase energética, como a insulina e os glicocorticóides. Quando o indivíduo se encontra saciado, ocorre aumento na produção de insulina. Porém, quando ocorre o contrário, no período de jejum prolongado, onde os estoques de gordura são reduzidos, há um aumento de secreção do glucagon e das catecolaminas e diminuição da secreção de insulina e leptina (MacDougald et al., 1995; Rentsch e Chiesi, 1996; Slieker et al., 1996).

O estado das reservas energéticas do organismo e o balanço energético entre a ingestão e o gasto calórico se refletem nas concentrações séricas de leptina. Essas concentrações têm relação direta com o IMC, e o conteúdo total de gordura corporal de um indivíduo (Lustig, 2001). Sabe-se que a leptina, reduz o consumo alimentar e aumenta o gasto energético tendo ação no hipotálamo (Boguszewski et al., 2010). A redução dos níveis de leptina promove várias alterações

comportamentais e fisiológicas, para responder de forma adequada a baixa reserva de energia (Lu et al., 2006; Liu et al., 2010, 2011).

Nos últimos anos, muito se aprendeu sobre as distintas funções fisiológicas reguladas pela leptina e, os circuitos centrais que medeiam estes efeitos. O resultado é uma compreensão mais abrangente da ação da leptina sobre alimentação, comportamento e outras funções homeostáticas. Porém, vários mecanismos ainda não são bem compreendidos (Münzberg e Morrison, 2014).

### **Leptina e seus receptores**

Uma vez na circulação, a leptina entra no sistema nervoso central (SNC), liga-se e ativa seu receptor, que é expresso principalmente no hipotálamo e núcleos do tronco cerebral (Tartaglia 1997; Scott et al., 2009; Patterson et al., 2011).

O receptor de leptina (ObR) foi primeiramente descrito em camundongos e foi caracterizado como membro da família das citocinas da classe 1 (Tartaglia et al., 1995). Seis de suas isoformas já foram identificadas em roedores: ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe e ObRf (Tartaglia et al., 1995; Lee et al., 1996; Wang et al., 1996).

ObRa-ObRd e ObRf são isoformas que contêm domínio transmembrana e podem ser subdivididas em duas classes: formas longa e forma curta. A forma longa do receptor (ObRb) é muito conservada nas espécies e muito expressa em mamíferos, é a que tem maior domínio intracelular nesta família de receptores, com 300 resíduos de aminoácidos. As outras isoformas são consideradas curtas por causa do pequeno domínio intracelular e, ObRa é o único conservado entre as espécies de mamíferos, com uma cadeia intracelular formada por 32-40 resíduos em roedores. O ObRe possui apenas um domínio extracelular e é citado como a forma livre do receptor de leptina. Em geral, a isoforma longa do receptor é a chamada de crítica para a ação da leptina em vários tecidos, pois possui um domínio intracelular maior e dispara mecanismos de sinalização que irão resultar nas ações hormonais (Chua et al., 1997; Tartaglia, 1997).

Em regiões do hipotálamo, incluindo núcleos arqueado (ARC), ventromedial (VMN), paraventricular, dorsomedial e hipotálamo lateral, reconhecidos como centros de regulação da ingestão alimentar e homeostase energética, é onde encontramos a maior densidade de ObR (Sahu, 2004). Contudo, foram descritos

também receptores para o hormônio em tecidos periféricos: glândula tireóide (Nowak et al., 2002; Vicente et al., 2004), células intestinais perivasculares (Rajala et al., 2014), glândula mamária, glândula supra-renal, hipófise, fígado, tecido adiposo, músculo esquelético (Bjorbaek e Kahn, 2004; Oswal e Yeo, 2010; Carter et al., 2013) e pulmões (Oswal e Yeo, 2010; Carter et al., 2013). Assim, percebemos então que a leptina, além de suas funções centrais, também regula o metabolismo de forma periférica (Bjorbaek e Kahn, 2004).

A tabela 1 apresenta algumas das estruturas cerebrais de camundongo onde foram identificados receptores de leptina.

Tabela 1. Localização dos receptores de leptina no cérebro

**Localização e expressão do receptor de leptina (LepRb) no cérebro de camundongos. Maior \*\*\*\*; Alto \*\*\*; Médio \*\*; Baixo \***

Córtex temporal e áreas associadas	**
Córtex somatosensorial	***
Giro denteado	*
Amígdala central	*
Hipotálamo anterior	*
Núcleo arqueado	****
Hipotálamo dorsomedial	****
Hipotálamo lateral	***
Núcleo paraventricular	*

Fonte: Adaptado de Patterson et al., 2011.

### Sinalização intracelular da leptina

A leptina entra no cérebro por um mecanismo de transporte saturável (Banks et al., 1996), provavelmente pela barreira hematoencefálica, por um transporte mediado por receptor (ObRa, ObRc) ou também através do líquido cefaloraquidiano (Schwartz et al., 1996). A leptina liga-se ao ObRb no hipotálamo e ativa assim os sistemas de sinalização intracelular dependentes da ativação da via JAK-STAT, ilustrada na figura 1 (Myers, 2004). As proteínas JAK pertencem a família janus-kinase, sendo encontradas associadas constitutivamente ao domínio intracelular do ObRb. A ligação leptina-ObRb resulta em autofosforilação de JAK2 em resíduos de

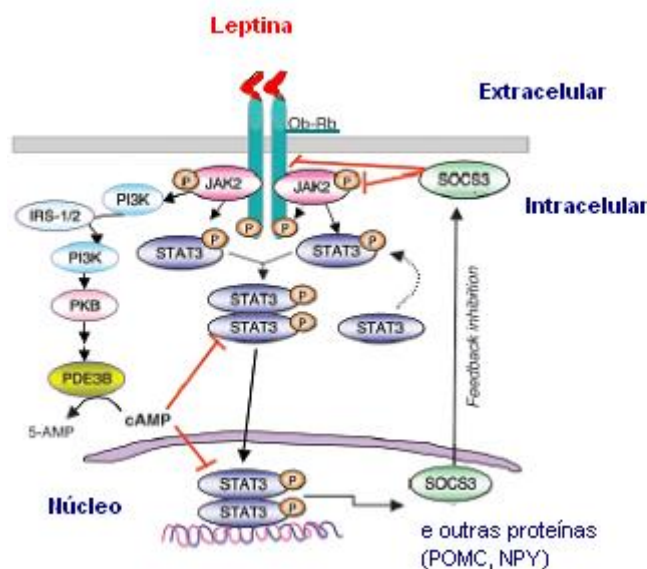


tirosina presentes no domínio intracelular do receptor, com consequente ativação de STAT3 (transdutor do sinal e ativador da transcrição-3). A proteína STAT3 ativada é dimerizada e se move para o núcleo, e assim regula a transcrição de diversos genes, dentre eles, o da proteína SOCS3 (supressor da sinalização de citocinas tipo 3), este é um inibidor da via de sinalização que atua por retroalimentação negativa (Ahima, 2005). A expressão de SOCS3 aumentada inibe a fosforilação em tirosina de JAK2 (Bjorbaek et al., 1999; Emilsson et al., 1999). Altos níveis de SOCS3 têm sido associados com resistência a ação do hormônio no hipotálamo e em tecidos extra-hipotalâmicos (Bjorbaek et al., 1998; Steinberg et al., 2004; Velloso et al., 2008).

A leptina também utiliza outras vias alternativas para sua ação, por exemplo, vias onde estão envolvidas a PI3K/ERK/MAPK, que são vias comuns para atuação da insulina e estão relacionadas aos efeitos proliferativos da leptina (Alvarez et al., 2012).

A figura 1 representa a via de sinalização da leptina no hipotálamo.

Figura 1. Via de sinalização da leptina no hipotálamo



Fonte: Adaptado de Pal e Sahu, 2003.

## Leptina e sistemas neuroendócrinos

Estudos farmacológicos em animais e seres humanos demonstram que o sistema nervoso simpático (SNS) age de forma inibitória sobre a secreção de leptina

e, que a leptina causa alteração no eixo hipotálamo – hipófise – adrenal (HHA) alterando assim, a resposta ao estresse (Khan et al., 2012). As baixas temperaturas aumentam a noradrenalina no plasma e reduzem as concentrações de leptina em seres humanos (Ricci et al., 2000) e a expressão do mRNA para a leptina em camundongos (Trayhurn et al., 1995). Dutra et al (2007) observaram que a exposição ao frio (8°C por 12 h) reduziu a concentração sérica de leptina, e aumentou seu número de receptores no hipotálamo de ratos wistar. Tang-Christensen et al (1999) observaram que a leptina possui efeito estimulatório sobre o sistema simpatoadrenal, demonstrando uma interação entre o cérebro e o tecido adiposo, onde a leptina estimula as vias simpáticas e estas inibem sua secreção.

Alguns trabalhos sugerem uma relação entre o eixo HHA e a secreção de leptina. Parece que a hipoleptinemia está associada a diminuição nos níveis de hormônios do crescimento, tireoidianos e sexuais, enquanto que a hiperleptinemia acompanha baixas concentrações séricas do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol (Stieg et al., 2014). Em casos de pacientes com Síndrome de Cushing (hipercortisolismo), há alta concentração de leptina, o que também ocorre em quadros de obesidade (Masuzaki et al., 1997). O aumento da leptinemia plasmática, secreção de leptina na cultura de células do tecido adiposo e da expressão de mRNA, também aconteceu em seres humanos magros saudáveis 24h pós a administração de 1mg de dexametasona (Masuzaki et al., 1997), neste caso observamos uma relação direta entre os glicocorticóides e a síntese e secreção da leptina. Mas apesar da relação entre glicocorticóides e leptina não estar bem definida, evidências sugerem uma correlação positiva, pois o hipercortisolismo está associado a aumento na adiposidade, pelo menos central. Alguns estudos demonstram uma relação inversa entre glicocorticóides e leptina (Stephens et al., 1995; Huang et al., 1998; Ahima e Flier, 2000). Em seres humanos no período após a cirurgia há um aumento do cortisol sérico, e a leptinemia é reduzida em quase cinquenta por cento (Kain et al., 1999). A leptina age sobre o eixo HHA, inibindo a secreção do ACTH, através da inibição do hormônio liberador da corticotrofina (CRH) (Heiman et al., 1997; Oates et al., 2000). Segundo Malendowicz et al (2007) a leptina suprime diretamente a produção e secreção de glicocorticóides no córtex de adrenais de porcos.

A leptina regula de forma direta e indireta grupos de neurônios específicos no hipotálamo e em outras regiões do cérebro (Tartaglia et al., 1995; Fruhbeck, 2001).

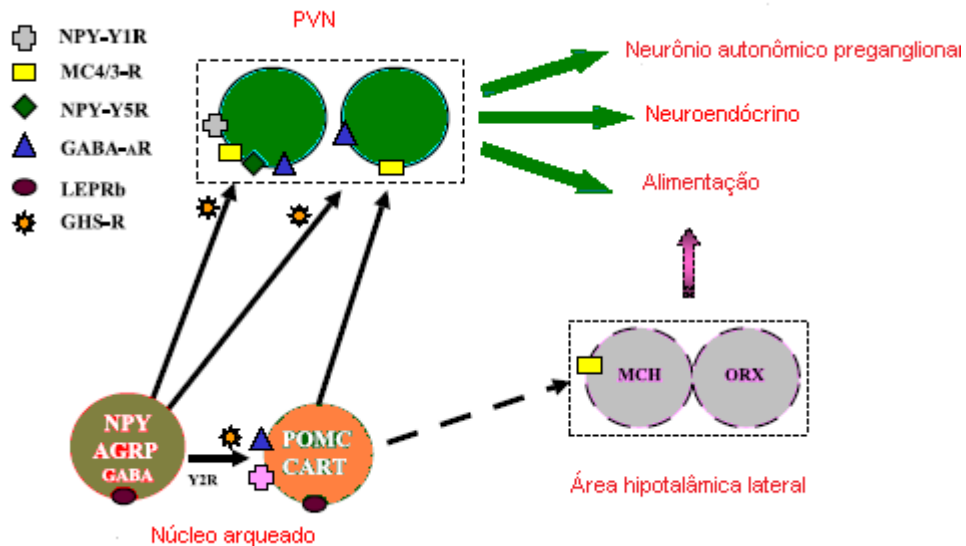
Dessas regiões, algumas são ricas em ObRs, sendo assim, percebemos um efeito direto do hormônio na regulação dos neurônios e, em outras regiões, onde o receptor não é muito expresso, e a resposta a leptina é acentuada, percebemos dessa forma uma regulação indireta. ObRs são muito expressos nos ARC e VMN do hipotálamo, áreas que estão envolvidas com o controle da termogênese, comportamento alimentar e regulação hormonal (Håkansson et al., 1998; Elmquist et al., 1999). Entretanto, neurônios presentes no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no hipotálamo lateral (LHA) quase não possuem receptores para a leptina (Elmquist et al., 1998) sendo, no entanto, reguladores importantes para as funções neuroendócrinas mediadas pelo hormônio. Essa regulação acontece de uma forma indireta, através de projeções de neurônios que são sensíveis a leptina, que estão presentes no ARC, núcleo dorsomedial (DMN) e tronco cerebral (Elmquist et al., 1999; Ahima et al., 2000).

Vários neuropeptídeos hipotalâmicos se encontram envolvidos com a sinalização mediada pela leptina. Essas moléculas responsáveis pela sinalização podem ser classificadas em dois grupos grandes: os peptídeos orexígenos, os quais estimulam o apetite, e os peptídeos anorexígenos, os quais reduzem o apetite (Sahu, 2004). A leptina causa inibição na atividade de centros hipotalâmicos, onde há neurônios que expressam neuropeptídeos orexígenos, tais como o AGRP (peptídeo relacionado a proteína agouti), NPY (neuropeptídeo Y), MCH (hormônio concentrador de melanina) e ORX (orexinas); e estimula os que são responsáveis pela produção de neuropeptídeos anorexígenos, como o CRH (hormônio liberador da corticotrofina),  $\alpha$ -MSH (hormônio estimulador de melanócito), e CART (transcrito regulado por cocaína e anfetamina) (figura 2). Sendo assim, a leptina tem um papel de saciedade no SNC (Sahu, 2002; Ahima e Osei, 2004).

A leptina causa estimulação na biossíntese de TRH (hormônio liberador de tireotrofina) através de mecanismos diretos sobre os neurônios do PVN que expressam TRH, pois já foi demonstrado que a injeção de leptina em ratos em jejum, reverte a supressão do RNAm para pró-TRH (Legradi et al., 1997). Confirmando essa hipótese, ratos com lesões no PVN, local onde há alta expressão do ObR, tanto o jejum como a administração de leptina no jejum causaram alterações dos níveis plasmáticos de hormônios tireoideanos e TSH (tireotrofina) ou a expressão do pró-TRH (Legradi et al., 1998).

A figura 2 representa os efeitos da leptina no hipotálamo.

Figura 2. Neurônios hipotalâmicos responsivos a leptina, NPY e  $\alpha$ -MSH



Nota: Leptina regula diretamente neurônios NPY/AGRP e POMC/CART presentes no núcleo arqueado. NPY estimula a fome via receptores Y1 e Y5. O receptor Y2 age pré-sinápticamente regulando a liberação de NPY nos neurônios POMC ( $\alpha$ -MSH). O efeito do NPY é modulado pela grelina circulante. AGRP antagoniza a ação do  $\alpha$ -MSH em receptores MC4/3, estimulando o apetite, reduzindo o gasto energético e ganho de peso. GHS-R: growth hormone secretagogue receptor ou receptor de grelina.

Fonte: Adaptado de Ahima e Osei, 2004.

## Resistência a leptina

Por exercer um papel importante na inibição da fome, na redução da massa corporal, na redução da massa de adipócitos, a leptina tem sido vista como um hormônio anti-obesidade (Sahu, 2002; Zhang et al., 2004). Tanto seres humanos, quanto ratos, que apresentam anormalidades ou deficiência no receptor de leptina são hiperfágicos e obesos mórbidos (Jéquier, 2002). A obesidade aumenta a resistência a leptina em qualquer idade (Balaskó, 2014). O quadro de hiperleptinemia juntamente com hiperfagia e obesidade, são indicativos de resistência a leptina, e isso pode ser importante no desenvolvimento da obesidade (Maffei et al., 1995; Considine et al., 1996; Ahima e Hileman, 2000; Ahima e Osei, 2004). Essa resistência pode ser causada por vários fatores tais como, erro no transporte de leptina pela barreira hemato-encefálica, alterações nos receptores de

leptina e também algum tipo de alteração na sinalização pós-receptor (Jéquier, 2002; Munzberg e Myers, 2005).

Camundongos obesos foram resistentes a administração periférica de leptina, porém responderam a injeção via i.c.v., sugerindo assim que a resistência a leptina pode ser mediada através do seu transporte prejudicado pela barreira hematoencefálica (Halaas et al., 1997). Mutações nos receptores de leptina também podem causar outro tipo de resistência. São vários os tipos de mutações que podem acontecer resultando em obesidade em seres humanos (Clément et al., 1998) e em ratos (Flier e Elmquist, 1997). A resistência também pode ser causada por alterações farmacocinéticas, como problemas na distribuição, liberação, no metabolismo e/ou eliminação (Halaas et al., 1997), como também por dietas que contenham alto teor de lipídios, o que pode, por exemplo, ocasionar a presença de um antagonista circulante ou uma proteína acoplada, elevar a depuração de leptina, alterar o transporte cerebral, reduzir o receptor de leptina, inibir a via JAK-STAT ou ativar a SOCS-3 (Friedman e Halaas, 1998).

Desde a sua descoberta a leptina tem sido alvo de muitos estudos, incluindo investigações do seu papel em várias funções, como a nutricional, desenvolvimento, absorção e resposta imune, por exemplo. O mecanismo mediador da resistência a leptina na obesidade é um assunto que merece mais atenção, e é uma área em que uma série de questões importantes permanece sem resposta. Resolver estas questões é fundamentalmente importante para que possamos aplicar esse conhecimento na área clínica (Wada et al., 2014). Uma das questões é em que concentrações séricas de leptina temos maior atuação ou começamos a ter resistência? A outra questão é relacionada a seletividade tecidual da resistência. Alguns tecidos são mais sensíveis e tornam-se resistentes mais precocemente, enquanto outros as concentrações elevadas de leptina continuam atuando. O melhor exemplo é o sistema nervoso simpático.

### **Efeitos extra-hipotalâmicos da leptina**

Apesar do hipotálamo ser o mais bem conhecido sítio de ação central da leptina, diversos trabalhos têm demonstrado a expressão de receptores de leptina em várias regiões extra-hipotalâmicas (Elmquist et al., 1998; Håkansson et al., 1998; Shanley et al., 2002; Morrison, 2009), como neocórtex, hipocampo e amígdala

(Håkansson et al., 1998; Shanley et al., 2002; Funahashi et al., 2003; Harvey et al., 2005, 2007; Lu et al., 2006), estruturas que modulam respostas comportamentais. Foram identificados receptores ObRb expressos em regiões corticais e hipocampo (Huang et al., 1996; Shioda et al., 1998; Burguera et al., 2000; Ur et al., 2002). Além disso, pode-se observar em outras regiões cerebrais o RNAm, a proteína e a imunorreatividade da leptina altamente expressos (Morash et al., 1999; Ur et al., 2002) sugerindo que a leptina pode atuar, por sua liberação local, para modular a atividade dos circuitos neuronais específicos.

Em áreas extra-hipotalâmicas, a leptina atua, em parte, por uma regulação direta da função neural, incluindo efeitos locais na sinapse (Harvey, 2007). Foi observado em animais *ob/ob* ou *db/db*, os quais não têm o gene para a expressão da leptina ou não apresentam receptor de leptina, respectivamente (Campfield et al., 1995) que os neurônios hipocampais (CA1) apresentam atraso na potenciação de longa duração (LTP). A LTP hipocampal é considerada um sinal específico da plasticidade sináptica (Malenka e Bear, 2004). Além disso, os animais *ob/ob* apresentaram retardo no processo de mielinização (Sena et al., 1995), corpo neuronal reduzido (Bereiter e Jeanrenaud, 1979) e orientação dendrítica alterada (Bereiter e Jeanrenaud, 1980), corroborando os achados de que a leptina é importante no desenvolvimento de SNC. Segundo Bouret (2010), a leptina influencia eventos do desenvolvimento tais como a neurogênese, crescimento axonal, proliferação dendrítica, e formação de sinapses. Além do efeito direto sobre a função neuronal/sináptica, leptina tem capacidade de influenciar a estrutura neuronal e sua plasticidade em roedores (Oomura et al., 2006; O'Malley et al., 2007). Estudos mostram que roedores com deficiência de leptina apresentavam cérebros com menor volume e peso cortical (Steppan e Swick, 1999), e que o tratamento destes animais com leptina resultava não somente no crescimento do crânio como também no aumento da quantidade de proteína e de DNA (Ahima et al., 1999; Steppan e Swick, 1999; Udagawa et al., 2006a, 2006b). Foi demonstrado em seres humanos, que os níveis de leptina têm relação com o volume da substância cinzenta em várias áreas cerebrais (Pannacciulli et al., 2007) e que a reposição com leptina, em seres humanos deficientes de leptina, resulta em grandes mudanças na estrutura cerebral (Matochik et al., 2005). Outros trabalhos observaram que tanto adultos jovens, quanto idosos, os quais apresentavam obesidade associada a altos níveis de leptina (caracterizando o fenômeno de resistência central a leptina) apresentam pobre

desempenho cognitivo (Considine, 2005; Gunstad et al., 2006a,b, 2007; Whitmer et al., 2007; Wolf et al., 2007).

A deficiência de leptina parece reduzir a densidade de projeções axonais de neurônios sensíveis a leptina e que esta alteração estrutural pode ser revertida pelo tratamento com leptina na lactação, mas não em animais adultos (Bouret et al., 2004). Além disso, Oldreive et al (2008) observaram que a leptina leva a expansão da arborização dendrítica no hipocampo, córtex e cerebelo. Ainda, foi demonstrado um aumento na mobilidade e densidade da filopodia dendrítica de células hipocampais (O'Malley et al., 2007) e estimulação da formação e o crescimento do cone axonal de neurônios corticais (Valerio et al., 2006).

Outros dois aspectos interessantes em que a leptina parece atuar são a neuroproteção e a neuroproliferação, fato que pode ser particularmente relevante quando se considera que o hipocampo é uma das poucas estruturas do encéfalo em que ocorre neurogênese no animal adulto (Li et al., 2009). Diversos fatores de crescimento agem sobre os neurônios para protegê-los da neurodegeneração e da morte celular (Signore et al., 2008). A leptina, por exemplo, tem sido considerada como um sinal de neuroproteção (Tang, 2008; Morrison, 2009). Além da observação de que a leptina inibe a apoptose de diversas células não neuronais (Shimabukuro et al., 1998; Howard et al., 1999; Fujita et al., 2002; Somasundar et al., 2003; Hoda et al., 2007), já se verificou que, em neurônios *in vitro*, a leptina promove neuroproteção em modelos de isquemia cerebral (Zhang et al., 2007; Zhang e Chen, 2008), protege da excitotoxicidade glutamatérgica (Dicou et al., 2001; Russo et al., 2004; Zhang et al., 2007; Guo et al., 2008; Zhang e Chen, 2008), e do estresse oxidativo (Guo et al., 2008), e promove a proliferação de células progenitoras hipocampais (Garza et al., 2008). Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a leptina reduziu a perda de neurônios dopaminérgicos em modelo de Parkinson quimicamente induzido (Weng et al., 2007).

Também foi observado que a leptina, possui uma ação direta sobre os tecidos periféricos. Em hepatócitos isolados de ratos Wistar, a leptina foi capaz de estimular incorporação de glicose e deposição de glicogênio, causando aumento dos estoques intracelulares de forma dose-dependente e aditiva ao efeito da insulina (Berti et al., 1997; Kellerer et al., 1997; Ceddia et al., 1998). O depósito de glicogênio é refletido nas taxas de síntese e degradação deste polímero. Além disso, a leptina inibe a atividade da fosforilase  $\alpha$ , enzima que limita a produção hepática da glicose a partir

da degradação do glicogênio (Aiston e Agius, 1999). Camundongos *ob/ob* apresentaram redução na incorporação de glicose ao glicogênio no músculo sóleo, comprovando o efeito da leptina também nos estoques de glicogênio muscular (Liu et al., 1997). Além dos seus efeitos no metabolismo dos carboidratos, a leptina também aumenta de forma aguda a oxidação de ácidos graxos, e diminui a síntese de triacilglicerol no músculo esquelético (Steinberg et al., 2002).

Em ratos, também há receptores de leptina na hipófise (Vicente et al., 2004) e na tireóide (Nowak et al., 2002; Dutra et al., 2007; Rodrigues et al., 2009), o que sugerem uma regulação direta sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT). Anteriormente, Seoane et al (2000) demonstraram o efeito estimulador da leptina sobre a secreção espontânea de TSH de animais em jejum, que parece ser dependente do status tireoideano. Ortiga-Carvalho et al (2002) observaram o papel da leptina na secreção de TSH no estado alimentado: *in vivo* e *in vitro*. Ratos adultos alimentados, após 2 h de uma única dose de injeção de leptina (8 ug / 100 g de peso corporal), exibiram aumento das concentrações de TSH. Já *in vitro*, a leptina causou redução da secreção de TSH, enquanto a incubação com anti-leptina resultou em maior liberação de TSH. Assim, no estado alimentado, a leptina tem um efeito estimulador sobre a liberação de TSH aguda *in vivo*, provavelmente via estímulo no hipotálamo. No entanto, o efeito direto da leptina na hipófise é inibitório.

De acordo com Lisboa et al (2003), a leptina regula positivamente a desidrase tipo 1 (D1) na tireoide. Neste estudo, ratos expostos a 4°C (15, 30, 60 e 120 min) apresentaram redução progressiva de D1 e D2 na tireóide, apesar do aumento do TSH e a injeção aguda de leptina (8 ug / 100 g de peso corporal *sc*) foi capaz de aumentar a atividade D1.

Foi encontrada a presença de ObRs em células cromafins na medula adrenal em seres humanos e em diversas espécies animais, como ratos, bois e porcos (Cao et al., 1997; Glasow et al., 1998; Takekoshi et al., 1999; Yanagihara et al., 2000). Porém, os tipos de isoformas destes receptores ainda são conflitantes na literatura, e ao que tudo indica, está relacionada com cada espécie pesquisada. Porém, o efeito estimulatório da leptina sobre a função adrenomedular parece ser conservado entre as espécies (Takekoshi et al., 1999, 2001a, 2001b; Utsunomiya et al., 2001). Trevenzoli et al (2010a) demonstraram o efeito direto da leptina sobre a função da medula adrenal de ratos adultos que foram tratados com leptina durante os 10



primeiros dias de vida, Esta programação resultou em hiperleptinemia, hipertrofia adrenal e aumento no conteúdo catecolamina adrenal aos 150 dias de idade.

A leptina também tem efeito em outros tecidos periféricos. Foi observado que a administração de leptina é útil no tratamento da Síndrome de Berardinelli, também conhecida como lipodistrofia congênita, caracterizada por diversas alterações como gigantismo acromegalóide infantil, hepatoesplenomegalia, hipertrofia do tecido conjuntivo e tecido adiposo da pele, dentre outras (Tsoukas et al., 2014).

### **Leptina e seus efeitos comportamentais**

A leptina tem um importante papel sobre memória, cognição, emoção, motivação, humor e respostas ao estresse (Fruhbeck, 2001; Funahashi et al., 2003; Sandoval e Davis, 2003; Harvey et al., 2005, 2007; Lu et al., 2006; Morrison, 2009). Algumas evidências associam a desregulação na sinalização da leptina e várias formas de psicopatologias incluindo, ansiedade, depressão, esquizofrenia e autismo (Valleau e Sullivan, 2014). Harvey (2007) demonstrou que a leptina tem ação antidepressiva. Foi observado que a hipoleptinemia está associada a prejuízos cognitivos (Ble et al., 2005; Huang et al., 2007; Gunstad et al., 2008; Paz-Filho et al., 2008; Holden et al., 2009), enquanto indivíduos idosos com altos níveis de leptina obtiveram melhor desempenho cognitivo (Gunstad et al., 2008). A hipoleptinemia também está presente em indivíduos com doença de Alzheimer e demência vascular associada a anorexia (Power et al., 2001). Tem sido observado, além disso, que a leptina reduz os níveis de proteína beta-amilóide (A $\beta$ ) em ratos transgênicos com altos níveis de A $\beta$  (Fewlass et al., 2004). Esses resultados sugerem que a diminuição da leptina, talvez por disfunções neuroendócrinas, deve estar associada aos níveis altos de A $\beta$  e demência, pois essa proteína é considerada um forte contribuinte para a demência da doença de Alzheimer (Farr et al., 2006). Além disso, o tratamento usando leptina resulta em melhora no desempenho cognitivo em seres humanos (Paz-Filho et al., 2008). Além deste efeito, também foi observado que a leptina melhora os comportamentos de interação social e atividade motora, em animais (Oomura et al., 2006; Meyer et al., 2014). Uma vez que este estudo aborda os efeitos da hiperleptinemia neonatal sobre níveis de ansiedade e na atividade exploratória em animais adultos, passamos, a seguir, a uma descrição dos efeitos

conhecidos da leptina sobre estes parâmetros comportamentais e as estruturas relacionadas.

### **Leptina e ansiedade**

Alguns estudos observaram que a leptina também tem ação sobre respostas ao estresse (Fruhbeck, 2001; Sandoval e Davis, 2003; Harvey, 2007). De uma maneira geral, os peptídeos que inibem a ingestão alimentar melhoram as respostas a situações aversivas (Kask et al., 2002). Foi observada uma associação entre hipoleptinemia e respostas depressivas, semelhantes às respostas comportamentais observadas em pacientes depressivos, quando roedores são expostos ao estresse crônico e a derrota social crônica; porém a administração sistêmica de leptina, de maneira dose-dependente, melhorou a resposta comportamental e reverteu a anedonia (perda de motivação, geralmente associada à depressão) quando animais são submetidos a situações estressantes e aversivas (Lu et al., 2006). Asakawa et al (2003) demonstraram que camundongos *ob/ob* que foram tratados com leptina, apresentaram diminuição de ansiedade e do peso corporal.

Os receptores de leptina no hipocampo podem ser um dos sítios de ação para redução das respostas observadas quando os animais foram submetidos a situações de estresse e aversão (Lu et al., 2006; Harvey, 2007), e além disso também causou aumento da expressão de RNAm de c-fos na formação do hipocampo, núcleo basolateral da amígdala e giro denteado, demonstrando que a leptina pode ter ação específica nas estruturas límbicas (Lu et al., 2006). Este dado é confirmado através de outros trabalhos onde foi observada uma alta expressão de receptores de leptina na amígdala e no hipocampo (Håkansson et al., 1998; Shanley et al., 2002; Funahashi et al., 2003). Já é sabido que o hipocampo possui um papel importante na ansiedade e atividade exploratória (McNaughton, 1996; Bast e Feldon, 2003; Bannerman et al., 2004), assim também como a amígdala está envolvida em reações inatas e condicionadas ao medo (Blanchard e Blanchard, 1972; LeDoux, 1990; Rizvi et al., 1991; Davis et al., 1994; Vazdarjanova et al., 2001). Além disso, a leptina também pode interferir sobre respostas comportamentais por sua ação sobre NPY, em regiões extra-hipotalâmicas, pois injeções de leptina causaram infra-regulação nos genes responsáveis pela expressão de NPY (Asakawa et al., 2003). É conhecido que a expressão de NPY na região da amígdala é muito influenciada

através de situações estressantes. O NPY produz efeitos ansiolíticos por meio de ações na amígdala, e os efeitos ansiogênicos de estresse de contenção são mediados por essa estrutura. Foram observados os efeitos do estresse de contenção sobre os níveis de NPY na amígdala e em outras regiões cerebrais. Os níveis de mRNA de NPY foram determinados, após 1-h de estresse de contenção. Houve redução de mRNA de NPY na amígdala em 1 h e 2 h após a restrição, um efeito semelhante foi observado no neocórtex, porém menos evidente e mais lento no início. Esses resultados suportam a hipótese de que a ansiedade relacionada ao estresse pode em parte ser mediada através da modulação da função do NPY na amígdala (Thorsell et al., 1998, 1999).

Além disso, foi observado que a administração de leptina no hipocampo resulta em efeito anti-estresse, e o mesmo efeito ocorre quando a leptina é administrada de forma sistêmica (Lu et al., 2006). Sendo assim pode-se explicar então o fato da estimulação do eixo HHA, através do estresse, ser inibido pela leptina, pois esta causa bloqueio na secreção do ACTH via inibição do CRH (Heiman et al., 1997; Oates et al., 2000). A detecção de receptores da leptina no córtex de adrenais de porcos também sugere que ela pode inibir diretamente a produção e secreção de glicocorticóides (Malendowicz et al., 2007) e muitos trabalhos mostram uma relação inversa entre leptina e glicocorticóides (Stephens et al., 1995; Huang et al., 1998; Ahima e Flier, 2000).

### **Leptina e atividade exploratória**

Tem sido demonstrada uma relação entre a leptina e a atividade exploratória. Foi observado que ratos que foram tratados com leptina apresentaram redução no número de orifícios explorados e na duração dessa exploração quando submetidos ao teste de campo vazado (CV), caracterizando uma redução da atividade exploratória (Buyse et al., 2001). Esta redução da exploração é dependente do estado nutricional (Buyse et al., 2001), e ocorre via receptores da colecistoquinina tipo 1 (CCK<sub>1</sub>) (Crawley e Corwin 1994). A hiperatividade induzida pela inanição parcial é um fenômeno já conhecido em estudos com animais (Russell et al., 1987; Morse et al., 1995). A atividade aumentada é proporcional a restrição alimentar, e se houver privação total da comida, há alteração no padrão noturno de atividade (Morse

et al., 1995). A redução rápida na secreção de leptina juntamente com a restrição calórica e a perda de peso (Ahima et al., 1996; Kolaczynski et al., 1996), pode representar o fator que dá início a hiperatividade que é observada em casos de inanição parcial e em casos de anorexia (Exner et al., 2000). Foi observado que a hipoleptinemia presente em indivíduos com anorexia nervosa, é acompanhada por inquietação motora (Exner et al., 2000). Este achado é corroborado por estudos os quais demonstraram que a hiperatividade, induzida pela privação alimentar por 7 dias, a qual está associada a hipoleptinemia, é inibida pela administração de leptina (Exner et al., 2000; Buyse et al., 2001).

Segundo Morrison (2009), a redução da atividade exploratória pode ter relação com a menor motivação para adquirir recompensa, pois a leptina é capaz de reduzir o consumo alimentar. Embora as áreas hipotalâmicas estejam associadas com estas respostas, regiões extra-hipotalâmicas também estão envolvidas. O sistema dopaminérgico mesolímbico é essencial na motivação para a obtenção de estímulos prazerosos (Berridge, 1996; Berridge e Robinson, 2003). As projeções dopaminérgicas da área VTA e do núcleo accumbens são particularmente influentes no consumo de comida e de drogas (Wyvell e Berridge, 2000; Cannon e Palmiter, 2003; Peciña et al., 2003). A leptina atua sobre este sistema, inibindo a ingestão de alimentos e modulando os neurônios dopaminérgicos (Figlewicz et al., 2003; Fulton et al., 2006; Hommel et al., 2006), além de influenciar este sistema de forma indireta através de seus efeitos no hipotálamo. Assim, a ação da leptina sobre a inibição do consumo alimentar está relacionada com as áreas cerebrais de antecipação, memória e motivação (Fulton et al., 2000; Shalev et al., 2001; Fulton et al., 2006; Getchell et al., 2006).

A leptina tem influência na motivação através do sistema dopaminérgico mesolímbico, inclusive o núcleo accumbens e a área tegumentar ventral (VTA) (Choi et al., 2008).

### **Modelos experimentais de comportamento em animais: Modelo de ansiedade**

A ansiedade é um estado emocional advindo do medo, incerteza e apreensão geralmente acompanhada como uma alteração psicológica, fisiológica e comportamental (Nutt, 1990). Estas mudanças existem para facilitar o indivíduo a

lidar com situações adversas ou inesperadas (Graeff et al., 1993). Porém, se for excessiva, pode se tornar um estado patológico, interferir na resposta eficaz a eventos estressantes, e ameaçar o bem-estar ou a sobrevivência de seres humanos e animais (Graeff et al., 1990). A ansiedade patológica também pode ser consequência de fatores predisponentes, resultantes de interações gene-ambiente durante o desenvolvimento, e experiências vividas (Casey et al., 2011).

Os modelos utilizando animais são muito utilizados em pesquisas com drogas ansiolíticas, e para se estudar os mecanismos cerebrais envolvidos na ansiedade (Graeff et al., 1998). O teste “labirinto em cruz elevado” (LCE) é um dos mais utilizados, entre os testes comportamentais para se verificar níveis de ansiedade em animais experimentais (Pellow et al., 1985; Carobrez e Bertoglio, 2005; Marco et al., 2006). Esse teste é muito utilizado por possuir inúmeras vantagens: é um teste rápido, econômico, de simples realização, e sensível bidirecional a drogas (sensível a efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos), além disso, é um teste que não requer procedimentos como privação de comida/água ou uso de choques elétricos (Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1997). Esse teste, LCE, foi validado em espécies como camundongos (Lister, 1987), ratos (Pellow et al., 1985) porquinhos da Índia (Rex et al., 1994), hamsters sírios (Yannielli et al., 1996), e cobaias (Hendrie et al., 1997). Geralmente os roedores preferem as partes fechadas e protegidas por paredes do aparelho, e evitam as áreas abertas do labirinto, pois são mais aversivas, ou seja, ansiogênicas (Pellow et al., 1985; Marco et al., 2006). As medidas de ansiedade são avaliadas pelo tempo e pelas entradas no braço aberto (Hogg, 1996; Rodgers e Dalvi, 1997; Abreu-Villaça et al., 2008; Manhães et al., 2008; Fraga-Marques et al., 2009, 2010; Fraga et al., 2011, 2014).

### **Modelos experimentais de comportamento em animais: Modelo de busca pela novidade/atividade exploratória**

O comportamento de busca pela novidade, observado quando o animal aumenta a exploração de objetos ou estímulos desconhecidos, é um dos comportamentos mais investigados como fator de predisposição ao uso de drogas (Abreu-Villaça et al., 2006). Diversos trabalhos sugerem que a busca pela novidade nos roedores pode ser utilizada na avaliação de alguns aspectos da “busca por sensações estimulantes” nos seres humanos (Dellu-Hagerdon, 2006; Kliethermes et

al., 2007). Os modelos experimentais em animais têm observado que o abuso de drogas psicoestimulantes e de alimentos saborosos é mais frequente quando há um aumento do comportamento de busca pela novidade, os quais estão associados ao mesmo substrato neurobiológico: a ativação de estruturas e vias mesolímbicas (Piazza et al., 1989; Wills et al., 1994; Bardo et al., 1996; Bardo e Dwoskin, 2004; Abreu-Villaça et al., 2006; Pelloux et al., 2006). A ativação desse sistema cria uma sensação de prazer e modula os sinais fisiológicos de saciedade, que promovem o consumo de alimentos mais palatáveis ou de drogas de abuso (Erlanson-Albertsson, 2005). Ratos que exploram mais novos ambientes apresentam aumento nos níveis de dopamina no núcleo accumbens, e essa associação frequentemente tem sido associada ao fenômeno de recompensa (Hoebel et al., 1983; Robbins e Everitt, 1996; Wise, 1996; Ikemoto e Wise, 2004).

Estudos em animais avaliam tal comportamento utilizando o teste de campo vazado (CV) (Escorihuela et al., 1999; Vaglenova et al., 2004). Este teste padronizado por Boissier e Simon (1962), tem como medida a atividade exploratória (File e Wardill, 1975; Durcan e Lister, 1989; File, 2001). O número de orifícios que o animal explora é utilizado para avaliar a atividade exploratória que representa a busca por novos estímulos (Escorihuela et al., 1999; Abreu-Villaça et al., 2006; Fraga-Marques et al., 2009, 2010; Fraga et al., 2011, 2014), fator predisponente para o uso drogas (Dellu-Hagerdon, 2006; Kliethermes et al., 2007).

### **Programação metabólica ou plasticidade ontogenética**

Diversos distúrbios crônicos que se manifestam na vida adulta, como por exemplo, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, asma, ansiedade e depressão, podem ter suas origens no início da vida (Barker, 1995; Charney e Bremner, 1999). Estudos epidemiológicos e clínicos têm demonstrado que alterações hormonais, nutricionais e ambientais que ocorreram em períodos críticos do desenvolvimento do indivíduo, podem levar a alterações permanentes nos parâmetros fisiológicos e comportamentais na fase adulta (Lucas, 1994; Barker, 2003). A idéia de “origem fetal” é baseada em estudos clínicos e epidemiológicos, onde o peso ao nascimento foi relacionado a desordens metabólicas na idade adulta (Lucas, 1994; Barker, 2004; De Moura e Passos, 2005; De Moura et al., 2008). As fases de lactação e de gestação representam períodos de intenso crescimento,

replicação e diferenciação celular. Durante essas fases, há uma sensibilidade em relação às alterações do meio na vida intra-uterino e neonatal, gerando distúrbios na estrutura e função, que podem ser permanentes na idade adulta. Baseando-se na hipótese do “fenótipo de poupança”, acredita-se que o feto se adapta às condições adversas no meio intra-uterino, utilizando de forma otimizada a menor quantidade de nutrientes e gastando o mínimo de energia, podendo garantir sua sobrevivência. Porém, isso resulta em prioridades no desenvolvimento de alguns órgãos em detrimento de outros, causando assim permanentes alterações na função e no crescimento de diversos tecidos (Simmons, 2005). Sabe-se que o cérebro, durante o período de lactação, passa por mudanças significativas no seu desenvolvimento (Spencer et al., 2006), pois nesse período acontece um importante desenvolvimento cognitivo e neurológico (De Moura e Passos 2005; Miñana-Solis e Escobar, 2006, De Moura et al., 2008). Portanto, condições nutricionais adequadas se tornam essenciais no crescimento saudável da prole, porque atuam como um fator de *imprinting* para futuras respostas fisiológicas. Em alguns casos, na gestação e na lactação, mesmo após as condições do meio serem restauradas aos padrões normais, permanecem algumas funções com alterações, passando de uma vantagem adaptativa para se tornarem deletérias para o organismo. A esse processo dá-se o nome de programação metabólica (Barker, 1995, 2003, 2004; Gordon, 1997) ou plasticidade ontogenética (Gluckman e Hanson, 2007), e o período que o organismo está susceptível as intervenções é chamado de período crítico de programação (Lucas, 1994).

Vários estudos têm sido realizados para testar a hipótese da “origem fetal” ou “programação”, alterações como a desnutrição materna, ingestão de dietas hipercalóricas ou hiperlipicas e, a exposição a hormônios ou disruptores endócrinos na gestação e/ou lactação (De Moura e Passos, 2005; De Moura et al., 2008). A maioria destes estudos confirmam que estas alterações causam excesso de peso (Passos et al., 2000), aumento na adiposidade visceral, redução na sensibilidade a insulina ou de sua secreção (Holemans et al., 1996), elevação da pressão arterial (Langley-Evans et al., 1996; Woodall et al., 1996), dislipidemias, alterações no eixo HHT ou HPA (Lisboa et al., 2008; Teixeira et al., 2003; De Moura et al., 2008) e uma resistência na ação anorexigênica da leptina (Passos et al., 2004, Toste et al., 2006a, b; Bonomo et al., 2007; Pereira-Toste et al., 2009).

A desnutrição causada no período neonatal gera hipoleptinemia no início e meados da lactação, e hiperleptinemia ao desmame (Teixeira et al., 2002). A desnutrição causada através do bloqueio farmacológico da prolactina no final da lactação, da mesma forma, causa aumento da leptina que passa pelo leite e hiperleptinemia na prole (Bonomo et al., 2005). Com base nesses fatos, surgiu a hipótese de que a leptina nesta fase, seria um fator hormonal para a programação decorrente da desnutrição neonatal.

### **Programação metabólica pela hiperleptinemia neonatal**

Fomos o primeiro grupo a demonstrar que a hiperleptinemia neonatal programa para hiperleptinemia na idade adulta e maior massa corporal (De Oliveira Cravo et al., 2002). A seguir, Bouret e Simerly (2004) e Pinto et al (2004) sugeriram que a hiperleptinemia no início da vida altera a circuitaria neural de forma permanente, em especial nos neurônios hipotalâmicos reguladores da fome e saciedade, mas que este efeito não continua com o desenvolvimento. A seguir mostramos diversas disfunções endócrino-metabólicas das proles adultas, que foram tratadas durante a lactação com leptina nos 10 primeiros dias de vida ou nos 10 últimos dias de lactação (De Oliveira Cravo et al., 2002, Teixeira et al., 2003, Toste et al., 2006a,b; Trevenzoli et al., 2007). A programação realizada por injeção de leptina nos ratos aos 10 primeiros dias da lactação, resulta em hiperleptinemia, aumento do peso corporal e hiperfagia na idade adulta (De Oliveira Cravo et al., 2002; Toste et al., 2006b), resistência na ação anorexigênica da leptina, redução na expressão do seu receptor hipotalâmico (Toste et al., 2006b), hipertireoidismo (Toste et al., 2006a), aumento da função adrenal, como aumento de secreção de catecolaminas, hipertensão, hipercorticosteronemia (Trevenzoli et al., 2007; Fraga-Marques et al., 2009) e esteatose hepática (Trevenzoli et al., 2010), hipertrigliceridemia e resistência a insulina (Toste et al., 2006a). Além dessas alterações que podem produzir maior risco cardiovascular e modificações comportamentais, Fraga-Marques et al (2009) observaram as alterações comportamentais com maior ansiedade e busca por novos estímulos (atividade exploratória). Em outro modelo, no qual as ratas lactantes receberam leptina durante os 10 primeiros dias de lactação (Lins et al., 2005; Pereira-Toste et al., 2009), suas proles adultas cursaram com sobrepeso por acúmulo de gordura (Lins et al., 2005),



alterações hormonais e metabólicas (Lins et al., 2005; Pereira-Toste et al., 2009; Passos et al., 2012) que são semelhantes ao primeiro modelo, mas as alterações comportamentais diferiram, por uma menor ansiedade e melhor desempenho de memória e aprendizado (Fraga-Marques et al., 2010). Foi sugerido que a leptina pode ser transferida pelo leite materno e programar para hiperfagia e aumento do peso corporal. A hiperleptinemia neonatal afeta o comportamento de ratos adultos, porém os resultados comportamentais parecem ser dependentes da via de administração da leptina. Quando a leptina foi injetada diretamente nos filhotes causou alterações endócrinas diferentes de quando foi aplicada na mãe e passada pelo leite para os filhotes. Um parâmetro, por exemplo, seria a concentração de corticosterona, que no modelo de leptina aplicada diretamente no filhote estava aumentada causando então aumento de ansiedade; e no modelo onde a leptina foi passada pelo leite, não foi encontrada alteração na corticosteronemia. Esse pode ser um fator a contribuir para os diferentes resultados comportamentais desses animais (Fraga-Marque et al., 2009).

Uma variedade de distúrbios compõe a síndrome metabólica (SM): obesidade, em especial o acúmulo de gordura abdominal, resistência a insulina, hiperglicemia de jejum, hipertrigliceridemia, hipertensão, os quais aumentam fortemente o risco cardiovascular (Van der Merwe, 2007; Brook et al., 2009; Damsgaard et al., 2014). Analisando os parâmetros somáticos, endócrinos e metabólicos, os animais, tratados com leptina no período neonatal, apresentaram quando adultos, alguns componentes da SM, como hipertrigliceridemia e hipertensão (Trevenzoli et al., 2007), além de outras alterações (sobrepeso, hiperfagia, hiperleptinemia e hiperinsulinemia) que podem ter um papel fundamental no fenômeno de programação (Passos et al., 2004; Toste et al., 2006a,b; Trevenzoli et al., 2007; Fraga-Marques et al., 2009).

Tem sido demonstrada uma associação entre obesidade ou síndrome metabólica e distúrbios cognitivos e comportamentais (Yaffe, 2007; Lee et al., 2009; Arnold et al., 2014). Em modelos experimentais em animais, observamos a presença de SM concomitante a distúrbios comportamentais, como aumento dos níveis de ansiedade e de atividade exploratória (Fraga-Marques et al., 2009) e aumento dos níveis de ansiedade e déficit de aprendizagem e memória (Fraga et al., 2011) na idade adulta.

Em 2004, os transtornos mentais representaram 13% das doenças globais (OMS, 2013). Acredita-se que 32% a 65% dos indivíduos adultos já sofreram, em

algum momento, algum tipo de transtorno mental (Wittchen et al., 1991; Perkonigg et al., 1998). A OMS, em janeiro de 2012 analisou o impacto global causado pelos transtornos psiquiátricos, e identificou que os problemas de saúde mental têm grande impacto em todas as sociedades, impedem sua participação de forma plena e efetiva na sociedade, contribuindo para a perda da qualidade de vida e da saúde das pessoas, e ainda representa grandes custos econômicos e sociais para todos os países, independente de sua cultura, religião ou nível econômico. Um estudo na cidade de São Paulo relatou que 30% dos entrevistados apresentaram algum tipo de sintoma relacionado aos transtornos psiquiátricos em 12 meses; os mais comuns foram transtornos de ansiedade (19,9%), alterações de humor (11%), dificuldade no controle dos impulsos (4,3%), e uso abusivo de substâncias químicas (3,6%) (Andrade et al., 2012).

### **Ambiente Enriquecido (AE)**

O ambiente enriquecido (AE) consiste em uma rica experiência sensório-motora (Kohl et al., 2002) podendo ser composto de estimulação sensorial passiva e ativa, como por exemplo, brinquedos de diferentes texturas, incentivo na realização de exercícios físicos através da roda giratória, rampa (Nithianantharajah e Hannan, 2009; Redolat e Mesa-Gresa, 2012; Fares et al., 2013), aumento do contato social e adição de novos estímulos (Renner e Rosenzweig, 1987; Pamplona et al., 2009). Tem sido sugerido que a complexidade e novidade desse tipo de ambiente definem as características (Pang e Hannan, 2013). Em animais, o AE consiste em uma caixa ampla e atrativa, onde os animais são colocados em grupo, a qual apresenta uma variedade de objetos estimulantes os quais são trocados e substituídos regularmente por outros que estimulem o comportamento exploratório, a curiosidade e a atenção (Sale et al., 2012). Em seres humanos, o AE é utilizado por profissionais de diferentes áreas de atuação como fisioterapeutas, psicomotricistas, educadores físicos e fonoaudiólogos os quais, através de métodos como Cadeias musculares e articulares Godelieve Deny'stroyf (GDS), Método Béziers, Treinamento Funcional, dentre outros, promovem o desenvolvimento afetivo, cognitivo e orgânico (Silva et al., 2006).

Diversos trabalhos têm demonstrado que o AE induz modificações morfológicas, neurobiológicas, fisiológicas e comportamentais (Kempermann et al., 1997b; Van Praag et al., 2000; Pryce et al., 2002). Estudo clássico realizado por Bennett et al (1964), em ratos, sugeriu que a exposição à este ambiente resulta em mudanças anatômicas e neuroquímicas. Estas modificações estariam associadas à maior neurogênese, neuroproteção e mudanças na estrutura sináptica (Kempermann et al., 1997a; Van Praag et al., 2000), aumento do tamanho do cérebro e da espessura cortical (Eckert e Abraham, 2013; Van Praag et al., 2000), além de estimular a plasticidade sináptica (Leger et al., 2012a,b; Nithianantharajah e Hannan, 2011). O estímulo ambiental modula o sistema monoaminérgico e colinérgico, sendo benéfico no tratamento de diversas doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (Bezard et al., 2003; Solinas et al., 2009).

Pesquisas em ratos mostraram que o AE no período de lactação (Kempermann et al., 1999), pós-desmame (Nilsson et al., 1999) e na idade adulta (Kempermann et al., 1997; Nilsson et al., 1999) estimula a neurogênese no hipocampo durante toda a vida (Cameron et al., 1993). Estas modificações anatômicas resultam em melhora da função cognitiva observada através da melhora da memória e aprendizagem (Van Praag et al., 2000; Leggio et al., 2005), função dependente do hipocampo (Kempermann et al., 1998a). Pois além de efeitos cognitivos, o ambiente enriquecido traz também benefícios comportamentais como, por exemplo, na modulação do humor e no contato social (Levin, 2014). Foi observado que animais submetidos ao AE no período de lactação, quando expostos ao campo vazado, na idade adulta, apresentaram maior atividade no centro do equipamento (Kohl et al., 2002), o que representa menor nível de ansiedade (Thiel et al., 1999). Foi observado em animais submetidos ao AE níveis mais baixos de ansiedade quando testados no labirinto em cruz elevado (Sztainberg et al., 2010). Estes achados corroboram estudos prévios que demonstram que o ambiente rico em estímulos reduz a ansiedade e o medo (Pascual et al., 1996; Van Praag et al., 2000; Chapillon et al., 2002; Urakawa et al., 2013; Baldini et al., 2013). Em animais, foi demonstrado que o AE aumenta a expressão de marcadores colinérgicos no cérebro de ratos jovens e idosos (Van Praag et al., 2000), reduz a resposta do sistema colinérgico ao estresse (Del Arco et al., 2007). Em seres humanos, o AE, pode ser uma importante intervenção clínica para minimizar os efeitos devastadores da ansiedade (Ravenelle et al., 2014), como já tem sido observado em crianças autistas

(Woo e Leon, 2013). Outros trabalhos observaram que animais mantidos em ambiente rico em estímulos apresentam redução do comportamento agressivo (Armstrong et al., 1998) e melhor interação social (Nithianantharajah e Hannan, 2011; Van Praag et al., 2000).

Também foi demonstrado que animais expostos ao AE além de obterem melhor resposta ao estresse apresentaram redução do nível de corticosterona (Liu et al., 2000; Kohl et al., 2002; Ilin e Richter-Levin, 2009). Foi observado que a corticosterona afeta a memória e a plasticidade cerebral (Makino et al., 1999). Os níveis de corticosterona são tradicionalmente utilizados como marcador dos níveis de estresse, ansiedade e depressão (Holsboer, 2000; Wong et al., 2000; Cassano et al., 2001; Pryce et al., 2005), distúrbios que interagem entre si. Acredita-se que, em situações de estresse crônico, a perda de neurônios esteja relacionada com a toxicidade dos glicocorticóides (Conrad et al., 2007; Li et al., 2011).

O enriquecimento ambiental também modula comportamento de busca por novos estímulos reduzindo sua atividade exploratória. Foi observado que animais submetidos ao AE demonstraram redução no comportamento exploratório (Brenes et al., 2009; Van Praag et al., 2000). Observou-se que ratos SHR expostos ao ambiente enriquecido apresentaram redução da sua sintomatologia, como menor atividade exploratória e locomotora, quando submetidos a ambientes novos (Pamplona et al., 2009; de Carvalho et al., 2010). O SHR é uma linhagem espontaneamente hipertensa, que “naturalmente” apresenta características do transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) (Russel, 2007). Também foi observado em seres humanos, que o estímulo ambiental reduz o risco da doença de Alzheimer (Friedland et al., 2001). Estas observações suportam a hipótese de que fatores ambientais podem determinar criticamente a expressão fenotípica, mesmo de traços altamente herdáveis (Pigliucci, 1998).

Além destes efeitos cognitivo-comportamentais, foi demonstrado que camundongos que viveram em AE durante a infância e/ou adolescência apresentaram aumento da sensibilidade a leptina e a insulina na idade adulta, demonstrando que modificações no estilo de vida durante o desenvolvimento podem modificar os circuitos neurais de modo permanente, sendo assim, o AE pode ser utilizado como proposta terapêutica comportamental na prevenção da obesidade e *diabetes mellitus* (Mainardi et al., 2010).

O ambiente rico em estímulos tem sido amplamente utilizado em estudos que avaliam a interação entre o ambiente e as lesões cerebrais, idade e genes (Mohammed et al., 1993; Spire e Hannan, 2005), sendo então sugerido como uma potencial abordagem não-farmacológica para as desordens neurológicas.

### **Justificativa**

Como descrito acima, a leptina frequentemente tem efeitos positivos no comportamento, contudo, como demonstramos a hiperleptinemia em períodos críticos do desenvolvimento, como o período neonatal, resulta em maior ansiedade e aumento da atividade exploratória em animais adultos. Este aparente paradoxo suporta a hipótese de que a hiperleptinemia no início da vida altera a circuitaria neural de forma permanente, resultando em resistência central a leptina na vida adulta.

Assim, continuamos buscando novos conhecimentos que permitam elucidar os mecanismos básicos, em nível bioquímico, hormonal, das alterações em curto e longo prazo do fenômeno de programação neonatal de doenças futuras, sobretudo das disfunções cognitivo-comportamentais. Conhecer estes mecanismos pode nos ajudar a prevenir ou reverter os efeitos da programação, ou seja, reprogramar os animais, revertendo sua maior tendência a desenvolver distúrbios hormonais, metabólicos e comportamentais. Conseguimos reverter algumas alterações da programação pela hiperleptinemia neonatal através da exposição ao frio. Estes animais, que apresentavam quando adultos, resistência à insulina e à leptina (baixos níveis hipotalâmicos do receptor de leptina) exibiram normalização do receptor de leptina e da concentração sérica de leptina e insulina, que se encontravam aumentadas (Dutra et al., 2007). Uma vez que já conseguimos melhorar a sensibilidade à leptina e à insulina no modelo da hiperleptinemia por que não começarmos a desenvolver estratégias para prevenir o surgimento das alterações comportamentais e as demais alterações endócrino-metabólicas a longo prazo induzidas pela hiperleptinemia neonatal?

Desta forma, tendo em vista: 1) a associação entre hiperleptinemia neonatal, resistência a leptina e prejuízos comportamentais e endócrinos na vida adulta; 2) o fato do AE despertar a atividade motora e, conseqüentemente, prevenir o

sobrepeso, além de melhorar a sensibilidade a leptina; 3) a grande variedade de estudos demonstrando o potencial do AE em melhorar diversos parâmetros comportamentais, nos propusemos testar a hipótese de que o AE reverte os efeitos cognitivo-comportamentais observados em modelo de programação pela hiperleptinemia neonatal.

## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo geral**

Investigar, através de estudo longitudinal, as alterações comportamentais ocasionadas pela programação pela hiperleptinemia nos dez primeiros dias de vida. Avaliar se estas alterações podem ser revertidas pela exposição ao ambiente enriquecido durante a adolescência. Analisar a relação destas alterações com o perfil endócrino-metabólico dos animais.

### **1.2 Objetivos específicos**

Em ratos tratados com leptina nos dez primeiros dias de vida, avaliamos em diferentes períodos, diversos parâmetros hormonais (PN10, PN21, PN30, PN45, PN75 e PN150) e comportamentais (PN21, PN30, PN45, PN75 e PN150) quando estes foram mantidos em gaiolas padrões de biotério durante a adolescência ou quando foram expostos ao ambiente enriquecido durante a adolescência (PN30 a PN45):

- os níveis de ansiedade dos animais quando submetidos ao labirinto em cruz elevado;
- a busca por novidade dos animais quando submetidos ao campo vazado;
- os níveis de ansiedade e o comportamento de busca por novidade após a exposição ao ambiente enriquecido (PN45, PN75 e PN150);
- a massa e a composição corporal da lactação até a idade adulta e se o AE pode influenciá-la;
- os níveis séricos de leptina, insulina, corticosterona e hormônios tireóideos durante o desenvolvimento dos animais;

- a glicemia e o perfil lipídico durante o desenvolvimento dos animais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos descritos a seguir, foram previamente aprovados, pelo Comitê de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA/02/2013), que segue as diretrizes adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a Lei n 11.794, sancionada em 2008. Todos os experimentos foram realizados para minimizar o número de ratos e, o sofrimento causado pelos procedimentos, seguindo a doutrina ética dos três “Rs” – redução, refinamento e substituição (Reduction, Refinement, Replacement) (Drummond, 2009; Marques et al., 2009).

### Animais

Ratas Wistar nulíparas com três meses de idade, foram mantidas no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UERJ, com temperatura ( $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (7:00h-19:00h) controlados. Durante o acasalamento as ratas foram mantidas em gaiola padrão de laboratório (39 cm comprimento x 32 cm largura x 16 cm altura) e acasaladas na proporção de três fêmeas para um macho, com ração comercial (Purina®, São Paulo) e água *ad libitum*. As ratas encontradas grávidas foram separadas em gaiolas individuais (29 cm comp x 18 cm larg x 12 cm alt), observadas diariamente quanto ao nascimento dos filhotes. As ninhadas utilizadas foram as que as mães tiveram entre 8 e 12 filhotes. No dia do nascimento dos filhotes, cada ninhada foi reduzida a 6 filhotes machos com o objetivo de se obter maior potencial lactotrófico (Fishbeck et al., 1987) e os filhotes foram mantidos juntos durante todo o experimento em gaiolas (39cm comp x 32cm larg x 16cm alt).

### 2.1 Modelo experimental

Um total de 90 (noventa) ninhadas foi utilizado neste experimento. Após o nascimento, cada animal foi identificado possibilitando-nos acompanhar sua

evolução durante todo o experimento. Assim, cada ninhada foi dividida em 2 grupos: 1) controle: os animais foram marcados com caneta, de tinta atóxica, no rabo identificando filhote 1, 2 ou 3 os quais receberam 1, 2 ou 3 marcações, respectivamente; 2) leptina: os filhotes foram tatuados, utilizando um tatuador o qual furava e liberava tinta verde na pata dianteira direita ou esquerda, ou na pata traseira direita sinalizando assim filhotes leptina 4, 5 e 6, respectivamente. Os animais controles também receberam a mesma marcação na pata, porém sem a tinta.

Sendo assim inicialmente foram obtidos 2 grupos experimentais:

1) Grupo Controle (C): recebeu injeção com 50  $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,9%), via subcutânea, aplicada diariamente durante os 10 primeiros dias da lactação (PN1-PN10);

2) Grupo Leptina (L): recebeu injeção de leptina, (recombinant mouse Leptin – National Hormone and Pituitary Program, Harbor-UCLA, Medical Center, CA, USA), via subcutânea, na dose de 8 $\mu$ g/100g de peso, diluída em 50 $\mu$ L de salina, aplicada diariamente de PN1 a PN10.

Ao final do tratamento (PN10), algumas ninhadas foram sacrificadas duas horas após a administração de leptina ou salina, e o sangue foi coletado para determinação da leptina sérica. Além do sangue, outros tecidos também foram coletados para análises posteriores.

Em PN30 houve subdivisão das ninhadas. Parte das ninhadas foi alocada em novas condições de habitação (gaiola de ambiente enriquecido), enquanto outra parte, nascida em mesmo período, permaneceu em gaiola padrão. Sendo assim obtivemos 4 (quatro) grupos experimentais:

1) Grupo C: exposto a salina no período neonatal;

2) Grupo L: exposto a leptina no período neonatal;

3) Grupo CAE: exposto a salina no período neonatal e ao ambiente enriquecido na adolescência;

4) Grupo LAE: exposto a leptina no período neonatal e ao ambiente enriquecido na adolescência.



Os animais C e L permaneceram em gaiola padrão e os animais CAE e LAE permaneceram no ambiente enriquecido durante a adolescência (PN30 a PN45) e retornaram a gaiola padrão em PN46.

Assim, analisamos os animais antes e após a exposição ao ambiente enriquecido, ou seja, em PN10, PN21, PN30, PN45, PN75 e PN150. Como cada ninhada continha 6 filhotes (3 animais controles e 3 leptina) e as análises foram realizadas em 6 idades, realizamos basicamente 2 experimentos em paralelo. No primeiro experimento 2 animais (um controle e um leptina) foram analisados em PN10 (média de 8 ninhadas por grupo), PN21 (média de 12 ninhadas por grupo) e PN30 (média de 15 ninhadas por grupo). No segundo experimento, um de cada grupo foi analisado em PN45 (média de 14 ninhadas por grupo), PN75 (média de 13 ninhadas por grupo) e PN150 (média de 14 ninhadas por grupo).

## **2.2 Ambiente enriquecido**

O ambiente enriquecido (AE) consiste de experiências sensório-motoras; é composto por brinquedos de diferentes formatos, cores e texturas, estruturas para escalar, escada, rampa, túnel, roda giratória, adição de novos estímulos. Foram utilizadas quatro tipos de AE, sendo assim a troca do tipo de gaiola de AE e dos tipos de brinquedos ocorria a cada 4 dias em 3 dos tipos de gaiolas e em 3 dias no último tipo da gaiola. Todos os animais passaram pelos 4 tipos de gaiola, em ordem da menor gaiola (Tipo 1), para a maior gaiola (Tipo 4).

As gaiolas apresentavam aproximadamente as seguintes medidas: gaiola 1) 60cm de comprimento, 40cm de largura, 47cm de altura; gaiola 2) 80cm de comprimento, 52cm de largura, 50cm de altura; gaiola 3) 60cm de comprimento, 60cm de largura, 60cm de altura; gaiola 4) 60cm de comprimento, 60cm de largura, 1,20m de altura.

Figura 3. Vista de uma das gaiolas de Ambiente Enriquecido



### 2.3 Testes comportamentais

Diferentes grupos de animais foram submetidos à testes comportamentais em PN21, PN30, PN45, PN75 e PN150, os quais foram filmados e analisados posteriormente. Em PN10 não foi realizado nenhum teste comportamental, pois os olhos dos animais ainda não estão abertos.

Antes dos testes comportamentais serem iniciados, os animais foram levados à sala de testes, permanecendo por 10 minutos, a fim de promover uma ambientação no local da sala de testes, de maneira a não comprometer as análises comportamentais. No momento do teste, o animal é colocado no equipamento e permanece sozinho na sala. Após o teste, o avaliador retornava e retirava o animal do equipamento. Os testes eram realizados sempre no período da tarde, começando com o teste de ansiedade, após 1 (uma) hora, os animais foram submetidos ao teste de busca por novos estímulos. Foram utilizados protocolos de testes comportamentais para controle dos testes realizados e identificação do animal testado, contendo neste protocolo informações, tais como dia e horário da realização de cada teste (ANEXO 1). Os testes realizados por cada animal foram filmados, utilizando para isso câmera filmadora Sony Standard Definition DCR-PJ6 (Preta com LCD de 2,7", Zoom Óptico 70x, Estabilizador de Imagem, Projetor Integrado 60'+ Cartão de 4GB). As análises dos vídeos foram realizadas pelo pesquisador através do programa ACC PlusM 102 Avaliação Computadorizada de Comportamento, desenvolvido no laboratório de neurofisiologia (DCF/IBRAG/UERJ). Para avaliação

do teste de ansiedade foi utilizado: ACC PlusM 102 e Anl Plus M Ext 102, e para o teste de busca por novos estímulos: ACC OpF HB Rat e Anl OpF HB Rat Ext, possibilitando assim a transformação de dados qualitativos em dados quantitativos.

### 2.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

Figura 4. Vista superior do Labirinto em cruz elevado



O teste do labirinto em cruz elevado é uma das formas de detecção de alterações nos níveis ansiedade, sendo o teste comportamental mais utilizado em modelo animal de ansiedade (Carobrez e Bertoglio, 2005). Para esse teste utiliza-se um equipamento que tem formato de cruz contendo dois braços abertos (BA), dois braços fechados (BF), e uma área central entre os braços. Para os animais de PN21 e PN30 utilizamos um equipamento medindo 31cm de altura. Os braços apresentam 6cm de largura, 67cm de comprimento e, no caso dos braços fechados, as paredes apresentam 16cm de altura. Para os animais de PN45, PN75 e PN150, foi utilizado um equipamento maior: os braços com 50cm de comprimento x 10cm de largura, e as paredes dos braços fechados com 40cm de altura. Esses braços ficam dispostos de forma perpendicular e elevados a 50cm do chão (Fig.1). Para dar início ao teste o animal é colocado na área central com a cabeça voltada para o braço aberto e seu comportamento é monitorado por uma câmera de vídeo durante 10 minutos. Após os 10 minutos o animal é retirado do equipamento. Antes que outro animal seja colocado, o equipamento é limpo com papel toalha e etanol a 70%. O teste foi realizado entre 13 e 18h.

A partir das imagens gravadas, foram quantificados o tempo que o animal ficou em cada local do equipamento (braços abertos, braços fechados e centro), e o número de vezes que ele entrou em cada local. Uma entrada foi contabilizada quando o animal cruzava com as quatro patas um braço. As variáveis utilizadas como índices de ansiedade foram o tempo que o animal permaneceu nos braços abertos (Tempo BA) e seu percentual ( $\% \text{Tempo BA} = \frac{\text{Tempo BA}}{\text{Tempo BA} + \text{Tempo BF}}$ ), número de entradas nos braços abertos (Entradas BA), e seu percentual ( $\% \text{Entradas BA} = \frac{\text{Entradas BA}}{\text{Entradas BA} + \text{Entradas BF}}$ ). (Pellow et al., 1985; Fraga-Marques et al., 2009, 2010). A avaliação do comportamento associado à ansiedade baseia-se na observação de que o BA constitui um ambiente aversivo para o animal, onde além de desprotegido ele está sujeito à queda, assim, a permanência no braço aberto indica que o animal se arrisca mais explorando todos os braços do aparelho, refletindo um estado de menor ansiedade (Rodgers et al., 1997). A atividade locomotora foi avaliada através do número de entradas no braço fechado (Entradas BF) (Rodgers et al., 1997; Fraga et al., 2011, 2014). Também foi avaliado a tomada de decisão, caracterizada pelo tempo que o animal despendia no centro do EPM (Tempo CN). O aumento neste comportamento que tem sido associado a maior risco de dependência a drogas e à comida (Wills et al., 1994; Palm et al., 2014).

### 2.3.2 Campo vazado (CV)

Figura 5: Vista superior do Campo vazado



O teste do campo vazado é uma das formas de avaliar a atividade exploratória, a avaliação de busca por novos estímulos (Escorihuela et al., 1999; Abreu-Villaça et al., 2006; Fraga-Marques et al., 2009, 2010). A busca pela novidade, representada pelo aumento da exploração de estímulos desconhecidos, é um dos comportamentos mais estudados como fator predisponente para o uso de drogas (Piazza et al., 1989; Wills et al., 1994; Bardo et al., 1996; Bardo e Dwoskin, 2004; Abreu-Villaça et al., 2006; Pelloux et al., 2006). Este equipamento consiste numa arena retangular, medindo 80cm de comprimento x 50cm de largura x 60cm de profundidade. O piso da arena apresenta 16 orifícios de 4cm de diâmetro, espaçados de maneira uniforme (Fig. 2), onde o animal pode inserir o nariz ou a face para explorá-lo. Para a realização deste teste, os animais foram colocados individualmente dentro da caixa, com a face voltada para um dos cantos da caixa. A cada animal foi permitido 10 minutos para explorar a arena. Antes que outro animal fosse colocado, o equipamento foi limpo com papel toalha e etanol a 70%.

A partir das imagens gravadas, foi quantificado o número de orifícios explorados, o qual é utilizado como índice da atividade exploratória, indicando um comportamento de busca por novidade (Fraga-Marques et al., 2009, 2010). O teste foi realizado entre 13 e 18h.

No dia posterior a realização dos testes comportamentais os animais foram sacrificados.

## **2.4 Análise da massa e composição corporal**

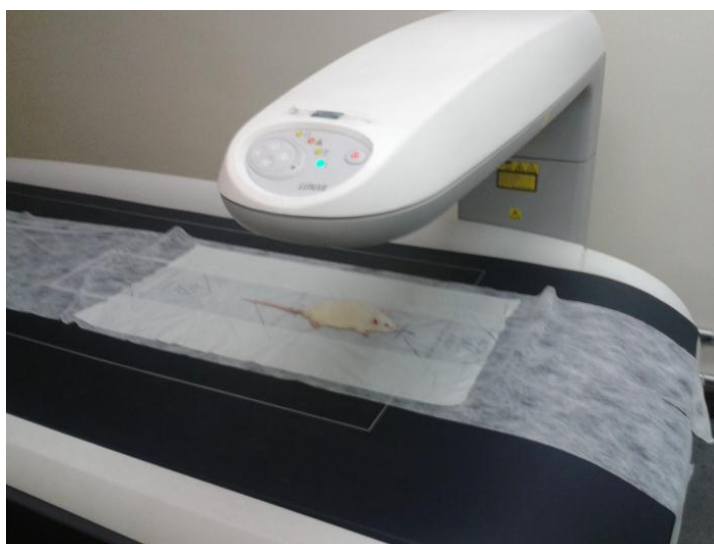
### **2.4.1 Peso corporal**

Durante os 21 dias da lactação, os filhotes foram pesados diariamente. Em PN21 foi realizado o desmame e após este período, a massa corporal foi verificada a cada quatro dias. Para aferir a massa dos animais foi utilizada a balança de precisão MF Filizola (São Paulo, Brasil), sempre no mesmo período do dia.

### **2.4.2 DXA**

Antes do sacrifício, os animais foram submetidos em PN21, PN45 e PN150 a análise corporal através do DXA. Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de 2:1 de cloridrato de cetamina (Cetamin®), 50mg/ml, e Cloridrato de Xilazina (Xilazin®), na dosagem de 20mg/ml e de 0,1ml/100g, respectivamente, e submetidos ao DXA (Lukaski et al., 2001; Glickman et al., 2004), utilizando o instrumento Lunar DXA 200368 GE (Wisconsin, EUA), usando software específico (encore 2008. Versão 12,20 GE Healthcare, Wisconsin, EUA, Figura 4). Foram avaliados em cada rato, a massa corporal total, a massa magra total (g), a gordura corporal total (g) e a massa de gordura do tronco (%).

Figura 6: Animal sendo analisado no aparelho Lunar DXA 200368 GE



#### 2.4.3 Massa de Gordura Visceral (MGV)

Para avaliação da adiposidade central, foi dissecada e pesada a massa de gordura visceral (MGV), que consiste na soma dos depósitos de gordura do retroperitônio, mesentério e epidídimo (Hansen et al., 1997).

#### 2.5 **Dosagens plasmáticas**

Ao fim de cada período experimental (PN10, PN21, PN30, PN45, PN75, PN150), os animais foram sacrificados por decapitação e amostras de sangue,

adrenais e tecidos adiposo coletados para futuras análises. O sangue do animal foi coletado por um funil de vidro e colocado em recipiente de vidro, ambos estéreis e com heparina (10µl em cada) para evitar a coagulação. Foram utilizados 1500 g/20 min a uma temperatura de 4°C (centrífuga Hitachi CR22, Hitachinaka, Fábrica no Japão), após a centrifugação foi retirado somente o plasma, armazenado em eppendorfs no freezer a -20°C para análises futuras.

#### 2.5.1 Glicemia

A glicemia de jejum foi medida antes do sacrifício, com auxílio de um glicosímetro (ACCU-CHEK ®Advantage - ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim, Alemanha), baseado na reação glicose-glicose oxidase. O sangue foi coletado da veia caudal dos animais.

#### 2.5.2 Leptina

A leptinemia foi determinada pelo teste imunoenzimático (ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) comercial para ratos (Rat Leptin 96-Well Plate Assay Cat.#EZRL-83K, Charles, Missouri, EUA). Os valores foram expressos em ng/mL. A sensibilidade do ensaio foi de 0,2 ng/ml e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 6,38%.

#### 2.5.3 Corticosterona

A corticosteronemia foi avaliada através de radioimunoensaio (RIE) comercial (ImmuChem™ 125I, duplo anticorpo, ICN Biomedicals, Inc., EUA). Os valores foram expressos em ng/dL. A sensibilidade do ensaio foi de 25 ng/ml e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 7,1%.

#### 2.5.4 Hormônios tireoidianos

As concentrações plasmáticas de T<sub>3</sub> total e T<sub>4</sub> livre foram dosadas por RIE, utilizando kit comercial da ICN Pharmaceuticals, Inc. Os valores foram expressos em

ng/dL. A sensibilidade do ensaio foi de 50 ng/dL (T3) e 0,3 ng/dL (T4) e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 5,6% (T3) e 6,5% (T4).

### 2.5.5 Insulina

A insulina foi determinada por RIE (ImmuChem™, MP Biomedicals, LLC Diagnostics Division 29525 Fonte Parkway Solon, Ohio). Os valores foram expressos em ng/dL. A sensibilidade do ensaio foi de 5,5 µUI/ml e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 7,7%.

### 2.5.6 Perfil lipídico

O colesterol total (mg/dL), o HDL-c (mg/dL), os triglicerídeos (mg/dL), as proteínas totais (g/dL), a albumina (g/dL), foram dosados utilizando kits comerciais que se baseiam em métodos enzimático-colorimétricos (Biosystems® Barcelona, Espanha) em amostras do plasma das proles.

O LDL-c e o VLDL-c foram obtidos através da fórmula de Friedewald:

$$\text{LDL-c (mg/dL)} = \text{colesterol total} - (\text{Triglicerídeos}/5) - \text{HDL-c}$$

$$\text{VLDL-c (mg/dL)} = \text{Triglicerídeos}/5$$

Os índices de Castelli foram determinados pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Castelli I} = \text{Colesterol Total} / \text{HDL-c}$$

$$\text{Castelli II} = \text{LDL-c} / \text{HDL-c}$$

## 2.6 **Análise estatística**

Os dados apresentados foram expressos como médias e erros padrões da média (EPM). O valor de significância assumido foi de  $p < 0,05$  para o efeito do tratamento ou efeito da idade.

### 2.6.1 Composição Corporal e análises plasmáticas

Os resultados de massa corporal e análises plasmáticas, quando havia apenas dois grupos: C e L (idades PN10, PN21 e PN30) foram avaliadas pelo-teste  $t$



de *Student* não pareado. Nas idades PN45, PN75 e PN150, após verificar que não havia interação (TRATAMENTO E AMBIENTE ENRIQUECIDO) por Two-way ANOVA, os dados foram analisados por One-way ANOVA utilizando o TRATAMENTO como fator (C, L, CAE e LAE), seguido do pós-teste Newman-Keuls. O software utilizado foi o GraphPad Prism version 5.00 for Windows (San Diego, CA, EUA).

### 2.6.2 Comportamento

A análise quantitativa foi iniciada com a verificação da normalidade das distribuições das variáveis comportamentais pelo teste Kolmogorov-Smirnov para uma amostra (K-S).

Para os dados obtidos com o EPM, a análise iniciou-se com a verificação do possível efeito de programação pela leptina sobre os parâmetros comportamentais nas diferentes idades. Para tanto, utilizamos uma ANOVA multivariada (ANOVA<sub>m</sub>) com o tratamento ou não à leptina (L ou C) e as idades (PN21, PN30, PN45, PN75 e PN150) como fatores. As variáveis analisadas foram: Tempo BA, %Tempo BA, Entradas BA, %Entradas BA, Entradas FC e %Tempo CN. Para todos os parâmetros em que foram observadas interações significativas entre tratamento e idade ou efeito de idade, a análise prosseguiu com a utilização de ANOVAs multivariadas em cada idade separadamente, sendo o tratamento (L ou C) considerado como o fator. Para os parâmetros comportamentais em que um valor de prova significativo ( $p < 0,05$ ) foi observado, considerou-se que o efeito de programação pela leptina estava presente, ensejando a segunda etapa de análise, que teve por objetivo verificar se a exposição dos animais em ambiente enriquecido (AE) foi capaz de reverter os efeitos de programação observados. Assim sendo, para as idades e parâmetros comportamentais em que o efeito de programação pela leptina foi observado, comparações planejadas par-a-par para as idades testadas após o uso do AE (PN45, PN75 e PN150) foram realizadas entre os grupos testados (C, L, CAE, LAE), utilizando FPLSD (Fisher Protected Least Significant Difference) como teste *post-hoc*. Para os dados obtidos com o CV, a análise seguiu o mesmo procedimento indicado acima, porém, como somente a variável orifícios explorados (nose pokes) foi avaliada, utilizou-se uma ANOVA univariada (ANOVA<sub>u</sub>) para iniciar a análise. O

valor de significância assumido foi de  $p < 0,05$  para o efeito do tratamento ou efeito da idade, e  $p < 0,1$  para interações.

O software utilizado foi o SPSS version 16 (Inc, Chicago, EUA).

### 3 RESULTADOS

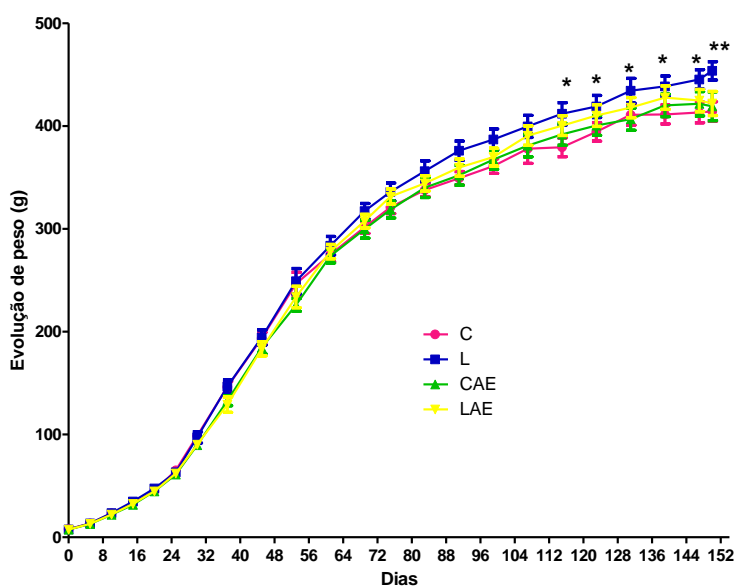
#### 3.1 Peso Corporal e composição corporal

##### 3.1.1 Evolução da massa corporal

A evolução da massa corporal dos animais pode ser observada no gráfico 1.

Não foi observada diferença da massa corporal entre os animais do grupo C e do grupo L até o 104º dia de vida, porém foi observado um efeito a longo prazo do tratamento com leptina sobre a massa corporal dos animais. O grupo L, a partir do 112º dia, apresentou maior ganho de massa quando comparados ao grupo C ( $F = 1,6$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,05$ ), o que corrobora os achados prévios do nosso laboratório (Toste et al., 2006). Em relação ao efeito do ambiente enriquecido, não há diferença no ganho de massa entre o grupo CAE e o grupo LAE, demonstrando que a exposição ao ambiente enriquecido durante a adolescência previne o sobrepeso dos animais previamente tratados com leptina no período neonatal. A figura 1 mostra a evolução do peso corporal dos animais. Para melhor visualização do gráfico, os dados foram apresentados a cada 8 dias, porém o peso dos animais foi avaliado diariamente até o desmame, e após a cada 4 dias.

Gráfico 1: Evolução da massa corporal do primeiro dia pós-natal (PN0) até PN150



Legenda: Evolução da massa corporal do primeiro dia pós-natal (PN0) até PN150 no grupo C (n = 17), L (n = 24), CAE (n = 19) e LAE (n = 20). Valores apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ , \*\* $p > 0,001$  C vs L.

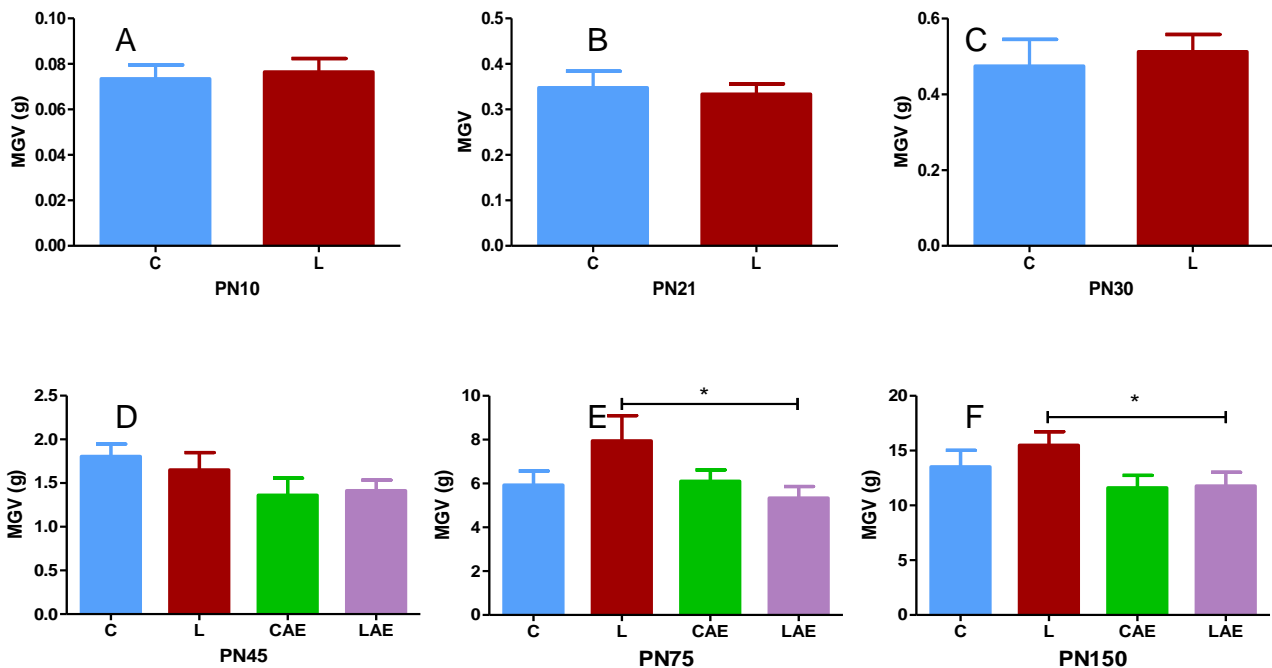
### 3.1.2 Massa de tecido adiposo

O gráfico 2 mostra a massa de gordura visceral antes da exposição ao ambiente (PN10, PN21 e PN30) e após a exposição ao ambiente enriquecido (PN45, PN75 e PN150).

Não houve efeito do tratamento com leptina na massa de gordura visceral dos animais aos 10, 21, 30 e 45 dias de vida (gráfico 2 A, B, C e D). Em PN75 e PN150 houve um aumento da massa de gordura visceral no grupo L, quando comparado ao grupo C, porém este aumento não foi significativo (gráfico 2 E e F).

No entanto, nas comparações par-a-par para avaliar o efeito do ambiente enriquecido, foi observado que em PN75 e PN150 o grupo LAE, quando comparado ao grupo L, apresentou uma redução significativa da massa de gorgura visceral ( $p=0,04$  e  $p=0,05$ , respectivamente), demonstrando que a exposição ao ambiente enriquecido durante a adolescência previne o aumento da adiposidade visceral na idade adulta decorrente da hiperleptinemia neonatal (gráfico 2 E e F).

Gráfico 2. Massa de gordura visceral antes da exposição ao ambiente (PN10, PN21 e PN30) e após a exposição ao ambiente enriquecido (PN45, PN75 e PN150).



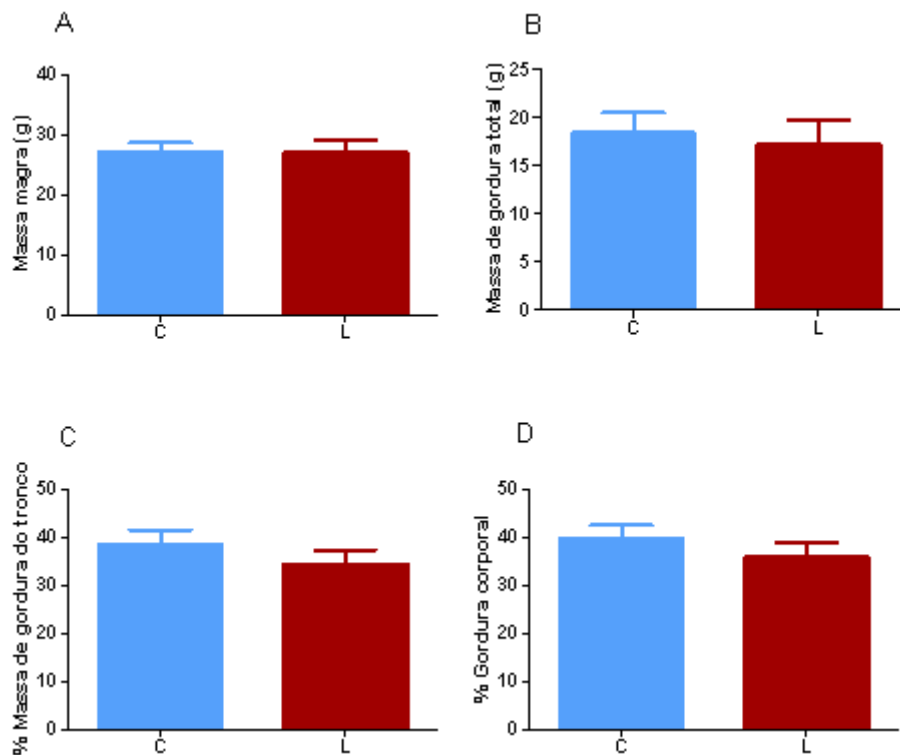
Legenda: MGV aos: A) 10 dias de vida (C=10, L=10); B) 21 dias de vida (C=21, L=21); C) 30 dias de vida (C=19, L=20); D) 45 dias de vida (C=13, L=14, CAE=14, LAE=17); E) 75 dias de vida

(C=10, L=10, CAE=10, LAE=12) e 150 dias de vida (C=12, L=16, CAE=12, LAE=13). Valores representam médias  $\pm$  EPM de 10 ratos por grupo.

### 3.1.3 DXA

O gráfico 3 apresenta a massa corporal e adiposidade da prole aos 21 dias dos grupos controle (C) e leptina (L). Não houve efeito do tratamento nestas variáveis.

Gráfico 3. Massa corporal e adiposidade da prole aos 21 dias

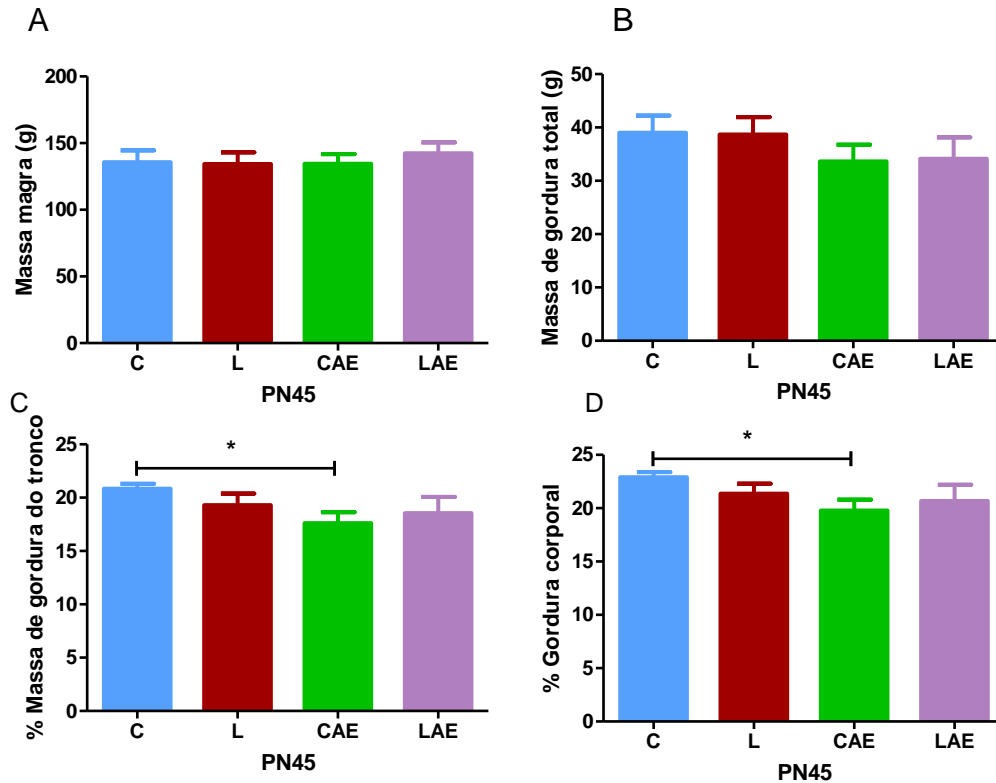


Legenda: A) Massa corporal, B) Massa de gordura total, C) %Massa de gordura do tronco, e D) %Gordura corporal em PN21 dos grupos controle (C) e Leptina (L). Valores representam médias  $\pm$  EPM de 10 ratos por grupo.

O gráfico 4 apresenta a massa corporal e adiposidade da prole aos 45 dias. O tratamento não afetou a massa corporal e adiposidade dos animais. Porém houve

efeito do ambiente enriquecido sobre o a adiposidade do grupo não tratado. O grupo CAE apresentou menor massa de gordura no tronco ( $p= 0,01$ , figura 4C) e menor % gordura corporal ( $p= 0,01$ ) quando comparado ao grupo C (gráfico 4D).

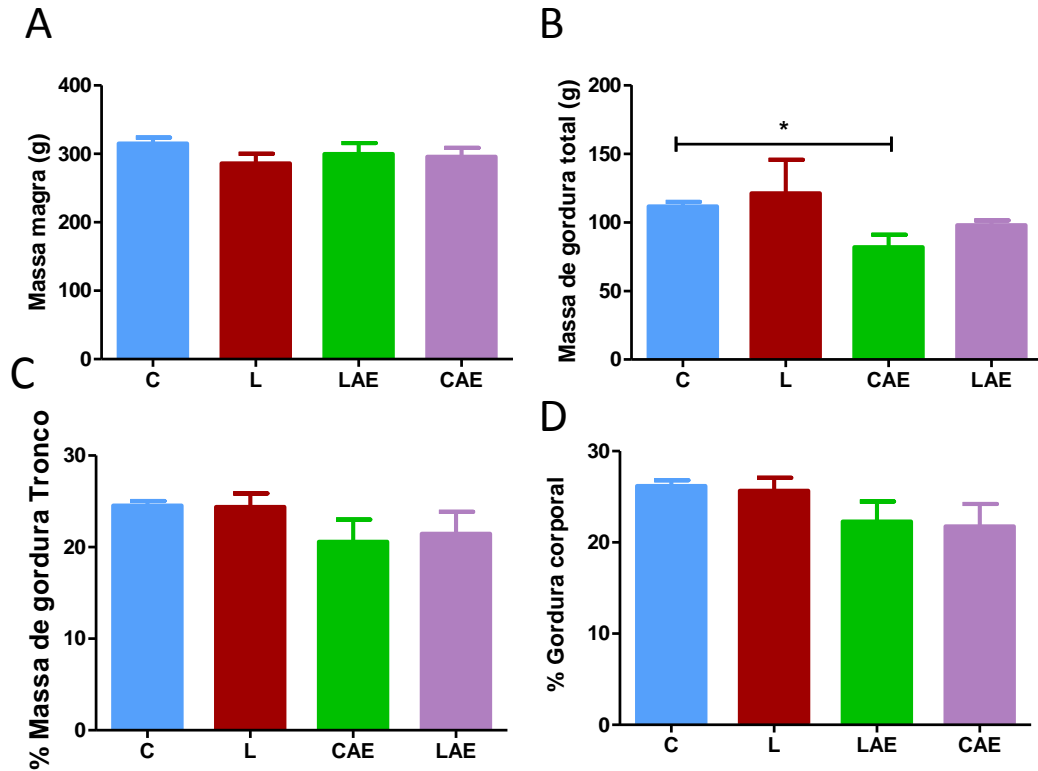
Gráfico 4. Massa corporal e adiposidade da prole aos 45 dias



Legenda: A) Massa corporal, B) Massa de gordura total, C) %Massa de gordura do tronco, e D) %Gordura corporal em PN45 dos grupos controle (C), Leptina (L), Controle ambiente enriquecido (CAE) e Leptina ambiente enriquecido (LAE). Valores representam médias  $\pm$  EPM de 8 ratos por grupo.

O gráfico 5 apresenta a massa corporal e adiposidade da prole aos 150 dias. O tratamento não afetou a massa corporal e adiposidade dos animais. Porém houve efeito do ambiente enriquecido sobre o a adiposidade do grupo não tratado com leptina e exposto ao AE. O grupo CAE apresentou menor massa de gordura total quando comparado ao grupo C ( $p= 0,01$ , gráfico 5B).

Gráfico 5: Massa corporal e adiposidade da prole aos 150 dias



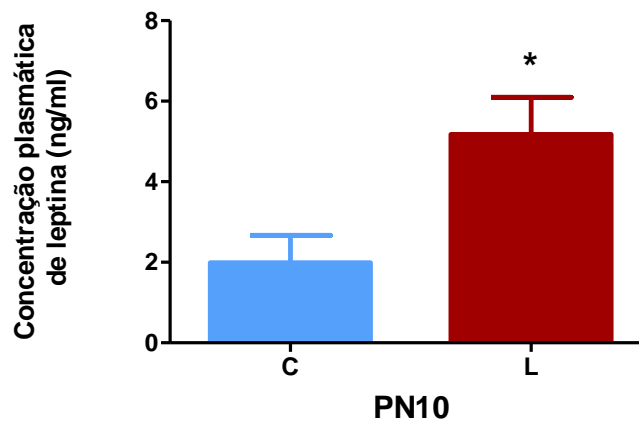
Legenda: A) Massa corporal, B) Massa de gordura total, C) %Massa de gordura do tronco, e D) %Gordura corporal em PN150 dos grupos controle (C) e Leptina (L), Controle ambiente enriquecido (CAE) e Leptina ambiente enriquecido (LAE). Valores representam médias  $\pm$  EPM de 10 ratos por grupo.

## 3.2 Avaliações plasmáticas

### 3.2.1 Leptina

A gráfico 6 mostra a leptinemia dos animais controle e leptina no último dia de tratamento (PN10), duas horas após a injeção de salina ou leptina. O grupo leptina apresentou maior concentração plasmática do hormônio ( $F = 2,2$ ;  $gl = 5$ ;  $P = 0,02$ ) quando comparado ao grupo C, demonstrando a eficácia do tratamento.

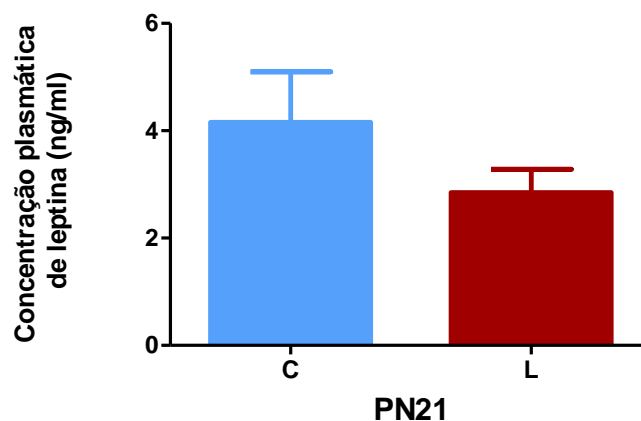
Gráfico 6. Leptinemia em PN10



Legenda: Leptinemia dos grupos controle ( $n = 7$ ) e leptina ( $n = 7$ ), duas horas após a última injeção de salina ou leptina (A). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

Em PN21 não houve diferença significativa na leptinemia entre os grupos C e L (gráfico 7).

Gráfico 7. Leptinemia em PN21



Legenda: Leptinemia em PN21 no grupo controle ( $n = 7$ ) e leptina ( $n = 7$ ). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.



Em PN30 foi observado um aumento da leptinemia no grupo L ( $F = 6,1$ ;  $gl = 17$ ;  $P = 0,03$ ) quando comparado ao grupo C (figura 11). O pico de leptina em PN30 destes animais já descrito na literatura (Toste et al., 2016) (gráfico 8).

Gráfico 8. Leptinemia em PN30

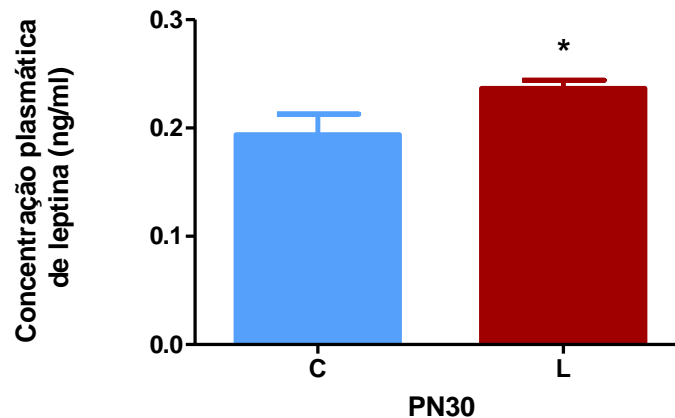


Gráfico 8: Leptinemia em PN30 no grupo controle (n=18) e leptina (n=18). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

Em PN45 (gráfico 9), houve um efeito do tratamento neonatal com leptina sobre os níveis plasmáticos de leptina destes animais. Foi observado um aumento de leptina no grupo L quando comparado ao grupo C, porém este aumento não foi significativo.

Nas comparações par-a-par, para avaliarmos o efeito do ambiente enriquecido sobre a leptinemia, não foram observadas diferenças entre os grupos (gráfico 9).

Gráfico 9. Leptinemia em PN45

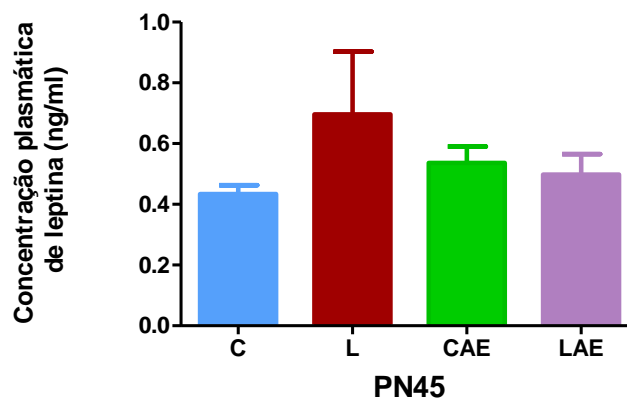


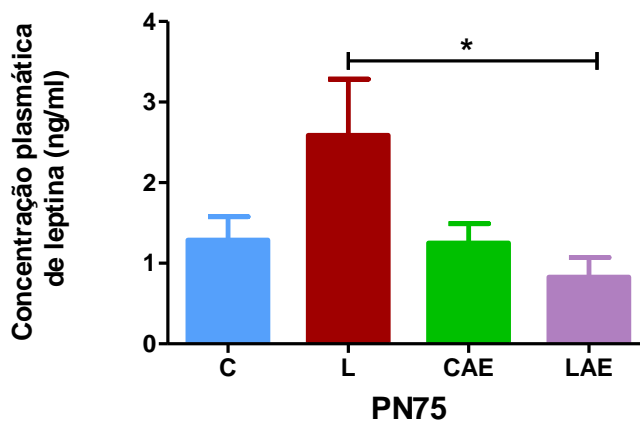
Gráfico 9: Leptinemia em PN45 no grupo controle (n=8), leptina (n=10), CAE (n=9) e LAE (n=9).

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$ .

Foi observado um efeito a longo prazo do tratamento neonatal com leptina sobre as concentrações plasmáticas de leptina em PN75 (gráfico 10). Houve um aumento na concentração de leptina plasmática no grupo L quando comparado ao grupo C, porém esta diferença não foi significativa ( $p = 0,08$ ).

Houve efeito da exposição do ambiente enriquecido na adolescência sobre a leptinemia em PN75. Quando comparamos a leptina plasmática do grupo LAE com a do grupo L, observamos uma redução nos animais LAE ( $p = 0,02$ ) demonstrando que quando animais previamente tratados com leptina são expostos ao AE, as concentrações plasmáticas de leptina são normalizados (gráfico 10).

Gráfico 10. Leptinemia em PN75



Legenda: Leptinemia em PN75 no grupo controle (n=9), leptina (n=9), CAE (n=8) e LAE (n=10).

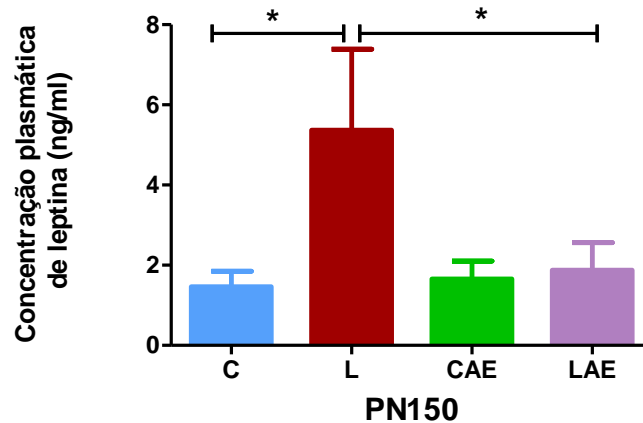
Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$ .

Em PN150, houve efeito do tratamento neonatal com leptina sobre as concentrações plasmáticas de leptina (gráfico 11). Foi observada uma hiperleptinemia no grupo L quando comparado ao grupo C ( $p = 0,02$ ).

Nas comparações par-a-par, também foi observado um efeito do ambiente enriquecido sobre a leptinemia na idade adulta. Os animais previamente tratados com leptina e expostos ao AE durante a adolescência (LAE) apresentam redução

nas concentrações plasmáticas de leptina quando comparados ao grupo L ( $p = 0,04$ ), demonstrando que o AE previne altos níveis de leptina plasmática da idade adulta ocasionada pela hiperleptinemia neonatal (gráfico 11).

Gráfico 11. Leptinemia em PN150

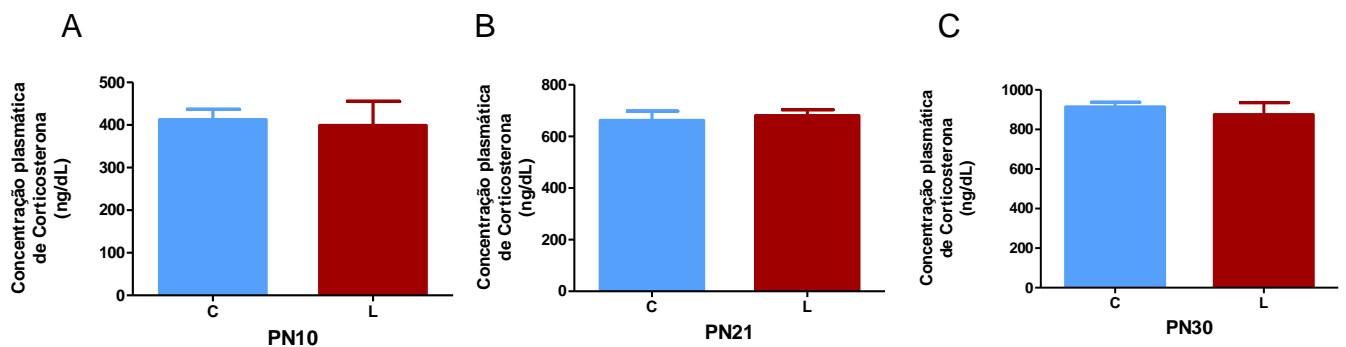


Legenda: Leptinemia em PN150 no grupo controle (n=6), leptina (n=6), CAE (n=8) e LAE (n=8). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

### 3.2.2 Corticosterona

Não foram observadas diferenças entre os grupos nas concentrações plasmáticas de corticosterona em PN10, PN21 e PN30 (gráficos 12 A, B, C, respectivamente).

Gráfico 12. Corticosteronemia em PN10, PN21 e PN30

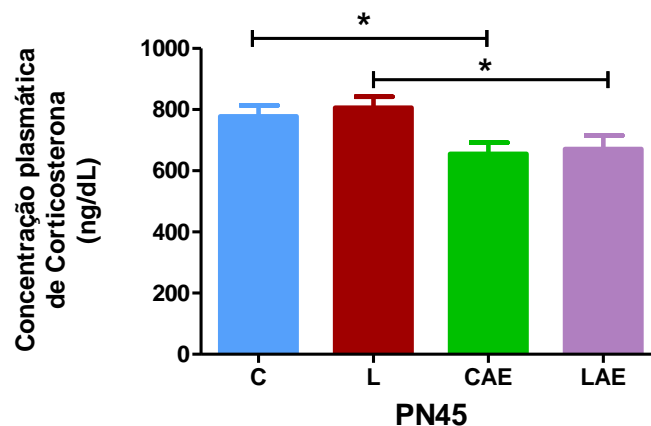


Legenda: Corticosteronemia no grupo controle e leptina em: A) PN10 (C = 8, L = 9), B) PN21 (C = 14, L = 11) e C) PN30 (C = 14, L = 14). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Em PN45, não houve efeito do tratamento neonatal com leptina sobre a concentração de corticosterona (gráfico 13).

Nas comparações par-a-par, observamos o efeito do ambiente enriquecido sobre a corticosteronemia. Ambos os animais CAE e LAE apresentam redução da corticosteronemia logo após saírem do AE quando comparado ao seu respectivo controle ( $p = 0,02$  e  $p = 0,01$ ), demonstrando que AE reduz a resposta ao estresse (gráfico 13).

Gráfico 13. Corticosteronemia em PN45

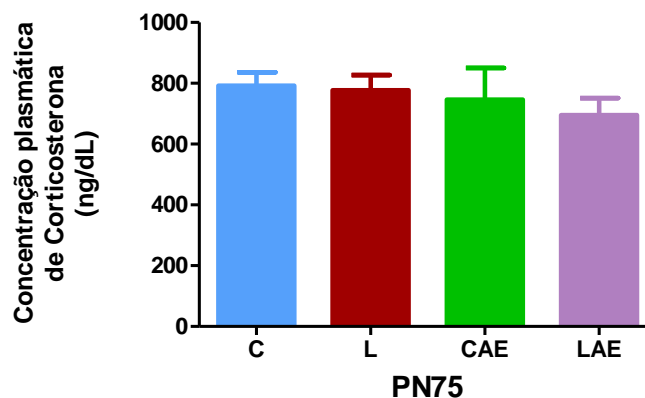


Legenda: Corticosteronemia em PN45 nos grupos C (n = 14), L (n = 21), CAE (n = 11) e LAE (n = 13).

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

Aos 75 dias de idade não foi observado efeito do tratamento neonatal com leptina ou da exposição ao ambiente enriquecido durante a adolescência sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona (gráfico 14).

Gráfico 14. Corticosteronemia em PN75



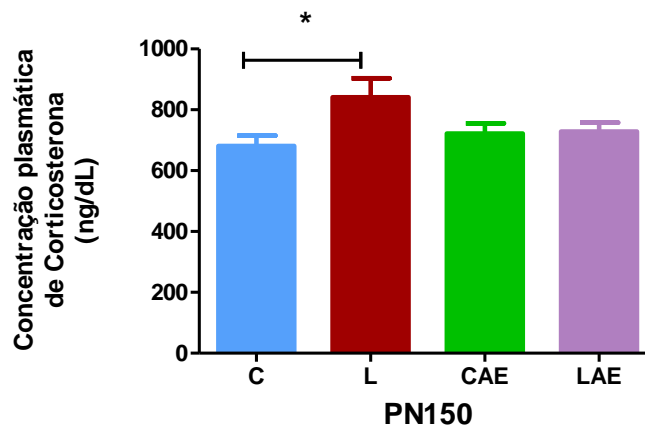
Legenda: Corticosteronemia em PN75 nos grupos C (n = 11), L (n = 18), CAE (n = 10) e LAE (n = 13).

Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Em PN150, foi observado efeito do tratamento sobre a corticosteronemia. Houve aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona no grupo L quando comparado ao grupo C ( $p = 0,04$ ) (gráfico 15).

Também houve efeito do ambiente enriquecido durante a adolescência sobre a corticosteronemia na idade adulta. Houve redução da corticosteronemia no grupo LAE quando comparado ao grupo L, no entanto este efeito não foi significativo ( $p = 0,09$ ). Como não há diferença nas concentrações plasmáticas de corticosterona do grupo LAE quando comparado ao grupo C, podemos sugerir que o ambiente enriquecido normaliza a corticosteronemia (gráfico 15).

Gráfico 15. Corticosteronemia em PN150



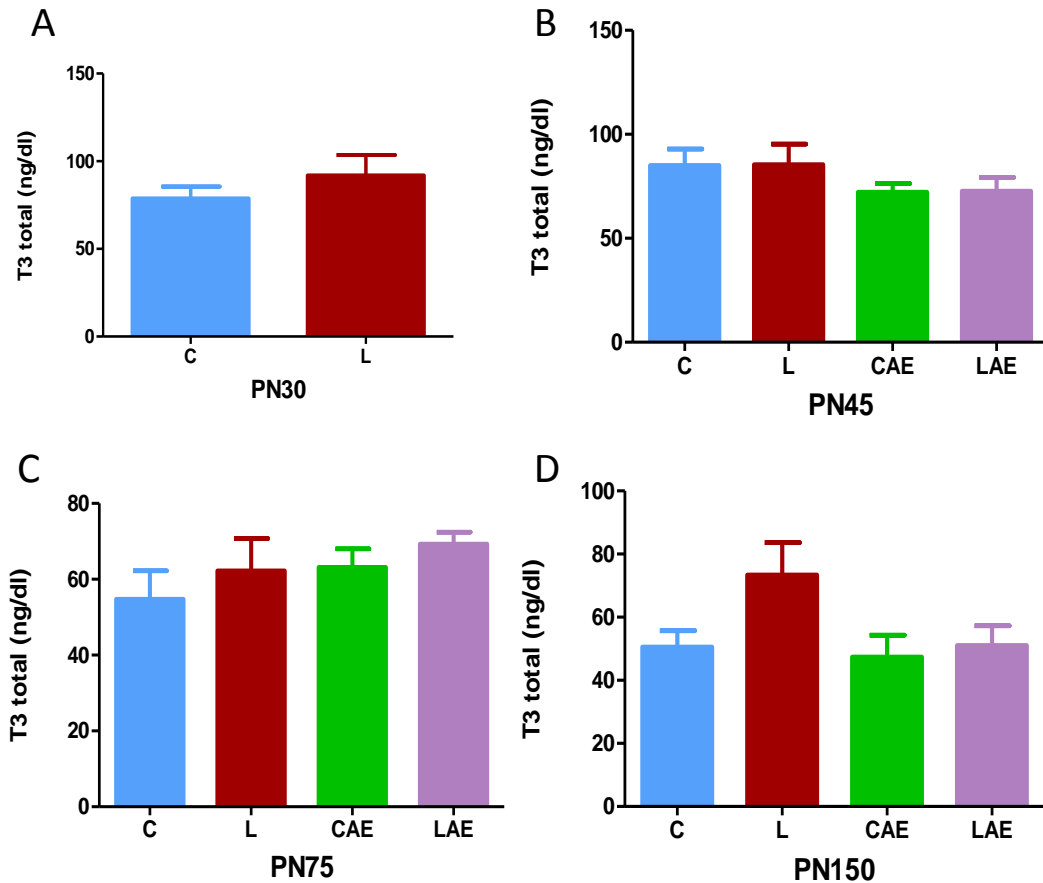
Legenda: Corticosteronemia em PN150 nos grupos C ( $n = 9$ ), L ( $n = 11$ ), CAE ( $n = 12$ ) e LAE ( $n = 13$ )  
 Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

### 3.2.3 Concentrações plasmáticas de T3 Total

Não foi observado efeito do tratamento com leptina nas concentrações plasmáticas de T3 total em PN30, PN45 e PN75 (figura 15 A, B e C). Este efeito foi observado em PN150, onde o grupo L quando comparado ao grupo C, apresentou um aumento próximo da significância ( $p = 0,07$ ) (gráfico 16 D).

Em relação ao efeito do ambiente, o grupo LAE, quando comparado ao grupo L, apresentou redução nas concentrações de T3 total demonstrando que o ambiente enriquecido pode prevenir uma alteração na função tireoidiana, no entanto, esta redução não foi significativa ( $p = 0,07$ ) (gráfico 16 D).

Gráfico 16. Concentrações plasmáticas de T3 Total em PN30, PN45, PN75 e PN150



Legenda: Concentrações plasmáticas de T3 Total em: A) PN30 (C = 12), (L = 11), B) PN45 (C = 13, L = 15, CAE = 14, LAE = 16), C) PN75 (C = 8, L = 9, CAE = 12, LAE = 8) e D) PN150 (C = 10, L = 11, CAE = 11, LAE = 10). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

### 3.2.4 Concentrações de T4 livre

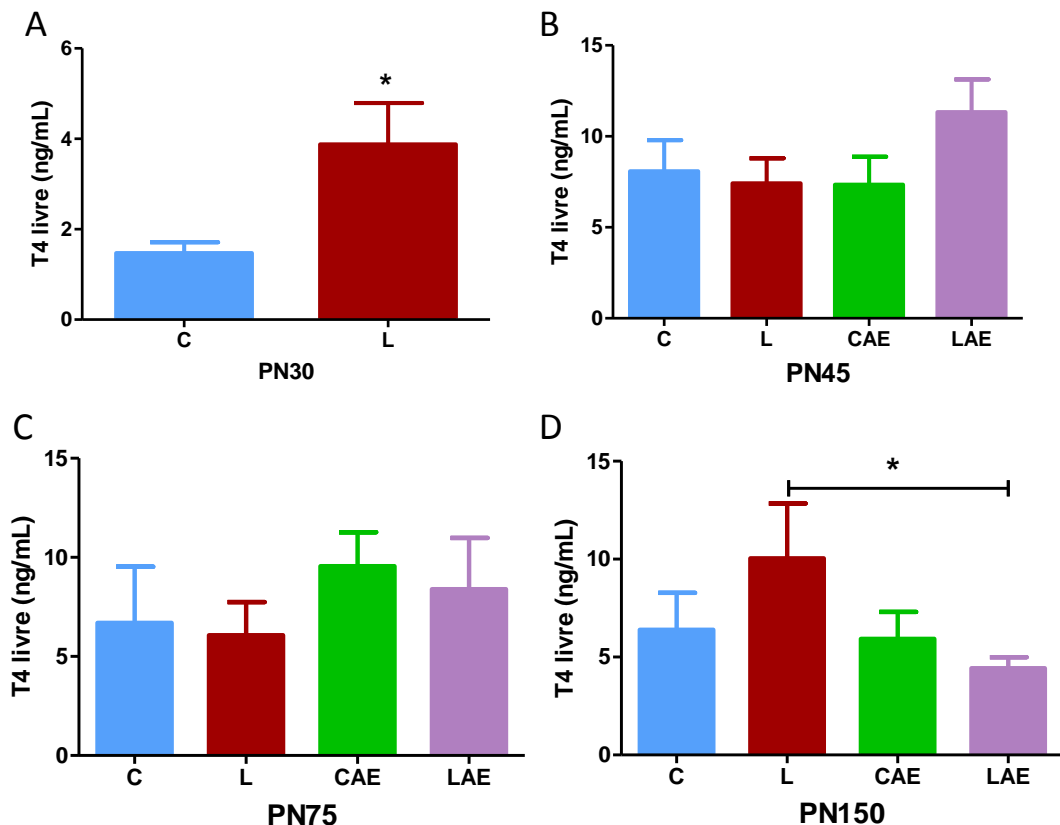
Aos 30 dias de idade os animais do grupo L apresentaram concentrações mais altas de T4 livre quando comparados aos animais do grupo C ( $p = 0,009$ ) (gráfico 17A).

Em PN45 não houve efeito do tratamento sobre a concentração plasmática de T4 livre (gráfico 17B). Em relação ao efeito do ambiente enriquecido sobre as concentrações de T4 livre em PN45, foi observado um aumento no grupo LAE quando comparado ao grupo L, porém, esta diferença não foi significativa (gráfico 17B).

Aos 75 dias de vida não houve efeito do tratamento sobre a concentração plasmática de T4 livre (gráfico 17C). Nas comparações par-a-par, foi observado um aumento nos grupos CAE e LAE quando comparado aos seus respectivos controles (C e L), porém esta diferença não foi significativa, demonstrando que o ambiente enriquecido também não teve efeito sobre as concentrações de T4 livre em PN75 (gráfico 17C).

Aos 150 dias de idade observamos que o tratamento neonatal com leptina aumenta as concentrações plasmáticas de T4 livre nos animais programados (grupo L) quando comparado ao grupo C, embora esta diferença não seja significativa (gráfico 17D). Quando avaliamos o efeito ao ambiente enriquecido, há uma diferença significativa entre o grupo LAE e grupo L ( $p=0,04$ ) demonstrando que o AE durante a adolescência foi capaz de normalizar as concentrações de T4 livre na idade adulta (gráfico 17D).

Gráfico 17. Concentrações plasmáticas de T4 livre



Legenda: Concentrações plasmáticas de T4 livre em: A) PN30 (C=12, L=10), B) PN45 (C=13, L=14, CAE=13, LAE=14), C) PN75 (C=10, L=10, CAE=9, LAE=12) e D) PN150 (C=9, L=13, CAE=12, LAE=14). Dados expressos como média ± erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

## 3.2.5 Perfil lipídico, glicemia e insulinemia

A tabela 2 mostra o perfil lipídico, a glicemia de jejum, e a insulinemia nas diferentes idades e diferentes grupos experimentais.

Tabela 2: Perfil lipídico, glicemia de jejum e insulina séricas

		Idades					
GRUPOS		PN10	PN21	PN30	PN45	PN75	PN150
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	<b>C</b>	119,5±5,2	110,3±6,8	75,6±5,4	56,4±1,9	48,9±2,1	40,6±1,8
	<b>L</b>	122,4±7,4	110,4±6,4	63,4±4,1	64,6±2,6*	49,1±1,8	47,2±3,9
	<b>CAE</b>	-	-	-	61,9±3,1	38,5±3,0 <sup>&amp;</sup>	41,8±4,3
	<b>LAE</b>	-	-	-	59,8±3,1	38,4±2,9 <sup>***</sup>	50,1±3,7
<b>HDL-c (mg/dL)</b>	<b>C</b>	37,3±1,62	42,9±2,5	28,2±1,4	24±1,1	21,8±1,2	24,6±0,9
	<b>L</b>	34,8±3,2	40,2±2,0	27,5±0,9	24,2±1,1	19,8±1,0	25,8±2,1
	<b>CAE</b>	-	-	-	23,6±1,8	22,8±1,7	22,5±1,4
	<b>LAE</b>	-	-	-	25,2±1,5	22,9±1,6	30,1±1,3
<b>LDL-c (mg/dL)</b>	<b>C</b>	66,3±4,6	34,4±4,0	17,0±4,4	19,89±1,3	12,4±1,1	6,3±2,4
	<b>L</b>	71,3±5,3	44,7±4,4	13,5±4,7	28,2±3,8 <sup>PS</sup>	14,7±2,2	8,2±3,4
	<b>CAE</b>	-	-	-	23,7±1,7	7,1±1,9 <sup>&amp;</sup>	10,2±1,7
	<b>LAE</b>	-	-	-	19,6±3,0	8±3,0 <sup>PS</sup>	11,1±1,2
<b>VLDL-c (mg/dL)</b>	<b>C</b>	15,9±1,1	33,0±5,8	34,9±3,5	13,2±1,1	14,7±1,0	17,3±2,3
	<b>L</b>	16,1±1,4	25,4±3,9	29,4±2,5	12,2±0,9	14,4±1,2	14,1±1,7
	<b>CAE</b>	-	-	-	11,7±1,0	11,2±1,9	12,1±1,5
	<b>LAE</b>	-	-	-	12,5±1,3	14,8±2,2	11,2±1,1
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	<b>C</b>	79,8±5,7	164,9±29,6	174,4±17,9	66,1±5,8	72,5±5,3	64,0±5,7
	<b>L</b>	81,0±7,6	127,3±19,6	146,9±12,5	60,8±4,9	71,4±6,2	91,1±11,2*
	<b>CAE</b>	-	-	-	58,8±4,8	56,5±9,3	54,5±5,6
	<b>LAE</b>	-	-	-	62,2±6,8	59,3±3,6	56,0±5,4 <sup>***</sup>
<b>Índice de Castelli I</b>	<b>C</b>	3,2±0,1	2,5±0,05	2,2±0,1	2,4±0,1	1,7±0,1	1,6±0,05
	<b>L</b>	3,6±0,3	2,7±0,06 <sup>PS</sup>	2,6±0,1*	2,7±0,2	2,5±0,1**	1,8±0,1
	<b>CAE</b>	-	-	-	2,6±0,1	1,7±0,1	1,8±0,1
	<b>LAE</b>	-	-	-	2,4±0,2	1,7±0,1 <sup>***</sup>	1,6±0,06
<b>Índice de Castelli II</b>	<b>C</b>	1,7±0,1	0,8±0,09	0,5±0,1	0,8±0,08	0,5±0,06	0,2±0,07
	<b>L</b>	2,1±0,2	1,1±0,08*	0,4±0,1	1,2±0,2	0,7±0,1	0,3±0,1
	<b>CAE</b>	-	-	-	1,0±0,1	0,3±0,1	0,4±0,06
	<b>LAE</b>	-	-	-	0,7±0,1	0,4±0,1	0,3±0,03
<b>Glicemia (mg/dL)</b>	<b>C</b>	136,7±8,9	156,7±10	101,4±4,2	129,3±4,7	124,8±5,4	122,1±5,4
	<b>L</b>	134,4±14,2	187,1±14,9	99,58±3,5	137,6±5,4	133,2±5,2	128,7±7,1
	<b>CAE</b>	-	-	-	141,5±6,2	139,2±9,1	118,8±7,5
	<b>LAE</b>	-	-	-	142,7±6,9	149,1±5,7 <sup>PS</sup>	128,1±7,0
<b>Insulina (mUI/mL)</b>	<b>C</b>	-	20,3±2,8	16,0±2,2	19,3±0,6	19,5±3,5	46,9±9,1
	<b>L</b>	-	18,5±4,4	17,4±1,4	26,0±5	25,7±5,8	55,6±8,7
	<b>CAE</b>	-	-	-	23,7±3,1	31,1±7,6	40,0±3,4
	<b>LAE</b>	-	-	-	23,8±3,9	28,9±3,5	44,9±8,2

Tabela 2: Perfil lipídico, glicemia de jejum, insulina séricas nas diferentes idades e diferentes grupos experimentais. Valores expressos como média ± EPM de PN10 (C=10, L=8), PN21 (C=10,



L=12), PN30 (C=11, L=12), PN45 (C=10, L=10, CAE=10 e LAE=10), PN75 (C=10, L=10, CAE=10 e LAE=10) e PN150 (C=10, L=9, CAE=10 e LAE=10) \* L vs C, # LAE vs L, &CAE vs C  $p < 0,05$ .

Observamos um efeito do tratamento com leptina logo no início da vida dos animais. Em PN21, o grupo L apresentou um aumento do Índice de Castelli I próximo da significância ( $p = 0,06$ ) e um aumento significativo do Índice de Castelli II ( $p = 0,04$ ). O aumento destes índices está associado à maior risco aterogênico. Isto é também observado em PN30, onde há aumento significativo do Índice de Castelli I no grupo L ( $p = 0,04$ ).

Em PN45 há um efeito do tratamento sobre os níveis de LDL e de Colesterol Total. Foi observado que o grupo L, quando comparado ao grupo C, apresenta colesterol total aumentado significativamente ( $p = 0,02$ ) e LDL mais alto, aumento próximo da significância ( $p = 0,06$ ). Quando realizamos uma comparação par-a-par, observamos que a exposição ao ambiente enriquecido reduz estes níveis, o grupo LAE apresenta redução quando comparado ao grupo L, porém a redução não é significativa.

Em PN75 há um efeito do tratamento com leptina somente sobre o Índice de Castelli I. Há um aumento significativo entre o grupo L e o grupo C ( $p = 0,002$ ) o qual é revertido significativamente quando estes animais tratados com leptina são expostos na adolescência ao ambiente enriquecido. Nas comparações par-a-par, observamos que o grupo LAE apresenta redução significativa ( $p = 0,006$ ) no Índice de Castelli quando comparado ao grupo L. O ambiente enriquecido também afeta de modo positivo os níveis de LDL, colesterol total e glicemia. Quando comparamos o grupo CAE com o grupo C há redução significativa de LDL ( $p = 0,02$ ) e de colesterol total ( $p = 0,01$ ). Quando comparamos o grupo LAE ao grupo L observamos uma redução de LDL próximo da significância ( $p = 0,09$ ), redução significativa sobre o colesterol total ( $p = 0,009$ ) e sobre a glicemia ( $p = 0,05$ ).

Aos 150 dias de vida há um efeito do tratamento sobre triglicerídeos plasmático. Há aumento significativo de triglicerídeos no grupo L quando comparado ao C ( $p = 0,05$ ). Quando analisamos o efeito do ambiente enriquecido observamos que há redução significativa de triglicerídeos nos animais previamente tratados com leptina e expostos ao AE quando comparado ao grupo L ( $p = 0,006$ ). Também foi observado um efeito benéfico do AE sobre os níveis de VLDL, uma vez que há redução no grupo CAE, próximo da significância, quando comparado ao C ( $p = 0,06$ ).

A programação (tratamento com leptina) não modificou os níveis de glicemia e de insulina nas idades avaliadas. No entanto, o grupo LAE quando comparado ao grupo L apresentou hiperglicemia, demonstrando um efeito do AE em PN75.

### 3.3 Resultados comportamentais

#### 3.3.1 Labirinto em cruz elevado (LCE)

A ANOVAm utilizando os seguintes fatores: IDADE (PN21, PN30, PN45, PN75 e PN150) e TRATAMENTO (C vs L) foi observado efeitos significativos da IDADE e uma interação TRATAMENTO x IDADE também significativa ( $P < 0,05$ ). Os efeitos da IDADE, TRATAMENTO e da INTERAÇÃO em cada uma das variáveis analisadas são apresentados na Tabela 3,4 e 5 respectivamente.

Tabela 3: Efeito da idade nas variáveis medidas no labirinto em cruz elevado

EPM	Efeito Idade
Tempo AB	F = 5,1, gl = 4, p = 0,001
Entradas AB	F = 12,8, gl = 4, p = 0,001
%Entradas AB	F = 9,5, gl = 4, p = 0,001
Entradas FC	F = 3,5, gl = 4, p = 0,008
Tempo CN	F = 3, gl = 4, p = 0,03

Tabela 4: Efeito do tratamento nas variáveis medidas no labirinto em cruz elevado.

EPM	Efeito do Tratamento
Tempo AB	F = 4,8, gl = 3, p = 0,003
%Tempo AB	F = 4,4, gl = 3; p = 0,005
Entradas AB	F = 8,3, gl = 3; p = 0,001
%Entradas AB	F = 9,5, gl = 3, p = 0,001
Tempo CN	F = 3, gl = 3, p = 0,03
Entradas FC	F = 2,8, gl = 3, p = 0,039

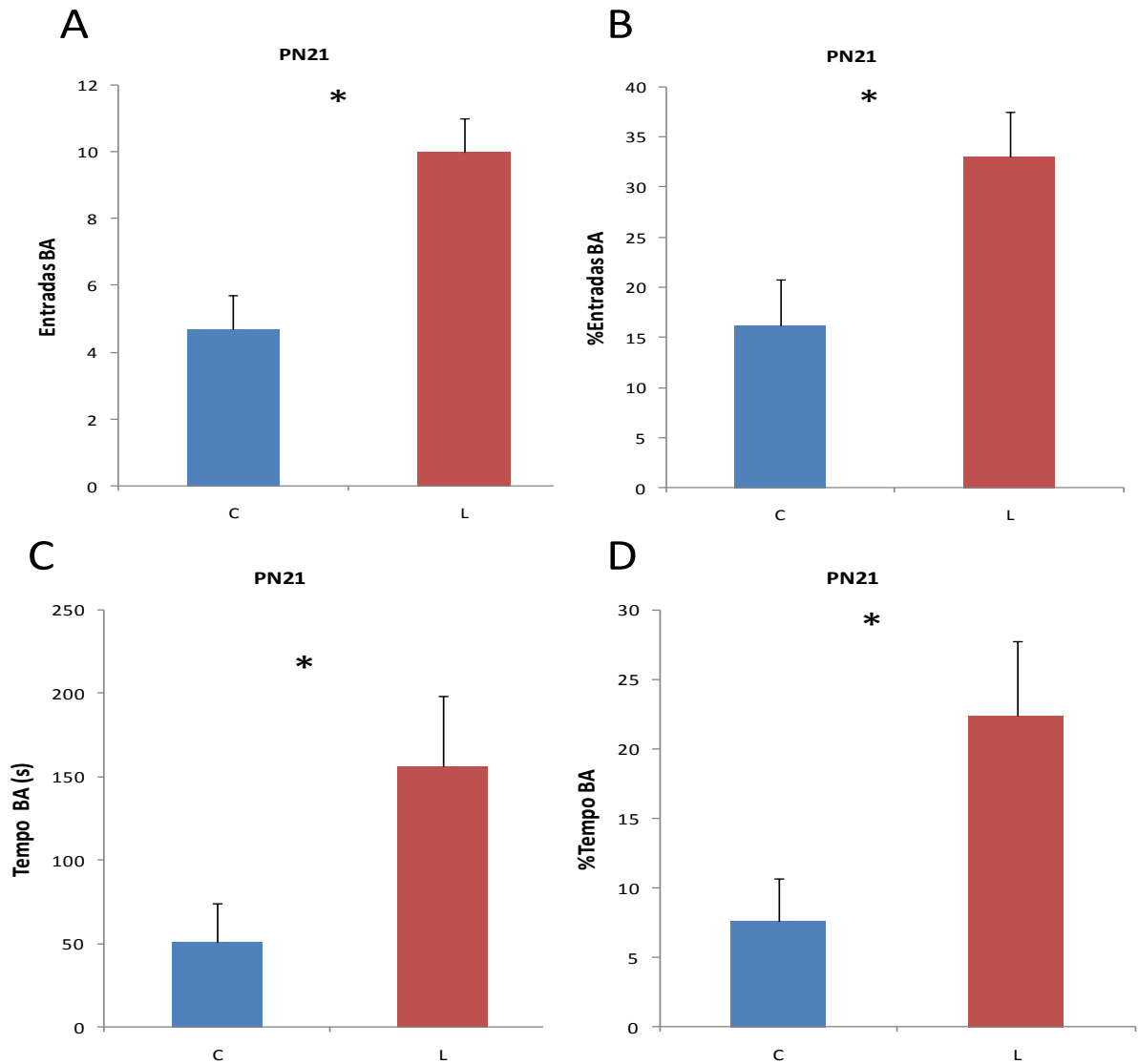
Tabela 5: Interação (Idade e Tratamento) nas variáveis medidas no labirinto em cruz elevado.

EPM	Interação Idade X Tratamento
Tempo AB	F = 5,1, gl = 4, p = 0,001
Entradas AB	F = 5,8, gl = 4, p = 0,001
%Entradas AB	F = 5,6, gl = 4, p = 0,001
Tempo CN	F = 5,7, gl = 4, p = 0,001

As análises seguintes foram feitas para cada idade separadamente.

Em PN21 observou-se efeito do tratamento com leptina. Os animais L aumento significativo dos valores de Tempo BA ( $F = 4,7$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,039$ ), %Tempo BA ( $F = 5,5$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,026$ ), Entradas BA ( $F = 5,3$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,029$ ) e %Entradas BA ( $F = 6,8$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,015$ ) quando comparado ao grupo C (gráficos 18A, B, C, D), caracterizando menor nível de ansiedade no grupo L.

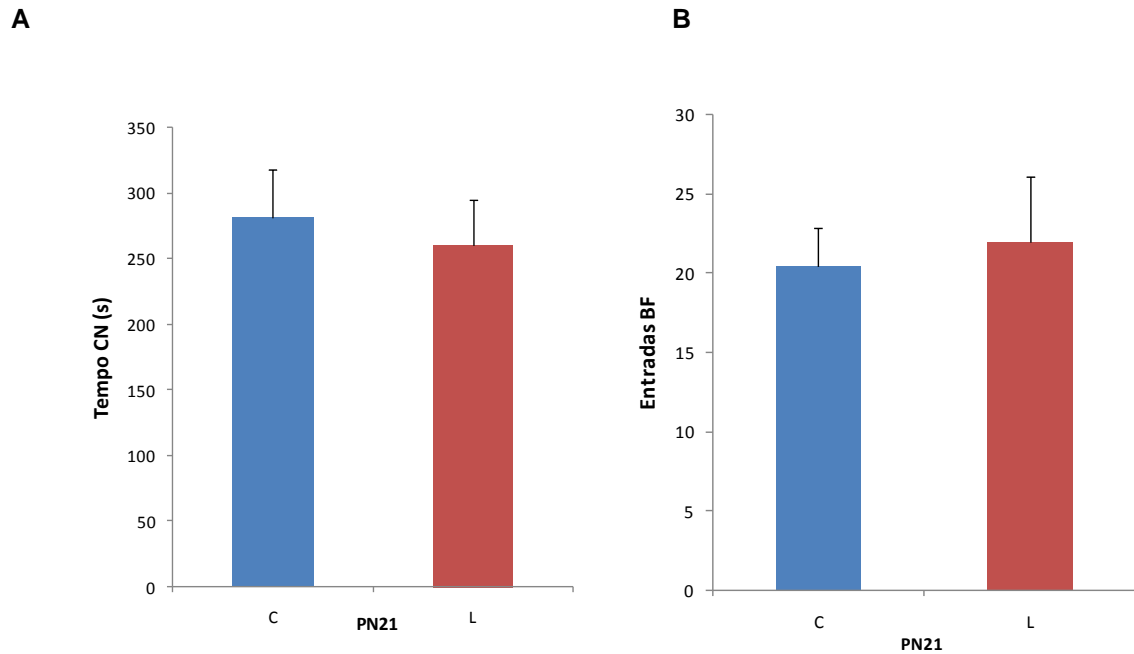
Gráfico 18. Ansiedade avaliada no LCE em PN21



Legenda: Tempo de permanência no braço aberto (A), percentual de tempo de permanência no braço aberto (B), entradas no braço aberto (C), percentual de entradas no braço aberto (D) no LCE em PN21 (C=14, L= 14). Dados expressos como média ± erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

Não foi observada diferença entre os grupos na tomada de decisão, avaliada pelo tempo de permanência no centro do LCE (gráfico 19A), e na atividade locomotora, avaliada pelo número de entradas BF no LCE (gráfico 19B).

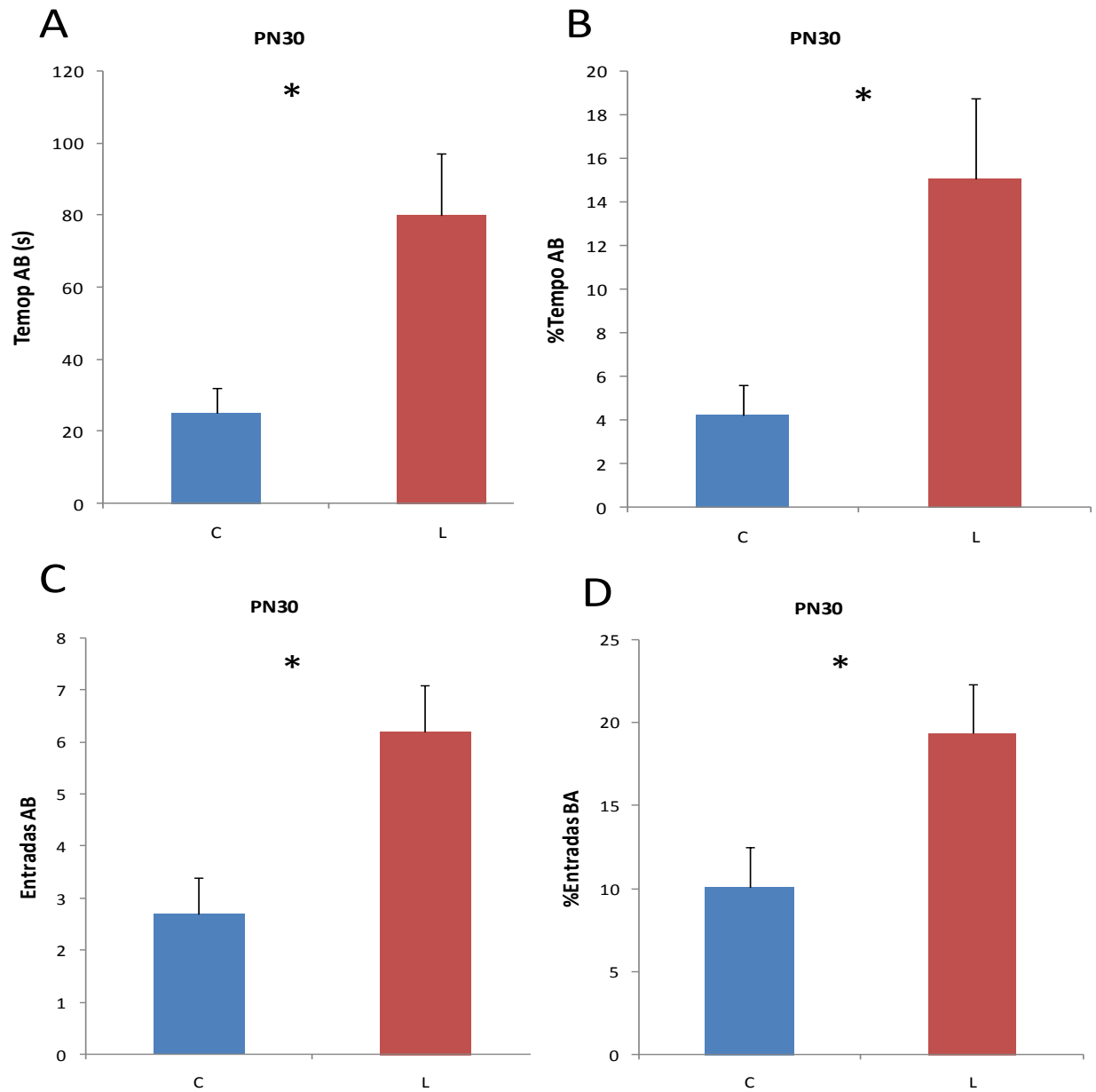
Gráfico 19. Tomada de decisão avaliada no LCE em PN21



Legenda: Tempo de permanência no centro (A) e Entradas no braço fechado (B) do LCE em PN21. (C=14, L= 14). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Em PN30, o grupo L apresentou aumento significativo dos valores de Tempo BA ( $F = 5,4$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,027$ ), %Tempo BA ( $F = 4,6$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,04$ ), Entradas BA ( $F = 6,8$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,014$ ) e %Entradas BA ( $F = 4,9$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,035$ ) quando comparado ao grupo C (gráfico 20A, B, C, D), caracterizando menor nível de ansiedade no grupo L.

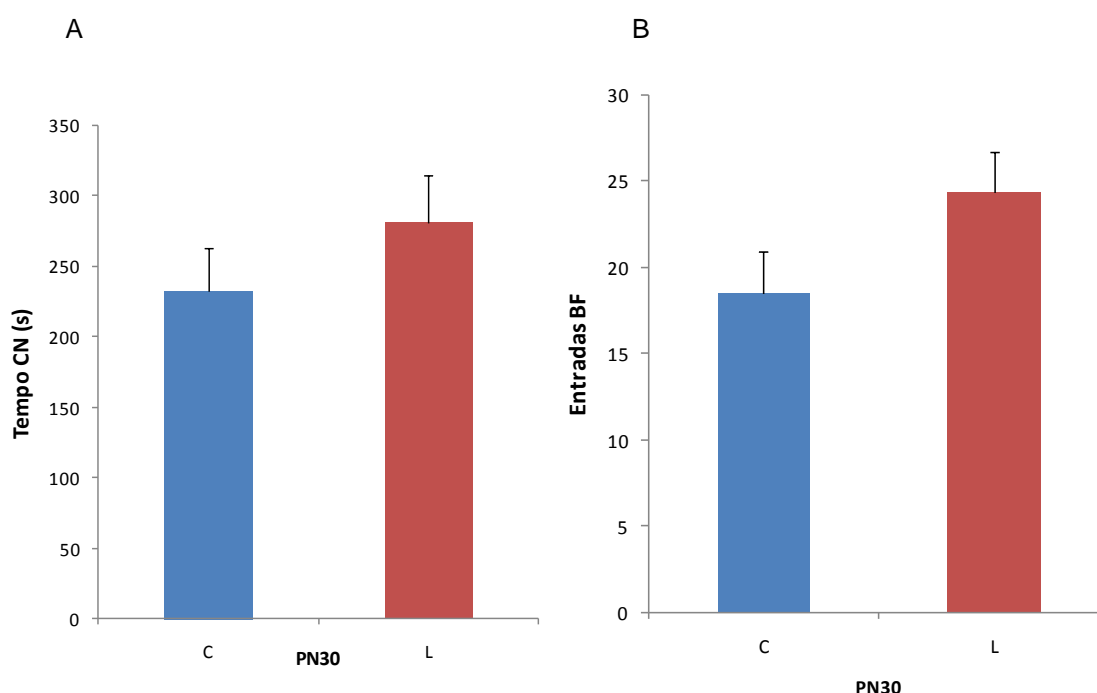
Gráfico 20. Ansiedade avaliada no LCE em PN30



Legenda: Tempo de permanência no braço aberto (A), percentual de tempo de permanência no braço aberto (B), entradas no braço aberto (C), percentual de entradas no braço aberto (D) no LCE em PN30 (C=11, L= 19). Dados expressos como média ± erro padrão da média. \*p<0,05.

Não foi observada diferença entre os grupos na tomada de decisão, avaliada pelo tempo de permanência no centro do LCE (gráfico 21A) e na atividade locomotora, avaliada pelo número de entradas BF do LCE (gráfico 21B).

Gráfico 21. Tomada de decisão avaliada no LCE em PN30



Legenda: Tempo de permanência no centro (A) e Entradas no braço fechado (A) do LCE em PN30. (C=11, L= 19). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

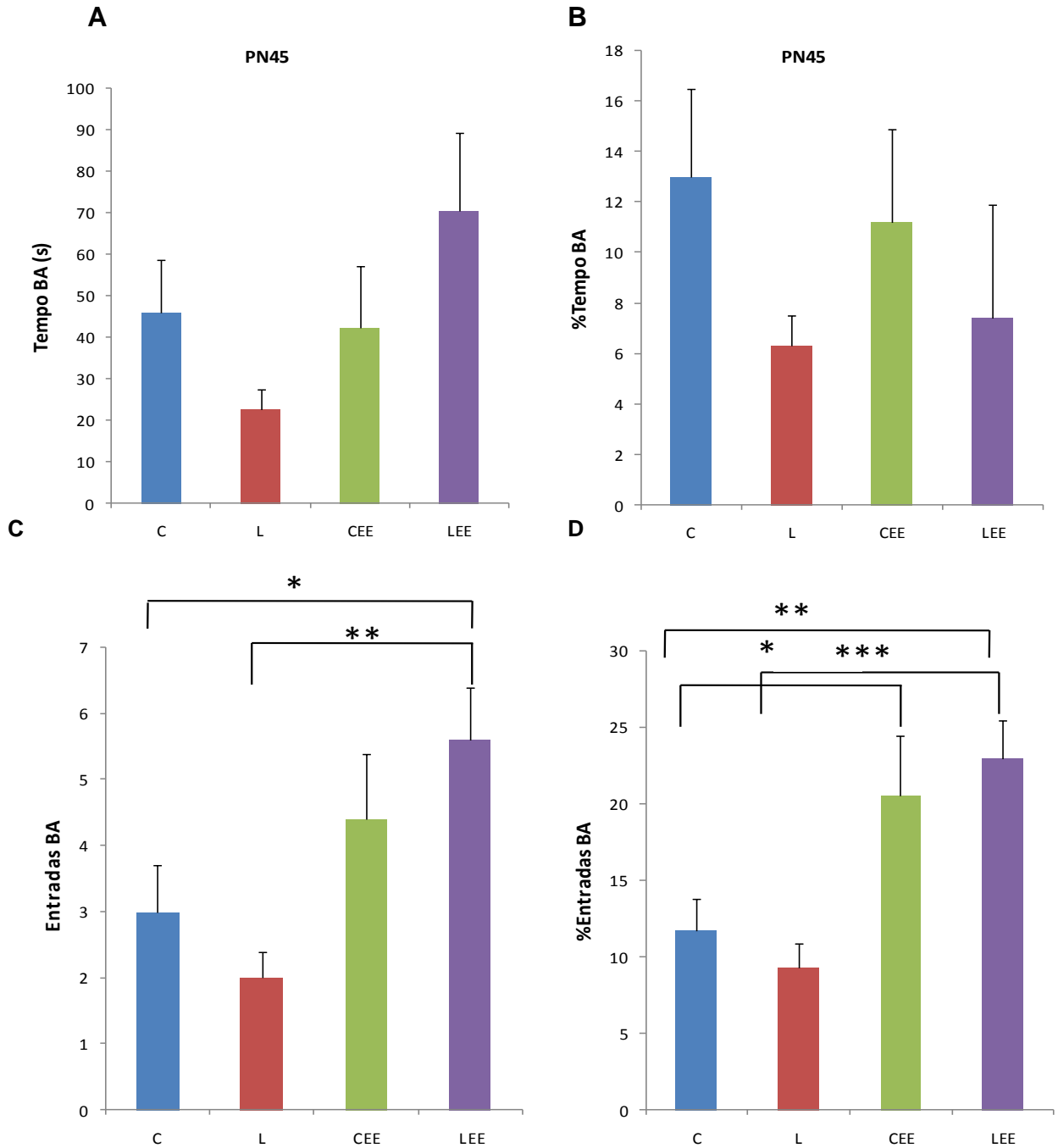
Aos 45 dias de idade, a análise do efeito do tratamento nas diferentes variáveis demonstrou que o efeito ansiolítico da leptina foi perdido, uma vez que não houve diferença significativa entre o grupo C e o grupo L (gráfico 22A, B, C, D).

Para verificar o efeito do ambiente enriquecido sobre os níveis de ansiedade, as comparações par-a-par, considerando os quatros grupos, demonstrou que os animais LAE, quando comparado aos animais L, apresentaram aumento significativo no número de Entradas BA ( $p = 0,001$ , FPLSD) e %Entradas BA ( $p = 0,001$ , FPLSD) (gráfico 22A, B, C, D), caracterizando menor nível de ansiedade. Também foi observado que ambiente enriquecido tem efeito ansiolítico tanto para animais previamente tratados com leptina quanto para o grupo não tratado. Quando comparado o grupo CAE com o grupo C, foi observado aumento no %Entradas BA ( $p = 0,021$ , FPLSD). Quando comparado os grupos LAE e C, foi observada diferença



significativa nas Entradas BA e %Entradas BA, onde o grupo LAE tem maior número de Entradas BA ( $p = 0,021$ ) e %Entradas BA ( $p = 0,004$ ).

Gráfico 22. Ansiedade avaliada no LCE em PN45



Legenda: Tempo de permanência no braço aberto (A), percentual de tempo de permanência no braço aberto (B), entradas no braço aberto (C), percentual de entradas no braço aberto (D) no

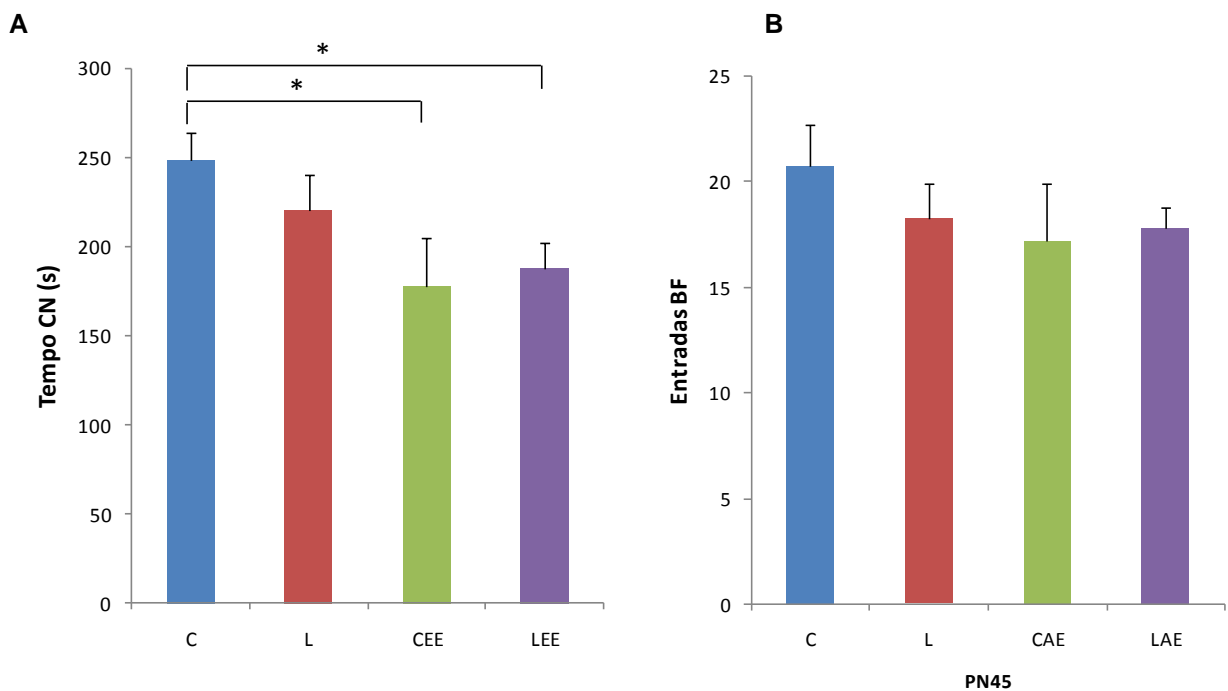
LCE em PN45 (C=14, L= 16, CAE= 14, LAE= 14). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ , \*\*  $P > 0,001$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

Não foram observadas diferenças no Tempo CN do LCE entre os grupos C e L, demonstrando que o tratamento com leptina não afeta a tomada de decisão em PN45 (gráfico 23A).

Para verificar o efeito do ambiente enriquecido sobre a tomada de decisão, as comparações par-a-par, mostrou uma redução significativa no tempo despendido no centro (Tempo CN) entre o grupo CAE e o grupo C ( $p = 0,019$ , FPLSD), o mesmo acontecendo com o grupo LAE quando comparado ao grupo C ( $p = 0,041$ , FPLSD). Este dado demonstra que o ambiente enriquecido diminui a tomada de decisão (gráfico 23A), um comportamento que tem sido associado à maior risco de dependência às drogas e à comida, tanto para animais previamente tratados com leptina quanto para o grupo não tratado.

Não houve efeito do tratamento com leptina ou do ambiente enriquecido sobre a atividade locomotora, avaliada pelo número de entradas BF em PN45 (gráfico 23B).

Gráfico 23. Tomada de decisão avaliada no LCE em PN45



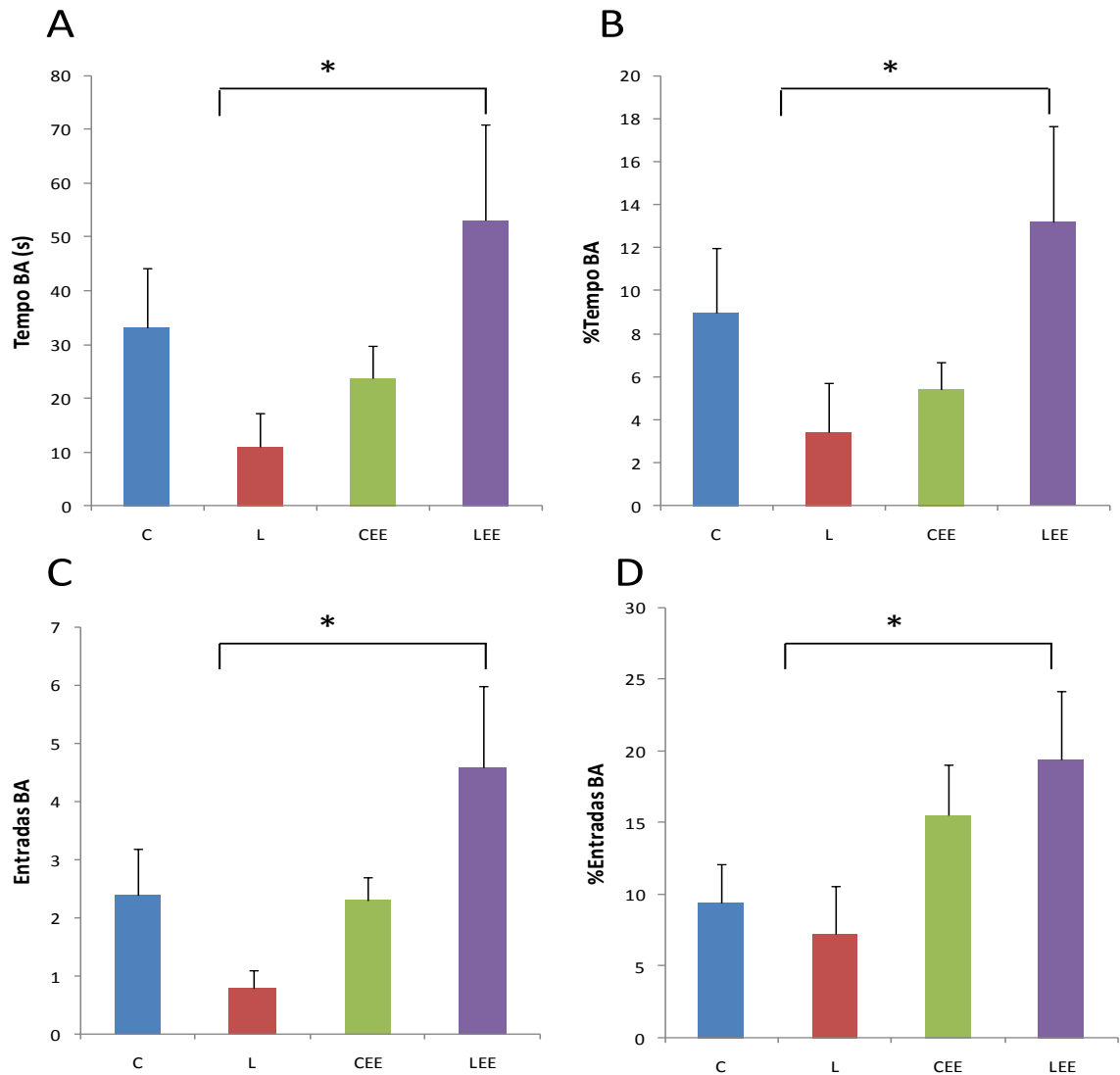
Legenda: Tempo de permanência no centro (A) e Entradas no braço fechado (B) do LCE em PN45

(C=14, L= 16, CAE= 14, LAE= 14). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

Aos 75 dias de idade, não houve diferença significativa entre o grupo C e o grupo L nas diferentes variáveis de ansiedade (gráfico 24A, B, C e D).

No entanto, para verificar o efeito do ambiente enriquecido sobre as diferentes variáveis de ansiedade, as comparações par-a-par, mostrou que o grupo LAE quando comparado ao grupo L, apresentou aumento significativo no Tempo BA ( $p = 0,024$ , FPLSD), % Tempo BA ( $p = 0,04$ , FPLSD), Entradas BA ( $p = 0,013$ , FPLSD), e % Entradas BA ( $p = 0,043$ , FPLSD), demonstrando uma redução da ansiedade no grupo LAE (gráfico 24A, B, C e D). Comparando o grupo LAE com o grupo C, observa-se um aumento no %Entradas BA próximo da significância ( $p = 0,07$ ) no grupo LAE, demonstrando uma tendência ao efeito ansiolítico do ambiente enriquecido.

Gráfico 24. Ansiedade avaliada no LCE em PN75



Legenda: Tempo de permanência no braço aberto (A), percentual de tempo de permanência no braço aberto (B), entradas no braço aberto (C), percentual de entradas no braço aberto (D) no LCE em PN75 (C=12, L= 10, CAE= 16, LAE= 15). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

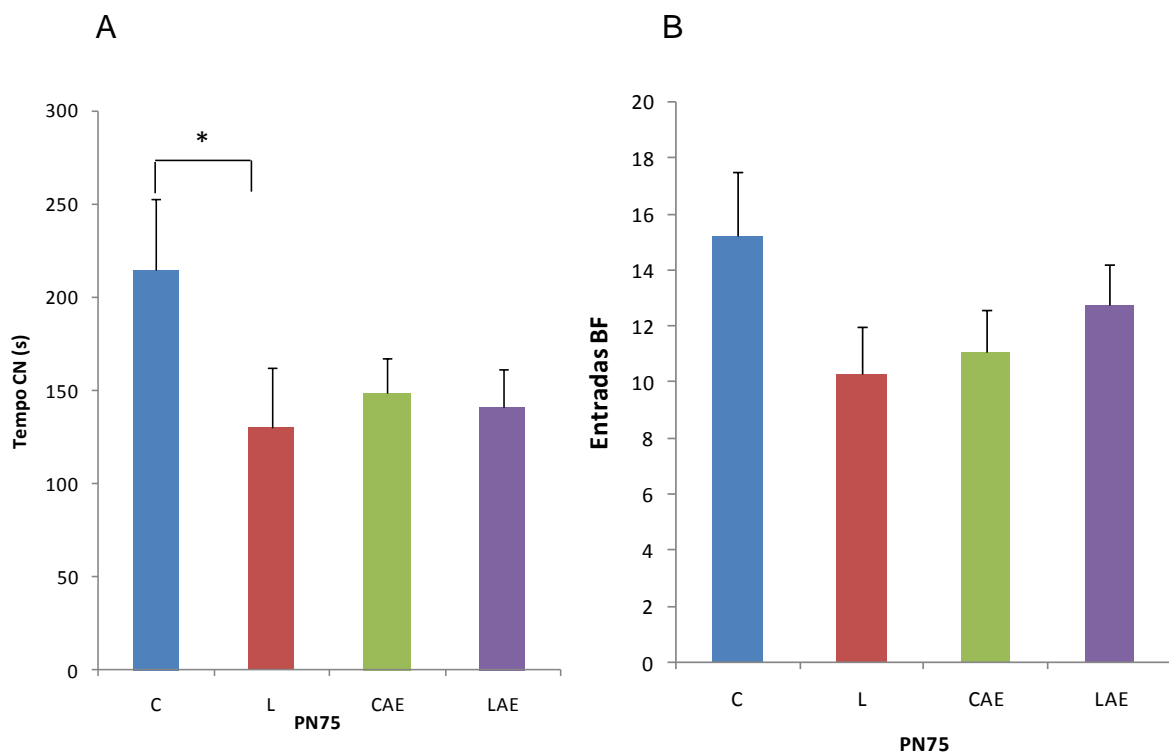
Aos 75 dias de idade, houve diferença significativa entre o grupo C e o grupo L na análise do efeito do tratamento sobre o Tempo CN ( $p = 0,046$ ), demonstrando que a leptina afeta a tomada de decisão (gráfico 25A).

Nas comparações par-a-par para avaliar o efeito do ambiente enriquecido sobre o Tempo CN não foram observadas diferenças significativas (gráfico 25A).

Em relação à atividade locomotora do grupo L comparado ao grupo C em PN75, foi observado que o tratamento com leptina gera uma redução desta atividade, porém esta diferença não foi significativa ( $p = 0,071$ ) (gráfico 25B).

Não foram observadas diferenças significativas nas comparações par-a-par utilizadas para verificar o efeito do ambiente enriquecido sobre a atividade locomotora, avaliada pelo número de entradas BF (gráfico 25B).

Gráfico 25. Tomada de decisão avaliada no LCE em PN75



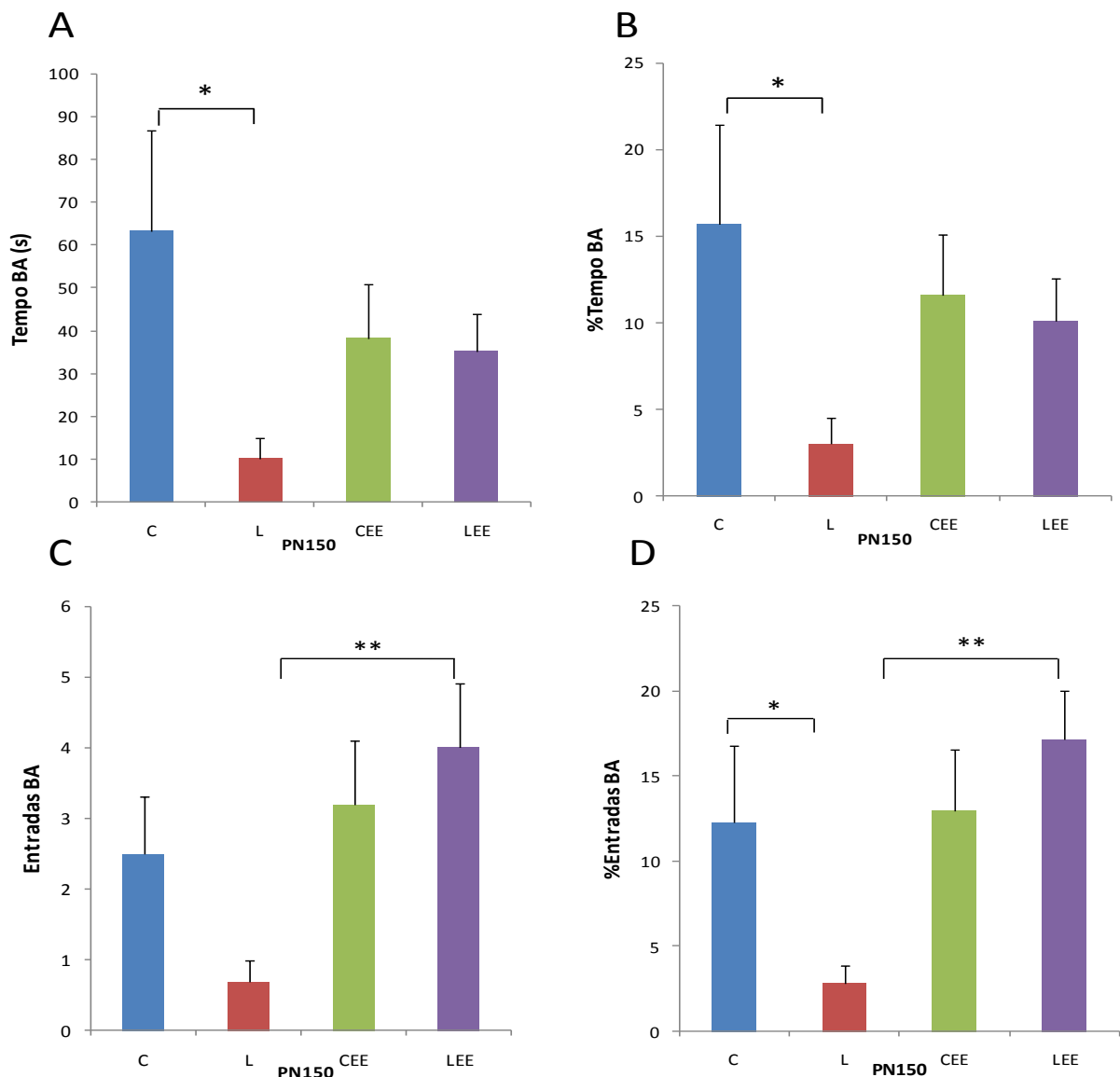
Legenda: Tempo de permanência no centro (A) e Entradas no braço fechado (B) do LCE em PN75 (C=12, L= 10, CAE= 16, LAE= 15). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ .

Aos 150 dias de idade, a análise do efeito do tratamento nas diferentes variáveis demonstrou que a hiperleptinemia no início da vida tem um efeito ansiogênico em longo prazo, uma vez que foi observado que o grupo L apresenta

diminuição significativa no Tempo BA ( $p = 0,008$ , FPLSD), no %Tempo BA ( $p = 0,014$ , FPLSD) e no %Entradas BA ( $p = 0,045$ , FPLSD), quando comparados aos animais do grupo C, caracterizando aumento nos níveis de ansiedade destes animais (gráfico 26A, B e D).

Nas comparações par-a-par para avaliar o efeito do ambiente enriquecido sobre níveis de ansiedade observamos que os animais previamente tratados com leptina e expostos ao ambiente enriquecido (LAE) apresentaram aumento no número de Entradas BA ( $p = 0,008$ , FPLSD) e %Entradas BA ( $p = 0,001$ , FPLSD) quando comparados ao grupo L (gráfico 26C e D).

Gráfico 26. Ansiedade avaliada no LCE em PN150



Legenda: Tempo de permanência no braço aberto (A), percentual de tempo de permanência no braço aberto (B), entradas no braço aberto (C), percentual de entradas no braço aberto (D) no

LCE em PN150 (C=15, L= 18, CAE= 19, LAE= 20). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$ , \*\*  $P > 0,001$ .

Na análise do efeito do tratamento sobre o Tempo CN do LCE não foi observado efeito da leptina em PN150. Também não foi observado efeito o ambiente enriquecido sobre a tomada de decisão quando realizadas comparações par-a-par (gráfico 27A).

Em relação à atividade locomotora, não foi observado efeito da leptina assim como não houve efeito o ambiente enriquecido quando realizadas comparações par-a-par (gráfico 27B).

Gráfico 27. Tomada de decisão avaliada no LCE em PN150

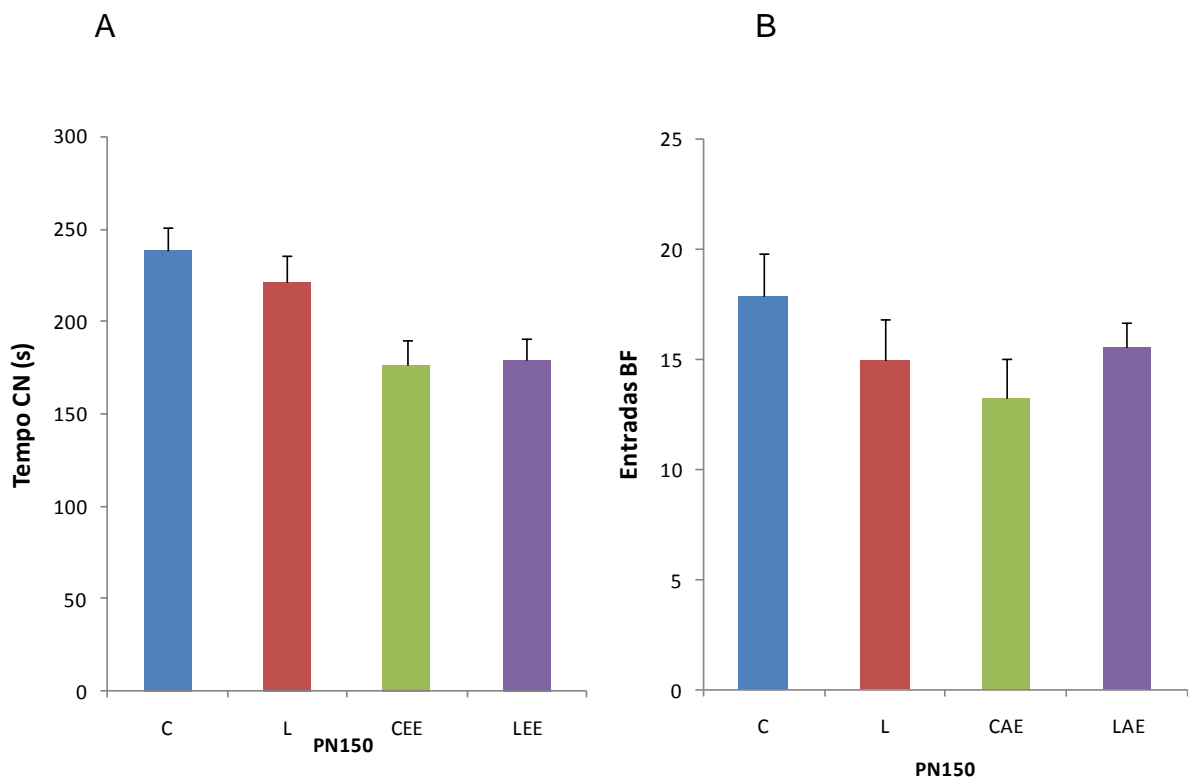


Gráfico 27. Tempo de permanência no centro (A) e Entradas no braço fechado (B) do LCE em PN150 (C=15, L= 18, CAE= 19, LAE= 20). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

### 3.3.2 Campo Vazado (CV)

A ANOVA utilizando os seguintes fatores: IDADE (PN21, PN30, PN45, PN75 e PN150) e TRATAMENTO (C vs L) foi observado efeitos significativos da IDADE e

uma interação TRATAMENTO x IDADE também significativa ( $p < 0,05$ ). Os efeitos da IDADE, TRATAMENTO e da INTERAÇÃO em cada uma das variáveis analisadas são apresentados na Tabela 6.

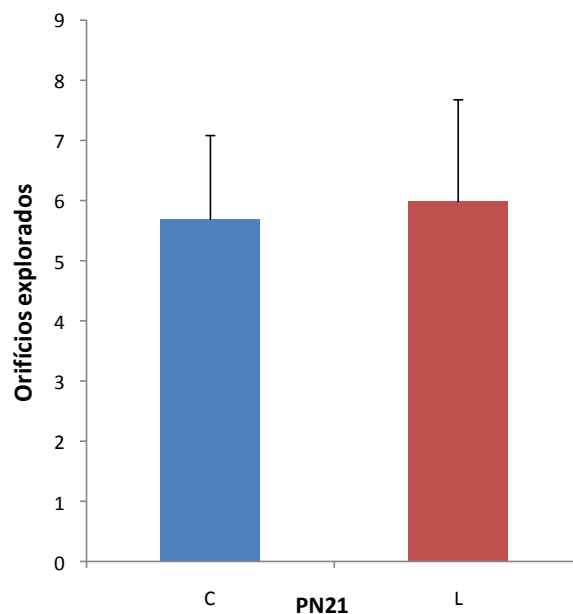
Tabela 6. Efeito da idade, do tratamento e interação na variável medida no campo vazado.

HB	
Efeito da Idade	F = 7,1, gl = 4, p = 0,001
Efeito do Tratamento	F = 6,9, gl = 1, p = 0,009
Interação	F = 3,7, gl = 4, p = 0,006

As análises seguintes foram feitas para cada idade separadamente.

Em PN21 não foi observado efeito do tratamento com leptina sobre a atividade exploratória no CV, pois não houve diferença entre os grupos no número de orifícios explorados (gráfico 28).

Gráfico 28. Atividade exploratória avaliada no CV em PN21

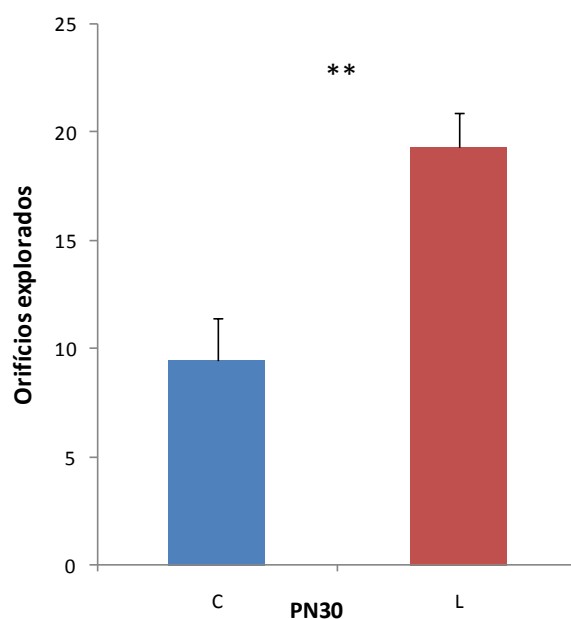


Legenda: Número de orifícios explorados no campo vazado em PN21 (C= 8, L= 8). Dados expressos como média ± erro padrão da média.



Em PN30 foi observado efeito do tratamento com leptina sobre a atividade exploratória no CV ( $F = 15,4$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,001$ ). O grupo L apresentou um aumento no número de orifícios explorados quando comparado ao grupo C, caracterizando um aumento da atividade exploratória (gráfico 29).

Gráfico 29. Atividade exploratória avaliada no CV em PN30

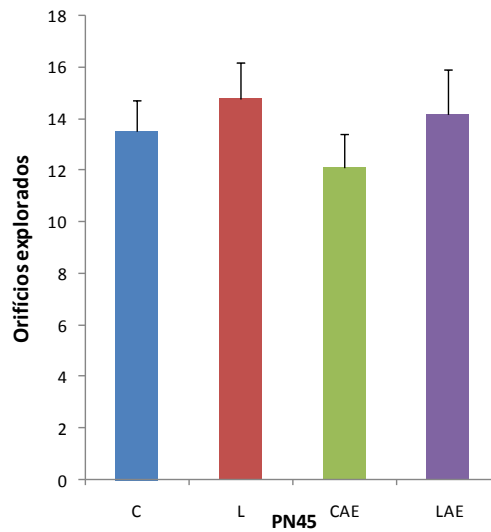


Legenda: Número de orifícios explorados no campo vazado em PN30 (C= 11, L= 16). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*\*  $P > 0,001$ .

Aos 45 dias de idade, não foi observada efeito do tratamento sobre a atividade exploratória. Não houve diferença no número de orifícios explorados no CV entre o grupo L e o grupo C (gráfico 30).

Também não foi observado efeito do ambiente enriquecido sobre a atividade exploratória, uma vez que não houve diferenças nas comparações par-a-par, considerando os quatros grupos (gráfico 30).

Gráfico 30. Atividade exploratória avaliada no CV em PN45

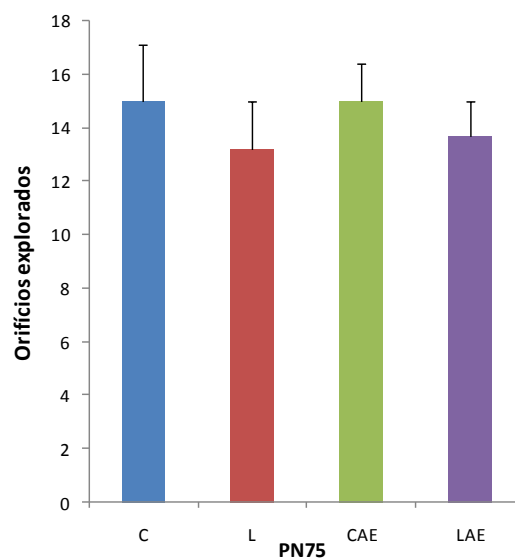


Legenda: Número de orifícios explorados no campo vazado em PN45 (n=14, L=16, CAE= 16, LAE= 14). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Em PN75 não foi observado efeito do tratamento com leptina, pois não houve diferença entre o grupo L e grupo C no número de orifícios explorados no CV (gráfico 31).

Em relação ao efeito do ambiente enriquecido sobre a atividade exploratória, também não foram encontradas diferenças nas comparações par-a-par, considerando os quatro grupos (gráfico 31).

Gráfico 31. Atividade exploratória avaliada no CV em PN75



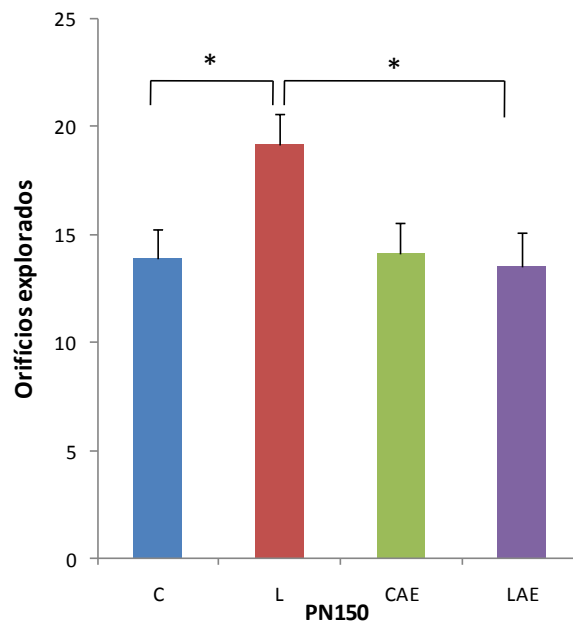
Legenda: Número de orifícios explorados no campo vazado em PN75 (C= 11, L= 13, CAE= 16,

LAE= 15). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

Aos 150 dias de idade, a análise do efeito do tratamento no número de orifícios explorados demonstrou que a hiperleptinemia no início da vida aumenta significativamente a atividade exploratória em longo prazo, observada pelo aumento significativo desta variável no grupo L quando comparado ao grupo C ( $p = 0,038$ , FPLSD) (gráfico 32).

Nas comparações par-a-par para avaliar o efeito do ambiente enriquecido sobre a atividade exploratória observamos que os animais LAE, comparado ao grupo L, apresentaram redução no número de orifícios explorados no CV ( $p = 0,022$ , FPLSD), demonstrando que a hiperatividade encontrada nos animais adultos, os quais foram tratados com leptina no período neonatal, é prevenida quando há exposição ao ambiente enriquecido na adolescência (gráfico 32).

Gráfico 32. Atividade exploratória no CV em PN150



Legenda: Número de orifícios explorados no campo vazado em PN150 (n=16, L=12, CAE= 17, LAE= 16). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0.05$ .

## 4 DISCUSSÃO

O ambiente durante a vida intra-uterina e neonatal desempenha um papel importante na programação da susceptibilidade, na vida adulta, para doenças crônicas, tais como obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus (Harvey e Cooper, 2004; Silveira e Manfro, 2015), ansiedade e depressão (Charney e Bremner, 1999). Estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos têm demonstrado que influências hormonais, nutricionais e ambientais em períodos críticos do desenvolvimento do indivíduo podem alterar permanentemente parâmetros fisiológicos e comportamentais na idade adulta (Lucas, 1994; Barker, 2003; Kar et al., 2008; Fraga-Marques et al., 2009, 2010; Fraga et al., 2011).

Previamente, nosso laboratório demonstrou que a hiperleptinemia neonatal, resultante do tratamento com leptina diretamente na prole nos dez primeiros dias de vida, resulta em alterações endócrino-metabólicas na idade adulta, como sobrepeso, aumento da ingestão alimentar e hiperleptinemia (de Oliveira Cravo et al., 2002), resistência ao efeito anorexigênico da leptina, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia (Toste et al., 2006), maior secreção de catecolaminas (Trevenzoli et al., 2007) além de hipercorticosteronemia (Fraga-Marques et al., 2009). Ao avaliarmos o perfil comportamental destes animais observamos que eles se apresentaram ansiosos e com aumento da atividade exploratória também na idade adulta (Fraga-Marques et al., 2009).

Sendo este um importante modelo experimental para o estudo de parâmetros da síndrome metabólica, o qual está associado a distúrbios comportamentais, compreender melhor o surgimento destes distúrbios e investigar novas estratégias de tratamento torna-se de suma importância. Neste trabalho, investigamos através de um estudo longitudinal, os efeitos da hiperleptinemia neonatal sobre os perfis endócrino-metabólico e comportamental. Também avaliamos o efeito da exposição ao ambiente enriquecido por 15 dias, durante a adolescência, nestes perfis.

#### **4.1 Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a massa e composição corporal**

O efeito da programação com leptina na evolução da massa corporal foi observado somente a partir do 112º dia, onde os animais tratados previamente com leptina (grupo L) apresentaram sobrepeso na idade adulta, corroborando com achados prévios do nosso laboratório (Toste, 2006a, b; Trevenzoli et al., 2007). Esse acréscimo da massa corporal foi acompanhado por uma tendência no aumento da massa de tecido adiposo visceral. Mesmo que não tenha sido analisada neste nosso experimento, acredita-se que os animais do grupo L tenham tido uma ingestão calórica aumentada, pois, sabe-se que o comportamento alimentar de obesos e resistentes à leptina, com o passar do tempo, encontra-se cada vez mais desregulado, apresentando consumo energético aumentado e colaborando para o ganho de peso corporal (Ricci e Bevilacqua, 2012; Jung et al., 2013). Embora não tenha sido observada diferença no ganho de massa corporal em PN75, foi observado aumento da adiposidade e tendência a hiperleptinemia, sugerindo uma resistência ao efeito da leptina dos animais nesta idade.

Quando avaliamos o efeito do ambiente enriquecido, observamos que o AE preveniu o sobrepeso no grupo LAE quando comparado ao grupo L. Não foi observada diferença na massa corporal entre os grupos CAE e LAE. Mainardi et al (2010) também observou que animais criados no ambiente enriquecido no início da vida ganharam menos massa ao longo da vida quando comparados a animais que foram criados em gaiola padrão. Ao analisar a via de sinalização de leptina no núcleo arqueado, Mainardi et al (2010) observaram que o ambiente enriquecido aumenta a sensibilidade a este hormônio, o que poderia justificar estes achados. Outra explicação para o efeito do AE sobre a massa corporal e massa de gordura é que os animais CAE e LAE não apresentaram disfunção tireoidiana, muito pelo contrário, há uma redução da concentração de T4 livre no grupo LAE quando comparado ao grupo L, assim a normalização da adiposidade no grupo LAE aos 150 dias pode ser atribuída à modificação no status tireoideano em PN150 e a redução da massa de gordura em PN75 a outro fator.

A massa corporal e a adiposidade também foram analisadas em PN21, PN45 e PN150 através do DXA. Também não foi observada efeito do tratamento na massa corporal e adiposidade aos 21 e 45 dias. No entanto, houve efeito do AE em PN45 e

PN150. O grupo não tratado com leptina e exposto ao ambiente enriquecido (CAE) apresentou redução no percentual de massa de gordura no tronco e menor percentual de gordura corporal aos 45 dias quando comparado ao grupo C. Em PN150, o grupo CAE apresentou redução da massa de gordura total quando comparado ao grupo C. Previamente, Toste et al (2006a) observaram que o sobrepeso dos animais programados pela hiperleptinemia neonatal foi decorrente do aumento da massa magra. No entanto, no presente estudo não foi observado diferença na massa magra dos animais do grupo L. A divergência destes achados pode ser atribuída aos métodos de avaliação utilizados: no presente trabalho utilizamos o DXA, e no trabalho prévio, Toste et al (2006a) utilizaram o método da carcaça.

#### **4.2 Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a ansiedade**

Na avaliação da ansiedade no início da vida (PN21 e PN30), foi observado um efeito ansiolítico da leptina. Os animais tratados com leptina no período neonatal permaneceram por mais tempo nos braços abertos, e também apresentaram mais entradas nos braços abertos. Recentemente têm-se observado que a leptina age inibindo as respostas ao estresse (Fruhbeck, 2001; Sandoval e Davis, 2003; Harvey, 2007). Tem sido sugerido que a leptina pode desempenhar um papel fisiopatológico importante para a depressão e ansiedade, foi observado que ratos hipoleptinêmicos apresentam diminuição no número de neurônios do córtex pré-frontal (PFC) associados a comportamentos de ansiedade quando submetidos ao LCE (Ates, 2014). Tem sido demonstrado que a leptina é um potente ansiolítico (Liu et al., 2010; Takase, 2014; Olama et al., 2013). Yoshida-Komiya et al (2014) observaram que pacientes ansiosas e depressivas apresentavam baixas concentrações plasmáticas de leptina. Esta redução da ansiedade aos 30 dias de vida pode ser decorrente também do pico de leptina observado no grupo L em PN30. Oates et al (2000) mostraram também que o tratamento com leptina durante o período neonatal reduz a resposta ao estresse, com menor secreção de ACTH e explicam este fenômeno pelas alterações no receptor para glicocorticóide na hipófise e hipotálamo (Malendowicz et al., 2007). Contudo, nós não encontramos alterações na corticosteronemia neste período.

Foi observado que o efeito ansiolítico é perdido ao longo do desenvolvimento. Na adolescência (PN45), os animais tratados com leptina não apresentaram aumento da exploração dos braços abertos, como observado em PN30. Este achado também foi associado à presença de um aumento de 75% nos níveis de leptina no grupo L, embora não seja estatisticamente significativo, podendo assim sugerir que a ausência do efeito ansiolítico seja consequência de uma perda de sensibilidade a leptina, que desencadearia na fase adulta, uma resistência a leptina. Além disso, estes animais apresentaram aumento de colesterol, o que tem sido atribuído a prejuízos comportamentais (Ali-Rahmaniet al., 2014; Hu et al., 2014). Porém, quando esses animais, tratados no período neonatal com leptina, foram expostos ao ambiente enriquecido durante a adolescência observou-se redução da ansiedade quando submetidos ao LCE. Observamos que a redução da ansiedade após a exposição ao ambiente durante 15 dias ocorreu tanto nos animais controles quanto no grupo tratado. A redução da ansiedade em decorrência de um ambiente rico em estímulos tem sido descrita na literatura (Durairaj e Koilmani, 2014; Ravenelle et al., 2014). Uma justificativa para tal achado é a redução da corticosterona sérica em ambos os nossos grupos experimentais expostos ao ambiente enriquecido em PN45.

Em PN75, também não foi observado o efeito ansiolítico da leptina, muito pelo contrário, os animais tratados com leptina no período neonatal apresentaram tendência à ansiedade, visto que a exploração e o tempo de exploração aos braços abertos foram menores que o grupo C. Podemos sugerir que a ausência do efeito ansiolítico seja consequência de uma resistência a leptina, uma vez que encontramos nestes animais um aumento de 108% nos níveis de leptina associada a um aumento de 33% na adiposidade, embora não sejam estatisticamente significativos. Esta falta de diferença estatística se justifica pelo fato que a programação não é um fenômeno determinístico, mas sim probabilístico, de tal forma que este termo tem sido substituído por plasticidade ontogenética ou fenotípica (Hanson e Gluckman, 2004). A grande variabilidade, às vezes, impede de termos diferenças significativas, pois em diferentes ninhadas, alguns animais apresentam o efeito de programação, enquanto outros não. O que determina que o efeito seja significativo é a maior frequência de animais programados e a maior diferença entre os valores do parâmetro avaliado. Mesmo no grupo controle, podemos encontrar animais que apresentam um padrão semelhante ao do animal

programado, mas em muito menor frequência e, geralmente com valores menos acentuados.

A associação entre obesidade, hiperleptinemia e distúrbios de ansiedade é bem descrita na literatura (Valleau e Sullivan, 2014). Associada a esta alteração, os animais L apresentam aumento no índice de Castelli, o qual é um indicativo de risco aterogênico (Krause et al., 2007) e que pode por sua vez ser um fator de risco para prejuízos comportamentais (Hirsch-Reinshagen et al., 2009; Ferreira et al., 2010). Por outro lado, quando avaliamos os animais previamente tratados com leptina e expostos ao ambiente enriquecido durante a adolescência, houve redução da ansiedade. A redução dos comportamentos de ansiedade foi concomitante a redução dos níveis séricos de leptina assim como da redução da adiposidade nestes animais, o que além de ser um efeito direto da prática da atividade física, estimulada pelo AE, suporta a idéia de que o AE aumenta a sensibilidade a leptina (Mainardi et al., 2010). Outros parâmetros afetados de modo positivo pelo AE, e que poderiam prevenir a ansiedade, foram as reduções dos índices de Castelli e de colesterol quando comparamos o grupo LAE com o grupo L.

Aos 150 dias de idade, foi observado um comportamento ansioso quando os animais tratados com leptina foram submetidos ao LCE, o que corrobora estudo anterior do nosso laboratório (Fraga-Marques et al., 2009). Também foi observado um aumento de adiposidade, embora não significativo, e um aumento significativo de leptina. Isto vai ao encontro de estudos populacionais e experimentais que relatam que indivíduos obesos possuem maior chance de desenvolver ansiedade e depressão (Elias et al., 1995; van Balkom et al., 2008; Capuron et al., 2010; Mobbs et al., 2010; Dinel et al., 2011; Asato et al., 2012). A presença da hiperleptinemia e aumento do tecido adiposo sugerem que exista uma resistência a leptina não só ao seu efeito no aumento do metabolismo, mas também ao seu efeito ansiolítico. A hiperleptinemia neonatal altera a circuitaria neuronal e aumenta o risco de doença psiquiátrica (Valleau e Sullivan, 2014). Kitamura et al (2014) sugerem que a hiperleptinemia crônica pode causar uma mudança na excitabilidade cortical aumentando a suscetibilidade de depressão, por exemplo. Koga et al (2014) observaram que uma hiperleptinemia persistente desempenha um importante papel na aceleração das alterações patológicas, como por exemplo, a doença de Alzheimer. Nos ratos hiperleptinêmicos, a coloração nuclear para p-STAT3, ativado por Obr, foi diminuída em neurônios do hipocampo, indicando resistência à leptina.



Enquanto isso, a ativação astrogliar e a expressão astrocitária da isoforma curta (Obr-a) foram reforçadas no hipocampo desses mesmos ratos. O PCR demonstrou que a leptina aumentou os níveis de RNAm para as citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em astrócitos primários. Estas observações sugerem que hiperleptinemia persistente induz a ativação astrocitária, hipersensibilidade a leptina em astrócitos com maior expressão Obr-a, e inflamação, e conseqüentemente acelera quadros de psicopatologia em ratos. O nosso grupo também verificou em dois modelos de programação em que os animais desenvolvem resistência a leptina na idade adulta (desmame precoce e exposição materna a nicotina), alterações na expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos que regulam o metabolismo energético (Younes-Rapozo et al., 2012, 2013), além disso, foi observado astrogliose, que é ativação de astrócitos, característico de um processo inflamatório (Younes-Rapozo et al., 2014, no prelo). O estudo de Liao et al (2004) também corrobora a hipótese da resistência a leptina no surgimento de sintomas psiquiátricos. Foi observado que os sintomas de ansiedade e depressão têm relação direta com os níveis de leptina. Indivíduos com transtorno de estresse pós-traumático e hipervigilância tinham níveis significativamente mais altos de leptina. Outro dado que endossa a hipótese de resistência à leptina é a presença de hiperleptinemia e hipercorticosteronemia no grupo L, uma vez que o efeito da leptina sobre a inibição do eixo HPA (Heiman et al., 1997; Oates et al., 2000) é bem descrito na literatura, que a leptina age inibindo as respostas ao estresse (Fruhbeck, 2001; Sandoval e Davis, 2003; Harvey, 2007). Outra justificativa para o aumento da ansiedade é a presença de hipertrigliceridemia nos animais L quando comparada ao grupo C. Como já descrito, a presença desta alteração associada ou isoladamente a outros parâmetros da SM podem levar a prejuízos comportamentais (Van der Merwe, 2007; Brook et al., 2009). Curiosamente, as concentrações plasmáticas de colesterol normalizaram-se aos 150 dias.

Porém quando os animais previamente tratados com leptina no período neonatal foram expostos no período da adolescência ao ambiente enriquecido houve redução dos níveis de ansiedade. Nossos achados estão de acordo aos descritos na literatura, os quais atribuem ao ambiente enriquecido um efeito ansiolítico (Goes et al., 2014; Leger et al., 2014). O fato da exposição ao AE na adolescência ter efeitos positivos na resposta ao estresse mesmo na idade adulta pode ser justificada pelo fato de que o enriquecimento ambiental no início da vida aumenta o IGF1 (fator de

crescimento semelhante a insulina tipo 1), o qual exerce um papel chave nos efeitos a longo prazo sobre comportamento de ansiedade; as consequências das experiências no início da vida acontecem por mecanismos de ação no desenvolvimento do cérebro e comportamento, e tem extrema relevância clínica (Baldini et al., 2013). Esses achados permitem o desenvolvimento de intervenções que permitam a reversão dos efeitos negativos, reduzindo os riscos de doenças psiquiátricas. Outro trabalho demonstra que a exposição ao AE no início da vida gera efeitos positivos a longo prazo, sendo sugerido que sejam decorrentes da maior sensibilidade a leptina e à insulina (Mainardi et al., 2010). Isto poderia responder alguns de nossos achados, como diminuição da ansiedade e da leptinemia, corticosteronemia, bem como a diminuição da massa de tecido visceral dos animais LAE, quando comparado ao grupo L. Outro benefício do AE que pode também justificar a redução da ansiedade é a redução da trigliceridemia nos animais LAE, que será discutido mais adiante.

#### **4.3 Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a tomada de decisão**

O tratamento com leptina no período neonatal não afetou a tomada de decisão em PN21, PN30 ou PN45. Porém, quando avaliamos o efeito do ambiente enriquecido, em PN45, observamos diminuição no tempo do centro do LCE em ambos os grupos expostos (CAE e LAE) quando comparados aos seus respectivos controles, L e C, melhorando a resposta a tomada de decisão desses animais. Urakawa (2013) observou que o AE aumentou uma subpopulação específica de neurônios GABAérgicos co-expressando parvalbumina-positiva na amígdala basolateral e reduziu a ansiedade e o tempo de permanência no centro do LCE. Estes resultados sugerem que o ambiente enriquecido seja benéfico para certos transtornos psiquiátricos em que a disfunção GABAérgica esteja envolvida. Este comportamento é benéfico visto sugerir uma maior rapidez na resolução de problemas, o que caracteriza uma melhoria cognitiva (Brydges et al., 2012).

Quando avaliamos o efeito da leptina sobre o tempo no centro do LCE observamos um efeito somente em PN75, onde os animais L apresentaram uma redução na tomada de decisão quando comparados aos animais C. Quando estes animais são expostos ao AE não foi mais observada essa diferença. Sabe-se que a

tomada de decisão está relacionada com atividade dopaminérgica mesolímbica (Bahi, 2013) o qual é essencial na motivação para a obtenção de estímulos prazerosos (Berridge, 1996; Berridge e Robinson, 2003). As projeções dopaminérgicas da área VTA e do núcleo accumbens são particularmente influentes no consumo de comida e de drogas (Wyvell e Berridge, 2000; Cannon e Palmiter, 2003; Peciña et al., 2003). A leptina atua sobre este sistema, inibindo a ingestão de alimentos e modulando os neurônios dopaminérgicos (Figlewicz et al., 2003; Fulton et al., 2006; Hommel et al., 2006). Como os animais tratados com leptina no período neonatal apresentam hiperfagia, a alteração na via dopaminérgica destes animais, talvez seja uma provável causa da diminuição da tomada de decisão destes animais. O efeito do ambiente enriquecido sobre a tomada de decisão, observado em ambos os grupos em nesta idade, foi perdido.

Em PN150 o efeito do tratamento sobre a tomada de decisão, observado em PN75, foi perdido e não houve efeito do ambiente enriquecido.

#### **4.4 Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a atividade locomotora**

A leptina pode modificar a atividade locomotora de ratos através de vários sistemas cerebrais. Acredita-se que o efeito da leptina sobre a locomoção esteja relacionada ao estado alimentar, por exemplo, a redução da função de receptores mediada pelo RNAi na VTA resulta em aumento de ingestão alimentar e atividade locomotora (Hommel et al., 2006), enquanto que a administração crônica de leptina em camundongos *ob/ob* diminui a atividade locomotora em resposta à anfetamina (Fulton et al., 2006). Outra região relacionada com atividade locomotora é o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), pois quando orexina/hipocretina é injetada no PVN há um aumento, dose-dependente, da atividade física espontânea (Kiwaki et al., 2004; Novak et al., 2006). No entanto, não foi observado efeito da hiperleptinemia neonatal sobre a atividade locomotora. Ausência de diferenças entre os grupos em relação à locomoção demonstra que o efeito da programação, quando os animais são submetidos ao LCE, é seletivo e corrobora achado prévio desta programação (Fraga-Marques et al., 2009).

Também não foi observado efeito da exposição ao ambiente enriquecido sobre a atividade locomotora, o que vai ao encontro à literatura (Fukushiro et al., 2007; Maruoka et al., 2009).

#### **4.5 Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre atividade exploratória**

A programação pela hiperleptinemia neonatal resulta em aumento da busca por novidade/atividade exploratória em apenas dois períodos ao longo do desenvolvimento: a adolescência (PN30) e a idade adulta (PN150).

O aumento da busca por novidade em PN30 pode ser um fenômeno decorrente da própria idade, pois sabe-se que a adolescência é caracterizada pelo comportamento de experimentar novas sensações o que o faz mais suscetível ao maior consumo e adição de drogas (Torabi et al., 1993; Schorling et al., 1994; Graber et al., 1996; Spear 2000a). Outro fato também importante para a presença de uma atividade exploratória aumentada neste período foi o aumento das concentrações plasmáticas de T4 no grupo L quando comparado ao grupo C, pois trabalhos mostram que altos níveis deste hormônio geram hiperatividade (Sjödén e Lindqvist, 1978). Além destes fatores, foi observado um pico de leptina em PN30 nos animais L, corroborando dados anteriores de nosso laboratório (Toste et al., 2006; Cavalcanti et al., 2014). A leptina aumenta a motivação (Cota et al., 2006; Fulton et al., 2006) o que poderia resultar numa maior busca por novos estímulos (Berridge, 1996; Berridge e Robinson, 2003).

Em PN45 e PN75 não foi mais observado efeito do tratamento ou do ambiente enriquecido sobre este comportamento, não houve diferença na concentração de T4 ou de leptina destes animais que justificasse uma alteração.

Aos 150 dias de vida animais tratados com leptina no período neonatal, quando comparados ao grupo C, apresentaram hiperatividade quando submetidos ao teste de campo vazado o que corrobora estudo anterior do nosso laboratório (Fraga-Marques et al., 2009). Diversos trabalhos mostram uma relação entre a leptina e a atividade exploratória, mas este efeito não é bem estabelecido. Foi observado que animais apresentam aumento de sua atividade quando submetidos à restrição alimentar (Russell et al., 1987). Contrariamente, estudos mostram que a leptina diminui o comportamento exploratório em animais com restrição alimentar

(Exner et al., 2000; Buyse et al., 2001). A hiperatividade induzida pela inanição parcial é um fenômeno bem caracterizado em estudos em animais (Russell et al., 1987; Morse et al., 1995). O aumento da atividade é proporcional à restrição alimentar e a privação total de comida altera o padrão de atividade noturna (Morse et al., 1995). O rápido declínio da secreção de leptina associada à restrição calórica e à perda de peso (Ahima et al., 1996; Kolaczynski et al., 1996) poderia representar o fato desencadeador da hiperatividade observada na inanição parcial e na anorexia nervosa (Exner et al., 2000). Buyse et al (2001) observaram que os animais tratados com leptina apresentaram redução no número de orifícios explorados e na duração dessa exploração quando submetidos ao teste de campo vazado e que esta redução da exploração é dependente do estado nutricional. Segundo Morrison (2009), a redução da atividade exploratória pode ter relação com a menor motivação para adquirir recompensa, pois a leptina é capaz de reduzir o consumo alimentar. Porém, como já publicado em diversos trabalhos do nosso laboratório, a programação pela hiperleptinemia neonatal resulta em hiperleptinemia e hiperfagia na idade adulta, ou seja, o animal mesmo alimentado não está saciado o que provavelmente estaria gerando o aumento da atividade exploratória pela procura por comida, sendo assim a resistência a leptina, consequente da hiperleptinemia neonatal, seria uma explicação para este comportamento. Esta suposição é corroborada pelo estudo de Quillfeldt (2010), o qual observou aumento da atividade exploratória e resistência à leptina na prole adulta, cujas mães eram obesas.

Quando comparamos o grupo LAE com o grupo L, observamos que a hiperatividade induzida pela hiperleptinemia foi prevenida pela exposição ao ambiente enriquecido. Este efeito está de acordo com a literatura, onde animais SHR, quando submetidos ao AE, apresentaram redução da sua atividade exploratória (Pamplona, 2009; de Carvalho et al., 2010). O SHR é uma linhagem espontaneamente hipertensa, que “naturalmente” apresenta características do transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) (Russel, 2007). Além destes trabalhos, Magalhães (2008) observaram que a exposição à cocaína no início da vida geralmente é associada a alterações no desenvolvimento do sistema de neurotransmissores e estrutura do SNC, as quais são correlacionadas com hiperatividade. No entanto, o ambiente enriquecido nos estágios iniciais da vida afetou de modo positivo o desenvolvimento estrutural e comportamental de ratos

expostos à cocaína no período pós-natal inibindo a hiperatividade induzida pela cocaína.

Outro parâmetro que foi normalizado com a exposição ao AE, e que também possa ser uma explicação para a prevenção da hiperatividade na idade adulta, foi a concentração de T4 livre nos animais previamente tratados com leptina (LAE) quando comparados ao grupo L.

#### **4.6 Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a leptinemia**

Foi observado aumento das concentrações plasmáticas de leptina nos animais tratados com leptina duas horas ao final do tratamento quando comparados aos animais controle.

Em PN21 não foi mais observada diferença significativa na leptinemia entre os grupos L e C, como seria esperado face a depuração deste hormônio. Porém em PN30, foi observado um aumento na leptinemia no grupo tratado. Este achado é corroborado por estudos prévios do nosso laboratório, que mostraram que a hiperleptinemia neonatal resulta em um pico secundário de leptina aos 30 dias de vida (Toste et al., 2006). Este pico já seria um efeito da programação neonatal pelo tratamento com leptina nos 10 primeiros dias de vida. Parece que este pico é de fundamental importância para a programação na idade adulta, visto que o bloqueio desta hiperleptinemia, aos 30 dias de vida, pelo tratamento com anticorpo contra leptina, previne os efeitos a longo prazo (Trotta et al., 2011). Além disso, a exposição ao frio por apenas uma noite, aos 30 dias de vida, além de reverter a hiperleptinemia, previne a resistência central a leptina (Dutra et al., 2007).

No período da adolescência (PN45), apesar do aumento de 75% da leptinemia no grupo L, não foi observado efeito significativo do tratamento sobre este parâmetro. Este dado pode ser explicado, em parte, pela ausência de alterações na adiposidade destes animais, já que é bem conhecido que o tecido adiposo é o local do corpo que mais secreta esse hormônio (Ahima, 2005; Münzberg e Morrison, 2014). Também não foi encontrado efeito da exposição ao ambiente enriquecido na adolescência sobre os níveis plasmáticos de leptina.

Na idade adulta (PN75 e PN150) observamos que a leptinemia foi maior no grupo L quando comparados ao grupo C. Isso pode ser explicado pela maior

quantidade de tecido adiposo encontrado em PN75 e PN150 nos animais tratados com leptina. Quando os animais tratados com leptina são comparados aos animais tratados e expostos ao ambiente enriquecido na adolescência, observa-se que o grupo LAE apresenta redução da leptinemia nestas duas idades o que também é acompanhada por menor adiposidade visceral. Sendo assim, o ambiente enriquecido foi capaz de reverter a hiperleptinemia na idade adulta resultante da programação. Podemos sugerir que este efeito positivo, seja decorrente da menor adiposidade visceral encontrada nestes animais e que seja decorrente da prática da atividade física estimulada pelo ambiente enriquecido. Porém, vários são os fatores que influenciam nos níveis de leptina, múltiplas são as vias de sinalização da leptina que podem coordenar a regulação da homeostase energética (Zhang, 1997). Um trabalho recente demonstrou que o ambiente enriquecido aumenta a sensibilidade a leptina e a insulina (Mainardi et al., 2010). Assim, também poderíamos sugerir que a normalização da concentração de leptina se deva a uma maior sensibilidade a este hormônio. No entanto, outras análises seriam necessárias sobre a sinalização da leptina e a transcrição do seu gene.

#### **4.7 Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre a corticosteronemia**

Nos períodos de PN10, PN21 e PN30 não foram observados efeito da programação com leptina na concentração plasmática de corticosterona.

Já em PN45 apesar da programação pela hiperleptinemia neonatal não alterar a corticosteronemia, foi observado um efeito do ambiente sobre ambos os grupos. A concentração de corticosterona foi reduzida no grupo CAE e LAE quando comparados aos seus respectivos controles. Este dado corrobora achados prévios os quais demonstram que o enriquecimento ambiental diminui a ansiedade e o medo (Pascual e Figueroa, 1996; Thiel et al., 1999; Chapillon et al., 2002; Baldini et al., 2013; Urakawa et al., 2013). Foi observado que animais que foram submetidos ao AE, no período de lactação, quando expostos ao campo vazado, na idade adulta, apresentaram maior atividade no centro do equipamento (Kohl et al., 2002), o que representa menor nível de ansiedade (Thiel et al., 1999). Também foi demonstrado que animais expostos ao AE além de obterem melhor resposta comportamental ao estresse apresentaram redução do nível de corticosterona (Liu et al., 2000; van

Praag et al., 2002; Peña, 2008). Os níveis de corticosterona são tradicionalmente utilizados como marcador dos níveis de estresse, ansiedade e depressão (Holsboer, 2000).

Aos 75 dias não foi observada ação da hiperleptinemia neonatal nem a ação do ambiente enriquecido sobre a corticosteronemia entre os grupos experimentais. O que mais uma vez, mostra que neste período da vida, os animais são resistentes ao efeito da programação.

Em PN150 foi observado aumento da corticosteronemia nos animais tratados previamente com leptina quando comparados aos animais controle, corroborando um estudo anterior do nosso laboratório (Fraga-Marques et al., 2009). Nosso achado está de acordo com o estudo de Samuelsson et al (2014) o qual demonstrou que a hiperleptinemia neonatal influenciou de forma permanente, ocorrendo uma resposta exacerbada do eixo HPA ao estresse. A hipercorticosteronemia encontrada nos animais programados pode ser justificada pela resistência a leptina, uma vez que nesta idade os animais apresentam hiperleptinemia, mas a corticosteronemia permanece alta, uma vez que se sabe que leptina inibe o eixo HPA (Heiman et al., 1997; Oates et al., 2000). Também pode ser justificado pela tendência de maior massa de gordura visceral, uma vez que o aumento da adiposidade está relacionado com hipercorticosteronemia (Perelló et al., 2004). Ates (2014) observou aumento de corticosterona no sangue em ratos diabéticos. Estes resultados indicam que a redução da leptina regula a expressão do receptor da leptina e pode afetar os neurônios do PFC, que eventualmente provocam comportamentos de ansiedade e depressão observados em ratos diabéticos. Tanto na síndrome de ansiedade quanto da síndrome depressiva há aumento dos níveis de corticosterona (Landgraf et al., 1999; Gonik et al., 2012).

Quando esses animais são expostos ao ambiente enriquecido no período de adolescência, não foi encontrada diferença na corticosteronemia na idade adulta. Apesar de não ter havido diferença entre os grupos LAE e CAE, expostos ao ambiente enriquecido, podemos concluir que o ambiente enriquecido foi capaz de reduzir a corticosteronemia no grupo LAE. Este efeito do ambiente enriquecido a longo prazo sobre os níveis de corticosterona foi descrito em estudos que observaram que mesmo quando animais são submetidos a situações de estresse no período pré-natal e são expostos ao AE na adolescência, o AE é eficaz na inibição da resposta ao estresse (Morley-Fletcher et al., 2003; Laviola et al., 2004).



#### **4.8 Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre os hormônios tireoidianos**

Na análise da função tireoidiana, não observamos nenhum efeito do tratamento ou do AE sobre as concentrações de T3 total. Porém, o T4 livre foi maior em PN30 no grupo L. Como em PN30 há um pico secundário de leptina, este poderia explicar o aumento de T4, já que se sabe que leptina estimula a função tireóidea (Nowak et al., 2002; Lisboa et al., 2003; Oliveira et al., 2007).

Em PN45 e PN75 não foi observado efeito do tratamento ou do AE, mas em PN150, o grupo L apresentou uma tendência a elevação das concentrações de T4 livre quando comparado ao grupo C, como descrito por Toste et al (2006b). Neste animal, o ambiente enriquecido foi capaz de reduzir os níveis de T4 livre, portanto o AE normalizou a função tireoideana. O efeito do ambiente enriquecido na normalização da função tiroideana e do comportamento, é corroborado por trabalhos prévios os quais observaram que animais hipertireoideos quando expostos ao AE apresentaram normalização da função tiroideana e inibição da hiperatividade quando avaliado no teste de campo aberto (Sjödén e Lindqvist, 1976, 1978).

#### **4.9 Efeito da hiperleptinemia neonatal e do ambiente enriquecido sobre o perfil lipídico, glicemia de jejum e insulinemia**

Observamos um efeito do tratamento com leptina logo no início da vida sobre o perfil lipídico dos animais. Em PN21, o grupo L apresentou uma tendência ao aumento do Índice de Castelli I e aumento significativo no índice de Castelli II. O aumento deste índice está associado à maior risco aterogênico. Isto é também observado em PN30, onde há aumento significativo do Índice de Castelli I no grupo L. Haraguchi et al (2014) também encontrou relação entre os níveis de LDL, leptina e riscos de aterosclerose. No entanto, este resultado não é consensual, pois Idris e Sunitha (2014) não encontrou diferença significativa entre os níveis de leptina e desenvolvimento de doenças associadas com a aterosclerose.

Em PN45 há um efeito do tratamento sobre os níveis de LDL e de colesterol total. Foi observado que o grupo L, quando comparado ao grupo C,

apresenta colesterol total aumentado significativamente e uma tendência ao aumento no LDL. Observamos que a exposição ao ambiente enriquecido reduz estes níveis no grupo LAE. Em PN75 há um aumento significativo no grupo tratado com leptina sobre o Índice de Castelli I. Este aumento é reduzido quando estes animais tratados com leptina são expostos ao AE. O ambiente enriquecido também afeta de modo positivo os níveis de LDL e colesterol total, o grupo CAE apresenta redução de LDL e colesterol total quando comparados ao grupo C. Quando comparamos o grupo LAE com o grupo L observamos uma redução de LDL próximo da significância e redução do colesterol total. Aos 150 dias de vida o grupo tratado previamente com leptina (grupo L) apresentou hipertrigliceridemia quando comparados aos animais C. Quando analisamos o efeito do ambiente enriquecido, observamos que houve redução da hipertrigliceridemia nos animais LAE quando comparado aos animais L. Sugerimos então que a programação pela hiperleptinemia neonatal resultou na vida adulta em níveis elevados de triglicérides, corroborando o estudo de Toste et al (2006), o que foi corrigido pela exposição ao AE na adolescência.

Nem a programação (tratamento com leptina), nem a exposição ao ambiente enriquecido modificaram a insulinemia nas idades avaliadas.

O efeito benéfico do ambiente enriquecido sobre o LDL, o colesterol total, hipertrigliceridemia e índice de Castelli pode ser atribuído à prática de atividade física estimulada pelo AE, pois, vários artigos têm demonstrado a eficácia da atividade física na prevenção de doenças cardiovasculares (Cortés-Télles, 2014; Drenowatz et al., 2014; Kowal, 2014; Wang, 2014). Outro fator que pode justificar o efeito benéfico do AE é o aumento da interação social promovida pelo AE, pois Bernberg (2008) observou que o isolamento social contribui para o aumento de triglicérides. Além disso, o efeito sobre a melhoria da sensibilidade a leptina (Mainardi et al., 2010) pode também contribuir para a melhoria do perfil lipídico. Assim, a hipertrigliceridemia do animal programado pela hiperleptinemia neonatal pode ser agravada pela combinação da menor interação social e do sedentarismo em animais mantidos em gaiola padrão.

## CONCLUSÃO

Ratos programados pela hiperleptinemia neonatal apresentaram alterações no comportamento de ansiedade ao longo do desenvolvimento. Inicialmente foi observado efeito ansiolítico, porém ao longo do desenvolvimento esse efeito se perde e, verifica-se efeito inverso na idade adulta. A exposição ao ambiente enriquecido no período da adolescência (PN30 até PN45) previne este efeito ansiogênico.

Os ratos programados pela hiperleptinemia neonatal apresentaram na vida adulta comportamento de maior atividade exploratória, também prevenido pela exposição ao AE.

O ambiente enriquecido foi capaz de reverter alguns parâmetros endócrino-metabólicos em animais programados pela hiperleptinemia neonatal, através da: redução na leptinemia, corticosteronemia, tiroxinemia, colesterolemia, trigliceridemia e também redução do risco aterogênico. Cada um destes fatores por si só contribuem para as alterações comportamentais e a prevenção dos distúrbios endócrino-metabólicos, em especial a leptinemia, podem ser de fundamental importância para os mecanismos pelos quais o AE previne as alterações comportamentais.

## REFERÊNCIAS

- Abreu-Villaça Y, Nunes F, Queiroz-Gomes FE, Manhães AC, Filgueiras CC. Combined exposure to nicotine and ethanol in adolescent mice differentially affects anxiety levels during exposure, short term and long term withdrawal. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33:599-610.
- Abreu-Villaça Y, Queiroz-Gomes F, Do E, Dal Monte AP, Filgueiras CC, Manhães AC. Individual differences in novelty-seeking behaviour but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res*. 2006; 167(1):175-182.
- Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, Flier JS. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology*. 1999; 140(6):2755-62.
- Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62:413-37.
- Ahima RS, Hileman SM. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. *Regul Pept*. 2000; 92(1-3):1-7.
- Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav*. 2004; 81(2):223-41.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996; 382(6588):250-2.
- Ahima RS. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab*. 2005; 16(7):307-13.
- Ahima RS. Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Front Horm Res*. 2000; 26:42-56.
- Aiston S, Agius L. Leptin enhances glycogen storage in hepatocytes by inhibition of phosphorylase and exerts an additive effect with insulin. *Diabetes*. 1999; 48(1):15-20.
- Ali-Rahmani F, Grigson PS, Lee S, Neely E, Connor JR, Schengrund CL. H63D mutation in hemochromatosis alters cholesterol metabolism and induces memory impairment. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(6):1511.e1-12.
- Alvarez G, Visitación Bartolomé M, Miana M, Jurado-López R, Martín R, Zuluaga P, Martínez-Martínez E, Nieto ML, Álvarez-Sala LA, Millán J, Lahera V, Cachafeiro V. The effects of adiponectin and leptin on human endothelial cell proliferation: a live-cell study. *J Vasc Res*. 2012; 49(2):111-22.
- Andrade LH, Wang YP, Andreoni S, Silveira CM, Alexandrino-Silva C, Siu ER, Nishimura R, Anthony JC, Gattaz WF, Kessler RC, Viana MC. Mental disorders in megacities: findings from the São Paulo megacity mental health survey, Brazil. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31879.

Armstrong KR, Clark TR, Peterson MR. Use of Corn-Husk Nesting Material to Reduce Aggression in Caged Mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 1998; 37(4):64-66.

Arnold SE, Lucki I, Brookshire BR, Carlson GC, Browne CA, Kazi H, Bang S, Choi BR, Chen Y, McMullen MF, Kim SF. High fat diet produces brain insulin resistance, synaptodendritic abnormalities and altered behavior in mice. *Neurobiol Dis*. 2014; 67:79-87.

Asakawa A, Inui A, Inui T, Katsuura G, Fujino MA, Kasuga M. Leptin treatment ameliorates anxiety in ob/ob obese mice. *J. Diabetes Complications*. 2003; 17(2):105-107.

Asato M, Ikeda H, Kamei J. Effects of diabetes and obesity on the higher brain functions in rodents. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 2012; 32(5-6):251-5.

Ates M, Dayi A, Kiray M, Sisman AR, Agilkaya S, Aksu I, Baykara B, Buyuk E, Cetinkaya C, Cingoz S, Uysal N. Anxiety- and depression-like behavior are correlated with leptin and leptin receptor expression in prefrontal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biotech Histochem*. 2014; 89(3):161-71.

Bahi A. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013; 105:83-8.

Balaskó M, Soós S, Székely M, Pétervári E. Leptin and aging: Review and questions with particular emphasis on its role in the central regulation of energy balance. *J Chem Neuroanat*. 2014.

Baldini S, Restani L, Baroncelli L, Coltelli M, Franco R, Cenni MC, Maffei L, Berardi N. Enriched early life experiences reduce adult anxiety-like behavior in rats: a role for insulin-like growth factor 1. *J Neurosci*. 2013; 33(28):11715-23.

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996; 17(2):305-11.

Banks WA. Is obesity a disease of the blood-brain barrier? Physiological, pathological, and evolutionary considerations. *Curr Pharm Des*. 2003; 9(10):801-9.

Bannerman DM, Rawlins JN, McHugh SB, Deacon RM, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HH, Feldon J. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 2004; 28(3):273-283.

Bardo MT, Donohew RL, Harrington NG. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav Brain Res*. 1996; 77(1-2):23-43.

Bardo MT, Dwoskin LP. Biological connection between novelty- and drug-seeking motivational systems. *Nebr Symp Motiv*. 2004; 50:127-58.

Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995; 311(6998):171-4.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *Eur. J. Epidemiol.* 2003; 18(8):733-736.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr.* 2004; 23(6 Suppl):588S-595S.

Bast T, Feldon J. Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog. Neurobiol.* 2003; 70 (4):319-345.

Bennett EL, Krech D, Rosenzweig MR. Reability and Regional Specificity of Cerebral Effects of Environmental Complexity and Training. *J Comp Physiol Physiol Psychol.* 1964; 57:440-1.

Bereiter DA, Jeanrenaud B. Altered dendritic orientation of hypothalamic neurons from genetically obese (ob/ob) mice. *Brain Research.* 1980; 202:201-206.

Bereiter DA, Jeanrenaud B. Altered neuroanatomical organization in the central nervous system of the genetically obese (ob/ob) mouse. *Brain Research.* 1979; 165:249-260.

Bernberg E, Andersson IJ, Gan LM, Naylor AS, Johansson ME, Bergström G. Effects of social isolation and environmental enrichment on atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Stress.* 2008;11(5):381-9.

Berridge KC, Robinson TE. Parsing reward. *Trends Neurosci.* 2003; 26(9):507-13. Errata em: *Trends Neurosci.* 2003; 26(11):581.

Berridge KC. Food reward: brain substrates of wanting and liking, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1996; 20:1-25.

Berti L, Kellerer M, Capp E, Häring HU. Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect. *Diabetologia.* 1997; 40(5):606-9.

Bezard E, Dovero S, Belin D, Duconger S, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Piazza PV, Gross CE, Jaber M. Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. *J Neurosci.* 2003; 23(35):10999-1007.

Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem.* 1999; 274(42):30059-65.

Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell.* 1998; 1(4):619-25.

Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res.* 2004; 59:305-31.

Blanchard DC, Blanchard RJ. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1972; 81 (2):281-290.

Ble A, Windham BG, Bandinelli S, Taub DD, Volpato S, Bartali B, Tracy RP, Guralnik JM, Ferrucci L. Relation of plasma leptin to C-reactive protein in older adults (from the Invecchiare nel Chianti study). *Am J Cardiol.* 2005; 96(7):991-5.

Blüher S, Mantzoros CS. Leptin in humans: lessons from translational research. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(3):991S-997S.

Boguszewski CL, Paz-Filho G, Velloso LA. Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. *Endokrynol Pol.* 2010; 61(2):194-206.

Boissier JR, Simon P. The exploration reaction in the mouse. Preliminary note. *Therapie.* 1962; 17:1225-32.

Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Pazos-Moura CC, Reis AM, Moura EG. Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Horm Metab Res.* 2005; 37(4):220-5.

Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol.* 2007; 192(2):339-44.

Bouret SG, Simerly RB. Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology.* 2004; 145(6):2621-6.

Bouret SG. Neurodevelopmental actions of leptin. *Brain Res.* 2010;1350:2-9.

Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res.* 2009;197(1):125-37.

Brook JS, Zhang C, Saar NS, Brook DW. Psychosocial predictors, higher body mass index, and aspects of neurocognitive dysfunction. *Percept Mot Skills.* 2009; 108(1):181-95.

Brydges NM, Hall L, Nicolson R, Holmes MC, Hall J. The effects of juvenile stress on anxiety, cognitive bias and decision making in adulthood: a rat model. *PLoS One.* 2012; 7(10):e48143.

Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Laakso K, Jensen MD, Parisi JE, Lloyd RV. The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology.* 2000; 71(3):187-95.

Buyse M, Bado A, Daugé V. Leptin decreases feeding and exploratory behaviour via interactions with CCK(1) receptors in the rat. *Neuropharmacology.* 2001; 40 (6):818-825.

Cameron CM. The environment: whose responsibility. *J S Afr Vet Assoc.* 1993; 64(2):62-6. Afrikaans, English.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995; 269(5223):546-9.

Cannon CM, Palmiter RD. Reward without dopamine. *J. Neurosci.* 2003; 23:10827-10831.

Cao GY, Considine RV, Lynn RB. Leptin receptors in the adrenal medulla of the rat. *Am J Physiol.* 1997; 273(2 Pt 1):E448-52.

Capuron L, Poitou C, Machaux-Tholliez D, Frochot V, Bouillot JL, Basdevant A, Layé S, Clément K. Relationship between adiposity, emotional status and eating behaviour in obese women: role of inflammation. *Psychol Med.* 2011; 41(7):1517-28.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29(8):1193-205.

Carter S, Caron A, Richard D, Picard F. Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clin Interv Aging.* 2013; 8:829-44.

Carvalho JC, de Oliveira E, Peixoto-Silva N, Fraga MC, Nobre JL, Lisboa PC, Moura EG. Maternal prolactin inhibition causes changes in leptin at 22 and 30-days old pups. *Horm Metab Res.* 2014.

Casey BJ, Ruberry EJ, Libby V, Glatt CE, Hare T, Soliman F, Duhoux S, Frielingsdorf H, Tottenham N. Transitional and translational studies of risk for anxiety. *Depress Anxiety.* 2011; 28(1):18-28.

Cassano WJ Jr, D'mello AP. Acute stress-induced facilitation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: evidence for the roles of stressor duration and serotonin. *Neuroendocrinology.* 2001; 74(3):167-77.

Ceddia RB, William WN Jr, Lima FB, Curi R. Leptin inhibits insulin-stimulated incorporation of glucose into lipids and stimulates glucose decarboxylation in isolated rat adipocytes. *J Endocrinol.* 1998; 158(3):R7-9.

Chapillon P, Patin V, Roy V, Vincent A, Caston J. Effects of pre- and postnatal stimulation on developmental, emotional, and cognitive aspects in rodents: a review. *Dev Psychobiol.* 2002; 41(4):373-87.

Charney DS, Bremner JD. The neurobiology of anxiety disorders. In: Charney DS, Nestler EJ, Bunney BS, editors. *The Neurobiology of Mental Illness.* New York: Oxford University Press; 1999. p. 494-517.



Choi YH, Li C, Hartzell DL, Little DE, Della-Fera MA, Baile CA. ICV leptin effects on spontaneous physical activity and feeding behavior in rats. *Behavioural Brain Research*. 2008; 188:100-108.

Chua SC Jr, Koutras IK, Han L, Liu SM, Kay J, Young SJ, Chung WK, Leibel RL. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics*. 1997; 45(2):264-70.

Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lehouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998; 392(6674):398-401.

Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*. 1973; 9(4):294-8.

Conrad CD<sup>1</sup>, McLaughlin KJ, Harman JS, Foltz C, Wiczorek L, Lightner E, Wright RL. Chronic glucocorticoids increase hippocampal vulnerability to neurotoxicity under conditions that produce CA3 dendritic retraction but fail to impair spatial recognition memory. *J Neurosci*. 2007; 27(31):8278-85.

Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes*. 1996; 45(7):992-4.

Considine RV. Human leptin: an adipocyte hormone with weight-regulatory and endocrine functions. *Semin Vasc Med*. 2005; 5(1):15-24.

Cortés-Télles A<sup>1</sup>, Torre-Bouscoulet L, Mejía-Alfaro R, Silva-Cerón M, Wilkie SS, Guenette JA. Cardiorespiratory and Sensory Responses to Exercise in Well Controlled Asthmatics. *J Asthma*. 2014; 18:1-25.

Cota D, Barrera JG, Seeley RJ. Leptin in energy balance and reward: two faces of the same coin *Neuron*. 2006; 51(6):678-80.

Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides*. 1994; 15(4):731-55.

Cripps RL, Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Fetal and perinatal programming of appetite. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(1):1-11.

Damsgaard CT, Dalskov SM, Laursen RP, Ritz C, Hjorth MF, Lauritzen L, Sørensen LB, Petersen RA, Andersen MR, Stender S, Andersen R, Tetens I, Mølgaard C, Astrup A, Michaelsen KF. Provision of healthy school meals does not affect the metabolic syndrome score in 8-11-year-old children, but reduces cardiometabolic risk markers despite increasing waist circumference. *Br J Nutr*. 2014;112(11):1826-36.

Davis M, Rainnie D, Cassell M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci.* 1994; 17 (5):208-214.

de Carvalho CR, Pandolfo P, Pamplona FA, Takahashi RN. Environmental enrichment reduces the impact of novelty and motivational properties of ethanol in spontaneously hypertensive rats. *Behav Brain Res.* 2010; 208(1):231-6.

De Moura EG, Lisboa PC, Passos MC. Neonatal programming of neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation.* 2008; 15(3):176-88.

De Moura EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci. Rep.* 2005; 25 (3-4):251-269.

De Oliveira Cravo C, Teixeira CV, Passos MC, Dutra SC, de Moura EG, Ramos C. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Horm. Metab. Res.* 2002; 34:400-405.

Del Arco A, Segovia G, Garrido P, de Blas M, Mora F. Stress, prefrontal cortex and environmental enrichment: studies on dopamine and acetylcholine release and working memory performance in rats. *Behav Brain Res.* 2007; 176(2):267-73.

Dellu-Hagedorn F. Relationship between impulsivity, hyperactivity and working memory: a differential analysis in the rat. *Behav Brain Funct.* 2006; 2:10.

Denver RJ, Bonett RM, Boorse GC. Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology.* 2011; 94(1):21-38.

Dicou E, Attoub S, Gressens P. Neuroprotective effects of leptin in vivo and in vitro. *Neuroreport.* 2001; 12(18):3947-3951.

Dinel AL, André C, Aubert A, Ferreira G, Layé S, Castanon N. Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 40:48-59.

Drenowatz C, Sui X, Fritz S, Lavie CJ, Beattie PF, Church TS, Blair SN. The association between resistance exercise and cardiovascular disease risk in women. *J Sci Med Sport.* 2014; S1440-2440(14)00179-0.

Drummond GB (2009) Reporting ethical matters in *The Journal of Physiology*: standards and advice. *J Physiol* 587, 713-719.

Durairaj RV, Koilmani ER. Environmental enrichment modulates glucocorticoid receptor expression and reduces anxiety in Indian field male mouse *Mus booduga* through up-regulation of microRNA-124a. *Gen Comp Endocrinol.* 2014 ;199:26-32.

Durcan MJ, Lister RG. Does directed exploration influence locomotor activity in a holeboard test? *Behav Neural Biol.* 1989; 51(1):121-5.

Dutra SC, Moura EG, Rodrigues AL, Lisboa PC, Bonomo I, Toste FP, Passos MC. Cold exposure restores the decrease in leptin receptors (OB-Rb) caused by neonatal leptin treatment in 30-day-old rats. *J Endocrinol*. 2007; 195(2):351-8.

Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood. *Br J Nutr*. 2012 Dec 28;108(12):2286-95.

Eckert MJ, Abraham WC. Effects of environmental enrichment exposure on synaptic transmission and plasticity in the hippocampus. *Curr Top Behav Neurosci*. 2013;15:165-87.

Eiholzer U, l'Allemand D, van der Sluis I, Steinert H, Gasser T, Ellis K. Body composition abnormalities in children with Prader-Willi syndrome and long-term effects of growth hormone therapy. *Horm Res*. 2000; 53(4):200-6.

Elias PK, D'Agostino RB, Elias MF, Wolf PA. Blood pressure, hypertension, and age as risk factors for poor cognitive performance. *Exp Aging Res*. 1995; 21(4):393-417.

Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1998; 395(4):535-47.

Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. 1999; 22(2):221-32.

Elmquist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol*. 2005; 493(1):63-71.

Emilsson V, Arch JR, de Groot RP, Lister CA, Cawthorne MA. Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues. *FEBS Lett*. 1999; 455(1-2):170-4.

Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2005; 97(2):61-73.

Escorihuela RM, Fernández-Teruel A, Gil L, Aguilar R, Tobeña A, Driscoll P. Inbred Roman high- and low-avoidance rats: differences in anxiety, novelty-seeking, and shuttlebox behaviours. *Physiol. Behav*. 1999; 67(1):19-26.

Exner C, Hebebrand J, Remschmidt H, Wewetzer C, Ziegler A, Herpertz S, Schweiger U, Blum WF, Preibisch G, Heldmaier G, Klingenspor M. Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Mol Psychiatry*. 2000; 5(5):476-81.

Fares RP, Belmeguenai A, Sanchez PE, Kouchi HY, Bodennec J, Morales A, Georges B, Bonnet C, Bouvard S, Sloviter RS, Bezin L. Standardized environmental enrichment supports enhanced brain plasticity in healthy

rats and prevents cognitive impairment in epileptic rats. *PLoS One*. 2013;8(1):e53888.

Farias ED, Gonçalves EM, Morcillo AM, Guerra-Júnior G, Amancio OM. Effects of Programmed Physical Activity on Body Composition in Post-Pubertal Schoolchildren. *J Pediatr (Rio J)*. 2014 Oct 8. pii: S0021-7557(14)00141-7.

Farooqi IS, O'Rahilly S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol*. 2014; 223(1):T63-70.

Farr SA, Banks WA, Morley JE. Effects of leptin on memory processing. *Peptides*. 2006; 27(6):1420-5.

Ferreira CN, Carvalho MG, Fernandes AP, Lima LM, Loures-Valle AA, Dantas J, Janka Z, Palotás A, Sousa MO. Comparative study of apolipoprotein-E polymorphism and plasma lipid levels in dyslipidemic and asymptomatic subjects, and their implication in cardio/cerebro-vascular disorders. *Neurochem Int*. 2010; 56(1):177-82.

Fewlass DC, Noboa K, Pi-Sunyer X, Johnston JM, Yan SD, Tezapsidis N. Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Ab. *FASEB J*. 2004; 18:1870-8.

Figlewicz DP, Evans SB, Murphy J, Hoen M, Baskin DG. Expression of receptors for insulin and leptin in the ventral tegmental area/substantia nigra (VTA/SN) of the rat, *Brain Res*. 2003; 964:107-115.

Figlewicz DP. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284(4):R882-92.

File SE, Wardill AG. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. *Psychopharmacologia*. 1975; 44(1):53-9.

File SE. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav. Brain Res*. 2001; 125:151-157.

Flier JS, Elmquist JK. Energetic pursuit of leptin function. *Nat Biotechnol*. 1997; 15(1):20-1.

Fraga MC, de Moura EG, da Silva Lima N, Lisboa PC, de Oliveira E, Silva JO, Claudio-Neto S, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y, Manhães AC. Anxiety-like, novelty-seeking and memory/learning behavioral traits in male Wistar rats submitted to early weaning. *Physiol Behav*. 2014;124:100-6.

Fraga MC, Moura EG, Silva JO, Bonomo IT, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011; 100(1):165-73.

Fraga-Marques MC, Moura EG, Claudio-Neto S, Trevenzoli IH, Toste FP, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-like

and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. *Horm Behav.* 2009; 55(2):272-9.

Fraga-Marques MC, Moura EG, Silva JO, Claudio-Neto S, Pereira-Toste F, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on short-term memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioral traits of adult male rats. *Behav Brain Res.* 2010; 206(1):147-50.

Friedland RP, Fritsch T, Smyth KA, Koss E, Lerner AJ, Chen CH, Petot GJ, Debanne SM. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(6):3440-5.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998; 395(6704):763-70.

Fruhbeck G. A heliocentric view of leptin. *Proc. Nutr. Soc.* 2001; 60 (3):301-318.

Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, Masuzaki H, Tanaka M, Ozaki S, Nakao K, Mimori T. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 2002; 128(1):21-26.

Fukushiro DF, Calzavara MB, Trombin TF, Lopez GB, Abílio VC, Andersen ML, Tufik S, Frussa-Filho R. Effects of environmental enrichment and paradoxical sleep deprivation on open-field behavior of amphetamine-treated mice. *Physiol Behav.* 2007; 92(4):773-9.

Fulton S, Pissios P, Manchon RP, Stiles L, Frank L, Pothos EN, Maratos-Flier E, Flier JS. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron.* 2006; 51(6):811-822.

Fulton S, Woodside B, Shizgal P. Modulation of brain reward circuitry by leptin. *Science.* 2000; 287:125-128.

Funahashi H, Yada T, Suzuki R, Shioda S. Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int. Rev. Cytol.* 2003; 224:1-27.

Garza JC, Guo M, Zhang W, Lu XY. Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 2008; 283:18238-18247.

Getchell TV, Kwong K, Saunders CP, Stromberg AJ, Getchell ML. Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol. Behav.* 2006; 87:848-856.

Giby VG, Ajith TA. Role of adipokines and peroxisome proliferator-activated receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2014; 6(8):570-9.

Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA, Chrousos GP, Bornstein SR. Expression of Ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83(12):4459-66.

Gluckman PD, Hanson MA. Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med* 2007; 261:461–71.

Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15(4):183-7.

Gluckman P, Hanson M. Echoes of the past: Evolution, development, health and disease. *Discov Med.* 2004; 4(24):401-7.

Goes TC, Antunes FD, Teixeira-Silva F. Environmental enrichment for adult rats: Effects on trait and state anxiety. *Neurosci Lett.* 2014; S0304-3940(14)00807-6.

Gonik M, Frank E, Keßler MS, Czamara D, Bunck M, Yen YC, Pütz B, Holsboer F, Bettecken T, Landgraf R, Müller-Myhsok B, Touma C, Czibere L. The endocrine stress response is linked to one specific locus on chromosome 3 in a mouse model based on extremes in trait anxiety. *BMC Genomics.* 2012;13:579.

Gordon N. Nutrition and cognitive function. *Brain Dev.* 1997; 19(3):165-70.

Graber JA, Petersen AC, Brooks-Gunn J. Pubertal processes: methods, measures, and models. In: Graber JA, Brooks-Gunn J, Petersen AC, editors. *Transitions through adolescence: interpersonal domains and context*, Mahwah, NJ: Lawrence Erlbaum Associates, 1996. p. 23–53.

Graeff FG, Netto CF, Zangrossi H Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998; 23(2):237-46.

Graeff FG, Audi EA, Almeida SS, Graeff EO, Hunziker MH. Behavioral effects of 5-HT receptor ligands in the aversive brain stimulation, elevated plus-maze and learned helplessness tests. *Neurosci Biobehav Rev.* 1990 Winter;14(4):501-6.

Graeff FG, Silveira MC, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RM. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res.* 1993; 58(1-2):123-31.

Gunstad J, Cohen RA, Paul RH, Tate DF, Hoth KF, Poppas A. Understanding reported cognitive dysfunction in older adults with cardiovascular disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2006a; 2(2):213-8.

Gunstad J, Paul RH, Cohen RA, Tate DF, Gordon E. Obesity is associated with memory deficits in young and middle-aged adults. *Eat Weight Disord.* 2006b; 11(1):15-9.

Gunstad J, Paul RH, Cohen RA, Tate DF, Spitznagel MB, Gordon E. Elevated body mass index is associated with executive dysfunction in otherwise healthy adults. *Compr Psychiatry.* 2007; 48(1):57-61.

Gunstad J, Spitznagel MB, Keary TA, Glickman E, Alexander T, Karrer J, Stanek K, Reese L, Juvancic-Heltzel J. Serum leptin levels are associated with cognitive function in older adults. *Brain Res.* 2008; 1230:233-236.

Guo Z, Jiang H, Xu X, Duan W, Mattson MP. Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK/STAT3 and mitochondrial stabilization. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(3):1754-1763.

Håkansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci.* 1998; 18(1):559-72.

Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(16):8878-83.

Hansen TB, Vahl N, Jørgensen JO, Christiansen JS, Hagen C. Soft tissue changes in adults with acquired growth hormone deficiency during substitution treatment. A double-blind, randomized, placebo-controlled study after a year of treatment. *Ugeskr Laeger.* 1997.159(28):4394-9. Danish.

Haraguchi A, Hayashida N, Kamasaki T, Miyamoto I, Usui T, Ando T, Abiru N, Yamasaki H, Chiba K, Kudo T, Kawakami A, Takamura N. Uptake of Aortic 18F-FDG Is Correlated with Low-Density Lipoprotein Cholesterol and Leptin in a General Population. *PLoS One.* 2014; 6;9(11):e111990.

Harvey J, Ashford ML. Leptin in the CNS: much more than a satiety signal. *Neuropharmacology.* 2003; 44:845-854.

Harvey J, Shanley LJ, O'Malley D, Irving AJ. Leptin: a potential cognitive enhancer. *Biochem. Soc. Trans.* 2005; 33(Pt 5):1029-1032.

Harvey J. Leptin regulation of neuronal excitability and cognitive function. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2007; 7(6):643-647.

Harvey N, Cooper C. The developmental origins of osteoporotic fracture. *J Br Menopause Soc.* 2004; 10(1):14-5, 29.

Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology.* 1997; 138(9):3859-3863.

Hendrie CA, Eilam D, Weiss SM. Effects of diazepam and buspirone on the behaviour of wild voles (*Microtus socialis*) in two models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1997; 58(2):573-6.

Hirsch-Reinshagen V, Burgess BL, Wellington CL. Why lipids are important for Alzheimer disease. *Mol Cell Biochem.* 2009; 326(1-2):121-9.

Hoda MR, Keely SJ, Bertelsen LS, Junger WG, Dharmasena D, Barrett KE. Leptin acts as a mitogenic and antiapoptotic factor for colonic cancer cells. *Br. J. Surg.* 2007; 94:346-354.

Hoebel BG, Monaco AP, Hernandez L, Aulisi EF, Stanley BG, Lenard L. Self-injection of amphetamine directly into the brain. *Psychopharmacology (Berl)*. 1983; 81(2):158-63.

Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1996; 54:21-30.

Holden KF, Lindquist K, Tylavsky FA, Rosano C, Harris TB, Yaffe K; for the Health ABC study. Serum leptin level and cognition in the elderly: Findings from the Health ABC Study. *Neurobiol Aging*. 2009; 30(9):1483-9.

Holemans K, Verhaeghe J, Dequeker J, Van Assche FA. Insulin sensitivity in adult female rats subjected to malnutrition during the perinatal period. *J Soc Gynecol Investig.* 1996; 3(2):71-7.

Holsboer F. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*. 2000; 23(5):477-501.

Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, Thurmon JJ, Marinelli M, DiLeone RJ. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron*. 2006; 51:801-10.

Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatgei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom SR. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice, *J. Clin. Invest.* 1999; 104 (8):1051-1059.

Hu X, Wang T, Luo J, Liang S, Li W, Wu X, Jin F, Wang L. Age-dependent effect of high cholesterol diets on anxiety-like behavior in elevated plus maze test in rats. *Behav Brain Funct.* 2014; 10:30.

Huang JS, Letendre S, Marquie-Beck J, Cherner M, McCutchan JA, Grant I, Ellis R. Low CSF leptin levels are associated with worse learning and memory performance in HIV-infected men. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007; 2(4):352-8.

Huang Q, Rivest R, Richard D. Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. *Endocrinology*. 1998; 139(4):1524-32.

Huang XF, Koutcherov I, Lin S, Wang HQ, Storlien L. Localization of leptin receptor mRNA expression in mouse brain. *Neuroreport*. 1996; 7(15-17):2635-8.

Idris S, Sunitha S. Assessment of BMI, Serum Leptin Levels and Lipid Profile in Patients with Skin Tags. *J Clin Diagn Res.* 2014 ; 8(9):CC01-3.

Ikemoto S, Wise RA. Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology*. 2004; (47 Suppl 1):190-201.

Ilin Y, Richter-Levin G. Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. *PLoS One*. 2009;4(1):e4329.



Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Epidemiologia e Serviços da Saúde. Revista do Sistema Único da Saúde do Brasil, Volume 21 - No 2 - abril/junho de 2012 [acesso em 13 de janeiro, 2014].

Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 967:379-88.

Jung CH, Kim MS. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res.* 2013; 36(2):201-7.

Kain ZN, Zimolo Z, Heninger G. Leptin and the perioperative neuroendocrinological stress response. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(7):2438-42.

Kar BR, Rao SL, Chandramouli BA. Cognitive development in children with chronic protein energy malnutrition. *Behav Brain Funct* 2008; 4:31.

Kask A, Harro J, von Hörsten S, Redrobe JP, Dumont Y, Quirion R. The neurocircuitry and receptor subtypes mediating anxiolytic-like effects of neuropeptide Y. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002; 26(3):259-83.

Kellerer M, Koch M, Metzinger E, Mushack J, Capp E, Häring HU. Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways. *Diabetologia.* 1997; 40(11):1358-62.

Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol.* 1998; 8(16):939-42.

Kempermann G, Gage FH. Experience-dependent regulation of adult hippocampal neurogenesis: effects of long-term stimulation and stimulus withdrawal. *Hippocampus.* 1999; 9(3):321-32.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci.* 1998; 18(9):3206-12.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 16; 94(19):10409-14.

Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 1997a; 386(6624):493-5.

Kennedy GC. The role of fat depot in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc Roy Soc London Biol Sci* 1953 140 (901):578-592.

Khan SM, Hamnvik OP, Brinkoetter M, Mantzoros CS. Leptin as a modulator of neuroendocrine function in humans. *Yonsei Med J.* 2012; 53(4):671-9.

Kitamura E, Kanazawa N, Hamada J. Hyperleptinemia increases the susceptibility of the cortex to generate cortical spreading depression. *Cephalalgia*. 2014.

Kiwaki K, Kotz CM, Wang C, Lanningham-Foster L, Levine JA. Orexin A (hypocretin 1) injected into hypothalamic paraventricular nucleus and spontaneous physical activity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 286(4):E551-9.

Kliethermes CL, Kamens HM, Crabbe JC. Drug reward and intake in lines of mice selectively bred for divergent exploration of a hole board apparatus. *Genes Brain Behav*. 2007; 6(7):608-18.

Koga S, Kojima A, Kuwabara S, Yoshiyama Y. Immunohistochemical analysis of tau phosphorylation and astroglial activation with enhanced leptin receptor expression in diet-induced obesity mouse hippocampus. *Neurosci Lett*. 2014; 571:11-6.

Kohl Z, Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kempermann G. Prewaning enrichment has no lasting effects on adult hippocampal neurogenesis in four-month-old mice. *Genes Brain Behav*. 2002; (1):46-54.

Kolaczynski JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco C, Opentanova I, Nyce MR et al. Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes*. 1996; 45:1511-1515.

Kowal TP, Chessex C, Lee DS, Grace SL. Integrated Cardiovascular Rehabilitation: How do Noncardiac and Polyvascular Disease Patients Fare *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2014.

Krause MP, Hallage T, Gama MP, Sasaki JE, Miculis CP, Buzzachera CF, Silva SG. Association between lipid profile and adiposity in women over age 60. *Arq Bras Cardiol*. 2007; 89(3):147-53, 163-9.

Landgraf R, Wigger A, Holsboer F, Neumann ID. Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J Neuroendocrinol*. 1999; 11(6):405-7.

Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 1996; 91(5):607-15.

Laviola G, Rea M, Morley-Fletcher S, Di Carlo S, Bacosi A, De Simone R, Bertini M, Pacifici R. Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *Eur J Neurosci*. 2004; 20(6):1655-64.

LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J. Neurosci*. 1990; 10(4):1062-1069.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996; 379(6566):632-5.

Lee KS, Jang Y, Chung YK, Chung JH, Oh BH, Hong CH. Relationship between the diagnostic components of metabolic syndrome (MS) and cognition by ApoE genotype in the elderly. *Arch Gerontol Geriatr.* 2009.

Leger M, Bouet V, Freret T, Darmaillacq AS, Dacher M, Dauphin F, Boulouard M, Schumann-Bard P. Environmental enrichment improves recent but not remote memory in association with a modified brain metabolic activation profile in adult mice. *Behav Brain Res.* 2012a; 1; 228(1):22-9.

Leger M, Quiedeville A, Paizanis E, Natkunarajah S, Freret T, Boulouard M, Schumann-Bard P. Environmental enrichment enhances episodic-like memory in association with a modified neuronal activation profile in adult mice. *PLoS One.* 2012b; 7(10):e48043.

Leger M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel JC, Freret T, Schumann-Bard P, Boulouard M. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cereb Cortex.* 2014.

Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F, Petrosini L. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res.* 2005; 163(1):78-90.

Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1997; 138(6):2569-76.

Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Rand WM, Flier JS, Lechan RM. Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* 1998; 68(2):89-97.

Leininger GM. Location, location, location: the CNS sites of leptin action dictate its regulation of homeostatic and hedonic pathways. *Int J Obes (Lond).* 2009; 33 Suppl 2:S14-7.

Levin ED, Cauley M, Johnson JE, Cooper EM, Stapleton HM, Ferguson PL, Seidler FJ, Slotkin TA. Prenatal dexamethasone augments the neurobehavioral teratology of chlorpyrifos: significance for maternal stress and preterm labor. *Neurotoxicol Teratol.* 2014; 41:35-42.

Li XL, Aou S, Oomura Y, Hori N, Fukunaga K, Hori T. Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience.* 2002; 113(3):607-15.

Li Y, Mu Y, Gage FH. Development of neural circuits in the adult hippocampus. *Curr Top Dev Biol.* 2009; 87:149-74.

Li S, Fan YX, Wang W, Tang YY. Effects of acute restraint stress on different components of memory as assessed by object-recognition and object-location tasks in mice. *Behav Brain Res.* 2012; 227(1):199-207.

Liao SC, Lee MB, Lee YJ, Huang TS. Hyperleptinemia in subjects with persistent partial posttraumatic stress disorder after a major earthquake. *Psychosom Med.* 2004; 66(1):23-8.

Lins MC, Moura EG, Lisboa PC, Bonomo IT, Passos MCF. Effects of maternal leptin treatment during lactation on the body weight and leptin resistance of adult offspring. *Regul Pept.* 2005; 127:197-202.

Lisboa PC, Fagundes AT, Denolato AT, Oliveira E, Bonomo IT, Alves SB, Curty FH, Passos MC, Moura EG. Neonatal low-protein diet changes deiodinase activities and pituitary TSH response to TRH in adult rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2008; 233(1):57-63.

Lisboa PC, Oliveira KJ, Cabanelas A, Ortiga-Carvalho TM, Pazos-Moura CC. Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 284(6):E1172-6.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl).* 1987; 92(2):180-5.

Liu YL, Emilsson V, Cawthorne MA. Leptin inhibits glycogen synthesis in the isolated soleus muscle of obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett.* 1997; 411(2-3):351-5.

Liu J, Butler KR, Buxbaum SG, Sung JH, Campbell BW, Taylor HA. Leptinemia and its association with stroke and coronary heart disease in the Jackson Heart Study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010; 72(1):32-7.

Liu J, Garza JC, Bronner J, Kim CS, Zhang W, Lu XY. Acute administration of leptin produces anxiolytic-like effects: a comparison with fluoxetine. *Psychopharmacology (Berl).* 2010; 207(4):535-45.

Liu N, Wang X, McCoubrey WK, Maines MD. Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon unique to rat testis: control by corticosterone of the oxygenase protein expression. *Gene.* 2000; 241(1):175-83.

Liu Q, Chen Y, Copeland D, Ball H, Duff RJ, Rockich B, Londraville RL. Expression of leptin receptor gene in developing and adult zebrafish. *Gen Comp Endocrinol.* 2010; 166(2):346-55.

Liu Y, Li J, Shao K, Huang R, Ye L, Lou J, Jiang C. A leptin derived 30-amino-acid peptide modified pegylated poly-L-lysine dendrigraft for brain targeted gene delivery. *Biomaterials.* 2010; 31(19):5246-57.

Lopes PC, Prado SR, Colombo P. Risk factors associated with obesity and overweight in school children. *Rev Bras Enferm.* 2010; 63(1):73-8.

Lu XY, Kim CS, Frazer A, Zhang W. Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006; 103(5):1593-1598.

Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch. Dis. Child.* 1994; 71(4):288-290.

Lustig RH. The neuroendocrinology of childhood obesity. *Pediatr Clin North Am.* 2001; 48(4):909-30.

MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(20):9034-7.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995; 1(11):1155-61.

Magalhães A, Melo P, Alves CJ, Tavares MA, de Sousa L, Summavielle T. Exploratory behavior in rats postnatally exposed to cocaine and housed in an enriched environment. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1139:358-65.

Mainardi M, Scabia G, Vottari T, Santini F, Pinchera A, Maffei L, Pizzorusso T, Maffei M. A sensitive period for environmental regulation of eating behavior and leptin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(38):16673-8.

Makino S, Shibasaki T, Yamauchi N, Nishioka T, Mimoto T, Wakabayashi I, Gold PW, Hashimoto K. Psychological stress increased corticotropin-releasing hormone mRNA and content in the central nucleus of the amygdala but not in the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Brain Res.* 1999 Dec 11; 850(1-2):136-43.

Malendowicz LK, Rucinski M, Belloni AS, Ziolkowska A, Nussdorfer GG. Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int Rev Cytol.* 2007; 263:63-102.

Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.* 2004; 44(1):5-21.

Manhães AC, Guthierrez MCS, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y. Anxiety-like behavior during nicotine withdrawal predict subsequent nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav Brain Res.* 2008; 193(2):216-24.

Marco E M, Llorente R, Moreno E, Biscaia J M, Guaza C, Viveros M P. Adolescent exposure to nicotine modifies acute functional responses to cannabinoid agonists in rats. *Behavioural Brain Research.* 2006; 172:46-53.

Marques RG, Morales MM, Petroianu A (2009) Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras* 24, 69-74.

Maruoka T, Kodomari I, Yamauchi R, Wada E, Wada K. Maternal enrichment affects prenatal hippocampal proliferation and open-field behaviors in female offspring mice. *Neurosci Lett.* 2009; 454(1):28-32.

- Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*. 1997; 3(9):1029-33.
- Matochik JA, London ED, Yildiz BO, Ozata M, Caglayan S, DePaoli AM, Wong ML, Licinio J. Effect of leptin replacement on brain structure in genetically leptin-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(5):2851-4.
- McNaughton BL, Barnes CA, Gerrard JL, Gothard K, Jung MW, Knierim JJ, Kudrimoti H, Qin Y, Skaggs WE, Suster M, Weaver KL. Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *J Exp Biol*. 1996; 199(Pt 1):173-85.
- Meyer LR, Zhu V, Miller A, Roghair RD. Growth restriction, leptin, and the programming of adult behavior in mice. *Behav Brain Res*. 2014; 275C:131-135.
- Miñana-Solis Mdel C, Escobar C. Increased susceptibility to metabolic alterations in young adult females exposed to early malnutrition. *Int J Biol Sci*. 2006; 3(1):12-9.
- Mobbs O, Crépin C, Thiéry C, Golay A, Van der Linden M. Obesity and the four facets of impulsivity. *Patient Educ Couns*. 2010; 79(3):372-7.
- Mohammed AH, Henriksson BG, Söderström S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res*. 1993; 57(2):183-91.
- Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*. 1999; 140(12):5995-8.
- Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci*. 2003; 18(12):3367-74.
- Morrison CD. Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1792:401-408.
- Morse AD, Russell JC, Hunt TW, Wood GO, Epling WF, Pierce WD. Diurnal variation of intensive running in food-deprived rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73:1519-1523.
- Munzberg H, Myers MG Jr: Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci*. 2005, 8:566-570.
- Münzberg H, Morrison CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism*. 2014; S0026-0495(14)00292-3.
- Myers MG Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res*. 2004; 59:287-304.
- Myers MG Jr, Münzberg H, Leininger GM, Leshan RL. The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell Metab*. 2009; 9(2):117-23.

Negrão AB, Licinio J. Obesity: on the eve of a major conceptual revolution. *Drug Discov Today*. 2000; 5(5):177-179.

Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol*. 1999; 39(4):569-78.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. Mechanisms mediating brain and cognitive reserve: experience-dependent neuroprotection and functional compensation in animal models of neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011; 35(2):331-9.

Nithianantharajah J, Hannan AJ. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol*. 2009; 89(4):369-82.

Novak CM, Kotz CM, Levine JA. Central orexin sensitivity, physical activity, and obesity in diet-induced obese and diet-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290(2):E396-403.

Nowak KW, Kaczmarek P, Mackowiak P, Ziolkowska A, Albertin G, Ginda WJ, Trejter M, Nussdorfer GG, Malendowicz LK. Rat thyroid gland expresses the long form of leptin receptors, and leptin stimulates the function of the gland in euthyroid non-fasted animals. *Int J Mol Med*. 2002; 9(1):31-4.

Nutt DJ. The pharmacology of human anxiety. *Pharmacol Ther*. 1990; 47(2):233-66.

Oates M, Woodside B, Walker C.D. Chronic leptin administration in developing rats reduces stress responsiveness partly through changes in maternal behavior. *Horm. Behav*. 2000; 37(4):366-376.

Olama SM, Elsaid TO, El-Arman M. Serum leptin in Egyptian patients with fibromyalgia syndrome: relation to disease severity. *Int J Rheum Dis*. 2013; 16(5):583-9.

Oldreive CE, Harvey J, Doherty GH. Neurotrophic effects of leptin on cerebellar Purkinje but not granule neurons in vitro. *Neurosci Lett*. 2008; 438(1):17-21.

Oliveira E, Fagundes AT, Alves SB, Pazos-Moura CC, Moura EG, Passos MC, Lisboa PC. Chronic leptin treatment inhibits liver mitochondrial alpha-glycerol-beta-phosphate dehydrogenase in euthyroid rats. *Horm Metab Res*. 2007; 39(12):867-70.

O'Malley D, MacDonald N, Mizielinska S, Connolly CN, Irving AJ, Harvey J. Leptin promotes rapid dynamic changes in hippocampal dendritic morphology. *Mol. Cell Neurosci*. 2007; 35(4):559-572.

Oomura Y, Hori N, Shiraishi T, Fukunaga K, Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, Ishibashi M, Aou S, Li XL, Kohno D, Uramura K, Sougawa H, Yada T, Wayner MJ, Sasaki K. Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats, Peptides. 2006; 27:2738-2749.

Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Soares BA, Pazos-Moura CC. The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: in vivo and in vitro studies. J Endocrinol. 2002; 174(1):121-5.

Oswal A, Yeo G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. Obesity (Silver Spring). 2010; 18(2):221-9.

Page JH, Rexrode KM, Hu F, Albert CM, Chae CU, Manson JE. Waist-height ratio as a predictor of coronary heart disease among women. Epidemiology. 2009; 20(3):361-6.

Pal R, Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus during chronic central leptin infusion. Endocrinology. 2003; 144(9):3789-98.

Pamplona FA, Pandolfo P, Savoldi R, Prediger RD, Takahashi RN. Environmental enrichment improves cognitive deficits in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): relevance for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD). Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2009; 33(7):1153-60.

Pang TY, Hannan AJ. Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. Neuropharmacology. 2013; 64:515-28.

Pannacciulli N, Le DS, Chen K, Reiman EM, Krakoff J. Relationships between plasma leptin concentrations and human brain structure: a voxel-based morphometric study. Neurosci Lett. 2007; 412(3):248-53.

Pascual R, Figueroa H. Effects of preweaning sensorimotor stimulation on behavioral and neuronal development in motor and visual cortex of the rat. Biol Neonate. 1996; 69(6):399-404.

Passos MC, Vicente LL, Lisboa PC, De Moura EG. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. Horm. Metab. Res. 2004; 36(9):625-629.

Passos MC, Lisboa PC, Pereira-Toste F, Oliveira E, Moura EG. Developmental plasticity in thyroid function primed by maternal hyperleptinemia in early lactation: a time-course study in rats. Horm Metab Res. 2012; 44(7):520-6.

Passos MCF, Ramos CF, Moura EG. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. Nutr. Res. 2000; 20(11):1603-1612.



Patterson CM, Leshan RL, Jones JC, Myers MG Jr. Molecular mapping of mouse brain regions innervated by leptin receptor-expressing cells. *Brain Res.* 2011; 1378:18-28.

Paz-Filho G, Esposito K, Hurwitz B, Sharma A, Dong C, Andreev V, Delibasi T, Erol H, Ayala A, Wong ML, Licinio J. Changes in insulin sensitivity during leptin replacement therapy in leptin-deficient patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295(6):E1401-8.

Peciña S, Cagniard B, Berridge KC, Aldridge JW, Zhuang X. Hyperdopaminergic mutant mice have higher “wanting” but not “liking” for sweet rewards. *J. Neurosci.* 2003; 23(28):9395-9402.

Pelloux Y, Costentin J, Duterte-Boucher D. Novelty preference predicts place preference conditioning to morphine and its oral consumption in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006; 84(1):43-50.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1985; 14 (3):149-167.

Pereira-Toste F, Toste FP, Oliveira E, Trotta PA, Lisboa PC, Moura EG, Passos MCF. Early maternal hyperleptinaemia programmes adipogenic phenotype in rats. *Horm Metab Res.* 2009.

Perelló M, Moreno G, Gaillard RC, Spinedi E. Glucocorticoid-dependency of increased adiposity in a model of hypothalamic obesity. *Neuro Endocrinol Lett.* 2004; 25(1-2):119-26.

Perkonig A, Lieb R, Wittchen HU. Prevalence of use, abuse and dependence of illicit drugs among adolescents and young adults in a community sample. *Eur Addict Res.* 1998; 4(1-2):58-66.

Perkonig A, Lieb R, Wittchen HU. Substance use, abuse and dependence in Germany. A review of selected epidemiological data. *Eur Addict Res.* 1998; 4(1-2):8-17.

Piazza PV, Deminière JM, Le Moal M, Simon H. Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science.* 1989; 245(4925):1511-3.

Pigliucci M. Developmental phenotypic plasticity: where internal programming meets the external environment. *Curr Opin Plant Biol.* 1998; 1(1):87-91.

Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science.* 2004; 304(5667):110-5.

Power DA, Noel J, Collins R, O’Niell D. Circulating leptin levels and weight loss in Alzheimer’s disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2001; 12:167-70.

Pryce C, Mohammed A, Feldon J. Environmental manipulations in rodents and primates. Insights into pharmacology, biochemistry and behaviour. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 73(1):1-5.

Pryce CR, Rüedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, Feldon J. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005; 29(4-5):649-74.

Rajala MW, Patterson CM, Opp JS, Foltin SK, Young VB, Myers MG Jr. Leptin acts independently of food intake to modulate gut microbial composition in male mice. *Endocrinology.* 2014; 155(3):748-57.

Ravenelle R, Santolucito HB, Byrnes EM, Byrnes JJ, Donaldson ST. Housing environment modulates physiological and behavioral responses to anxiogenic stimuli in trait anxiety male rats. *Neuroscience.* 2014; 270:76-87.

Redolat R, Mesa-Gresa P. Potential benefits and limitations of enriched environments and cognitive activity on age-related behavioural decline. *Curr Top Behav Neurosci.* 2012;10:293-316.

Renner MJ, Rosenzweig MR. The golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) as a model for the effects of environmental enrichment in solitary animals. *Dev Psychobiol.* 1987; 20(1):19-24.

Rentsch J, Chiesi M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett.* 1996; 379(1):55-9.

Rex A, Fink H, Marsden CA. Effects of BOC-CCK-4 and L 365.260 on cortical 5-HT release in guinea-pigs on exposure to the elevated plus maze. *Neuropharmacology.* 1994; 33(3-4):559-65.

Ricci MR, Fried SK, Mittleman KD. Acute cold exposure decreases plasma leptin in women. *Metabolism.* 2000; 49(4):421-3.

Ricci R, Bevilacqua F. The potential role of leptin and adiponectin in obesity: a comparative review. *Vet J.* 2012; 191(3):292-8.

Ring LE, Zeltser LM. Disruption of hypothalamic leptin signaling in mice leads to early-onset obesity, but physiological adaptations in mature animals stabilize adiposity levels. *J Clin Invest.* 2010; 120(8):2931-41.

Rizvi TA, Ennis M, Behbehani MM, Shipley MT. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J. Comp. Neurol.* 1991; 303(1):121-131.

Robbins TW, Everitt BJ. Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol.* 1996; 6(2):228-36.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997; 30(3):289-304.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997; 21(6):801-810.

Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Dutra SC, Lisboa PC. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol.* 2009; 587(Pt 11):2647-61.

Rogers I, EURO-BLCS Study Group. The influence of birthweight and intrauterine environment on adiposity and fat distribution in later life. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003; 27(7):755-77.

Rom O, Reznick AZ, Keidar Z, Karkabi K, Aizenbud D. Body composition in heavy smokers: comparison of segmental bioelectrical impedance analysis and dual-energy x-ray absorptiometry. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 840:1-11.

Rush E, Simmons D. Physical activity in children: prevention of obesity and type 2 diabetes. *Med Sport Sci.* 2014; 60:113-21.

Russell JC, Epling WF, Pierce D, Amy RM, Boer DP. Induction of voluntary prolonged running by rats. *J Appl Physiol.* 1987; 63:2549-2553.

Russell VA. Reprint of "Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder". *J Neurosci Methods.* 2007;166(2):I-XIV.

Russo VC, Metaxas S, Kobayashi K, Harris M, Werther GA. Antiapoptotic effects of leptin in human neuroblastoma cells. *Endocrinology.* 2004; 145(9):4103-12.

Sacks HS, Fain JN. Human epicardial adipose tissue: a review. *Am Heart J.* 2007; 153(6):907-17.

Sahu A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology.* 2004; 145(6):2613-20.

Sahu A. Resistance to the satiety action of leptin following chronic central leptin infusion is associated with the development of leptin resistance in neuropeptide Y neurones. *J Neuroendocrinol.* 2002; 14(10):796-804.

Sale A, Berardi N, Maffei L. Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiol Rev.* 2014 Jan;94(1):189-234.

Samuelsson AM, Clark J, Rudyk O, Shattock MJ, Bae SE, South T, Pombo J, Redington K, Uppal E, Coen CW, Poston L, Taylor PD. Response to role of hyperleptinemia in the regulation of blood pressure and cardiac function. *Hypertension.* 2014; 63(1):e2.

Sandoval DA, Davis S.N. Leptin: metabolic control and regulation. *J. Diabetes Complications.* 2003; 17(2):108-113.

Schorling JB, Gutgesell M, Klas P, Smith D, Keller A. Tobacco, alcohol and other drug use among college students. *J Subst Abuse*. 1994; 6(1):105-15.

Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med*. 1996; 2(5):589-93.

Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, Elmquist JK. Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2009; 514(5):518-32.

Sena A, Sarlieve LL, Rebel G. Brain myelin of genetically obese mice. *Journal of Neurological Science*. 1995; 68:233-243.

Seoane LM, Carro E, Tovar S, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regul Pept*. 2000; 92(1-3):25-9.

Shalev U, Yap J, Shaham Y. Leptin attenuates acute food deprivation-induced relapse to heroin seeking. *J. Neurosci*. 2001; 21(4):RC129.

Shanley LJ, O'Malley D, Irving AJ, Ashford ML, Harvey J. Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J. Physiol*. 2002; 545(Pt 3):933-944.

Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95:9558-9561.

Shioda S, Funahashi H, Nakajo S, Yada T, Maruta O, Nakai Y. Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci Lett*. 1998; 243(1-3):41-4.

Signore AP, Zhang F, Weng Z, Gao Y, Chen J. Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *J Neurochem*. 2008; 106(5):1977-90.

Silva PI, Santos DCC, Gonçalves VMG. Influência de Práticas Maternas no Desenvolvimento Motor de Lactentes do 6<sup>o</sup> ao 12<sup>o</sup> meses de vida. *Rev. Bras. Fisioter*. Vol. 10, No. 2, 225-231. 2006.

Silveira PP, Manfro GG. Retrospective studies. *Adv Neurobiol*. 2015; 10:251-67.

Simmons R. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. *Trends Endocrinol Metab*. 2005; 16(8):390-4.

Sjödén PO, Lindqvist M. Behavioral effects of neonatal thyroid hormones and differential postweaning rearing in rats. *Dev Psychobiol*. 1978; 11(4):371-3.

Sjödén PO, Söderberg U. Effects of neonatal thyroid hormone stimulation and differential preweaning rearing on open-field behavior in adult rats. *Dev Psychobiol.* 1976; 9(5):413-24.

Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem.* 1996; 271(10):5301-4.

Solinas M, Thiriet N, El Rawas R, Lardeux V, Jaber M. Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology.* 2009; 34(5):1102-11.

Somasundar P, Yu AK, Vona-Davis L, McFadden DW. Differential effects of leptin on cancer in vitro. *J. Surg. Res.* 2003; 113:50-55.

Sparks LM, Bosma M, Brouwers B, van de Weijer T, Bilet L, Schaart G, Moonen-Kornips E, Eichmann TO, Lass A, Hesselink MK, Schrauwen P. Reduced incorporation of fatty acids into triacylglycerol in myotubes from obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2014; 63(5):1583-93.

Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000; 24(4):417-63.

Spencer SJ, Martin S, Mouihate A, Pittman QJ. Early-Life Immune Challenge: Defining a Critical Window for Effects on Adult Responses to Immune Challenge. *Neuropsychopharmacology.* 2006; 31:1910-1918.

Spires TL, Hannan AJ. Nature, nurture and neurology: gene-environment interactions in neurodegenerative disease. FEBS Anniversary Prize Lecture delivered on 27 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw. *FEBS J.* 2005; 272(10):2347-61.

Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ. Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002; 283(1):E187-92.

Steinberg GR, Smith AC, Van Denderen BJ, Chen Z, Murthy S, Campbell DJ, Heigenhauser GJ, Dyck DJ, Kemp BE. AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(9):4575-80.

Stenvinkel P. Obesity-a disease with many aetiologies disguised in the same oversized phenotype: has the overeating theory failed? *Nephrol Dial Transplant.* 2014.

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature.* 1995; 377(6549):530-2.

Steppan CM, Swick AG. A role for leptin in brain development, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 256:600-602.

Stieg MR, Sievers C, Farr O, Stalla GK, Mantzoros CS. Leptin: A hormone linking activation of neuroendocrine axes with neuropathology. *Psychoneuroendocrinology*. 2014; 51C:47-57.

Strasser B, Berger K, Fuchs D. Effects of a caloric restriction weight loss diet on tryptophan metabolism and inflammatory biomarkers in overweight adults. *Eur J Nutr*. 2014.

Sztainberg Y, Kuperman Y, Tsoory M, Lebow M, Chen A. The anxiolytic effect of environmental enrichment is mediated via amygdalar CRF receptor type 1. *Mol Psychiatry*. 2010; 15(9):905-17.

Takase K, Kikuchi K, Tsuneoka Y, Oda S, Kuroda M, Funato H. Meta-analysis of melanin-concentrating hormone signaling-deficient mice on behavioral and metabolic phenotypes. *PLoS One*. 2014; 9(6):e99961.

Takekoshi K, Ishii K, Kawakami Y, Isobe K, Nanmoku T, Nakai T. Ca<sup>2+</sup> mobilization, tyrosine hydroxylase activity, and signaling mechanisms in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells: effects of leptin. *Endocrinology*. 2001a; 142(1):290-8.

Takekoshi K, Ishii K, Nanmoku T, Shibuya S, Kawakami Y, Isobe K, Nakai T. Leptin stimulates catecholamine synthesis in a PKC-dependent manner in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Endocrinology*. 2001b; 142(11):4861-71.

Takekoshi K, Motooka M, Isobe K, Nomura F, Manmoku T, Ishii K, Nakai T. Leptin directly stimulates catecholamine secretion and synthesis in cultured porcine adrenal medullary chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 261(2):426-31.

Tang B.L Leptin as a neuroprotective agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2008; 368 (2):181-185.

Tang-Christensen M, Havel PJ, Jacobs RR, Larsen PJ, Cameron JL. Central administration of leptin inhibits food intake and activates the sympathetic nervous system in rhesus macaques. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84(2):711-7.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995; 83(7):1263–1271.

Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997; 272(10):6093-6.

Teixeira C, Passos M, Ramos C, Dutra S, Moura E. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem*. 2002; 13(8):493.

Teixeira CV, Ramos CD, Mouco T, Passos MC, De Moura EG. Leptin injection during lactation alters thyroid function in adult rats. *Horm Metab Res*. 2003; 35(6):367-71.

Thiel CM, Müller CP, Huston JP, Schwarting RK. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*. 1999; 93(1):243-51.

Thorsell A, Carlsson K, Ekman R, Heilig M. Behavioural and endocrine adaptation, and up-regulation of NPY expression in rat amygdala following repeated restraint stress. *Neuroreport*. 1999; 10(14):3003-3007.

Thorsell A, Svensson P, Wiklund L, Sommer W, Ekman R, Heilig M. Suppressed neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat amygdala following restraint stress. *Regul. Pept.* 1998; 75-76:247-254.

Torabi MR, Bailey WJ, Majd-Jabbari M. Cigarette smoking as a predictor of alcohol and other drug use by children and adolescents: evidence of the "gateway drug effect". *J Sch Health*. 1993; 63(7):302-6.

Toste FP, Alves SB, Dutra SC, Bonomo IT, Lisboa PC, Moura EG, Passos MC. Temporal evaluation of the thyroid function of rats programmed by leptin treatment on the neonatal period. *Horm. Metab. Res.* 2006a; 38(12):827-831.

Toste, F.P., De Moura, E.G., Lisboa, P.C., Fagundes, A.T., De Oliveira, E., Passos, M.C. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br. J. Nutr.* 2006b; 95(4): 830-837.

Trayhurn P, Thomas ME, Duncan JS, Rayner DV. Effects of fasting and refeeding on ob gene expression in white adipose tissue of lean and obese (ob/ob) mice. *FEBS Lett.* 1995; 368(3):488-90.

Trevenzoli IH, Valle MMR, Machado FB, Garcia RMG, Passos MCF, Lisboa PC, Moura EG. Neonatal hyperleptinemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J. Physiol.* 2007; 580(2):629-637.

Trevenzoli IH, Pinheiro CR, Conceição EP, Oliveira E, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. Programming of rat adrenal medulla by neonatal hyperleptinemia: adrenal morphology, catecholamine secretion, and leptin signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010a; 298(5):E941-9.

Trevenzoli IH, Rodrigues AL, Oliveira E, Thole AA, Carvalho L, Figueiredo MS, Toste FP, Neto JF, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. *Horm Metab Res.* 2010b; 42(7):483-90.

Tsoukas MA, Farr OM, Mantzoros CS. Leptin in congenital and HIV-associated lipodystrophy. *Metabolism*. 2014; S0026-0495(14)00237-6.

Udagawa J, Hashimoto R, Suzuki H, Hatta T, Sotomaru Y, Hioki K, Kagohashi Y, Nomura T, Minami Y, Otani H. The role of leptin in the development of the cerebral cortex in mouse embryos. *Endocrinology*. 2006a; 147:647-658.

Udagawa J, Nimura M, Kagohashi Y, Otani H. Leptin deficiency causes pycnotic change in fetal cingulate cortical cells. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 2006b; 46:16-20.

Hansen TB, Vahl N, Jørgensen JO, Christiansen JS, Hagen C. [Soft tissue changes in adults with acquired growth hormone deficiency during substitution treatment. A double-blind, randomized, placebo-controlled study after a year of treatment]. *Ugeskr Laeger*. 1997; 159(28):4394-9.

Ur E, Wilkinson DA, Morash BA, Wilkinson M. Leptin immunoreactivity is localized to neurons in rat brain. *Neuroendocrinology*. 2002; 75(4):264-72.

Urakawa S, Takamoto K, Hori E, Sakai N, Ono T, Nishijo H. Rearing in enriched environment increases parvalbumin-positive small neurons in the amygdala and decreases anxiety-like behavior of male rats. *BMC Neurosci*. 2013; 14:13.

Utsunomiya K, Yanagihara N, Tachikawa E, Cheah TB, Kajiwara K, Toyohira Y, Ueno S, Izumi F. Stimulation of catecholamine synthesis in cultured bovine adrenal medullary cells by leptin. *J Neurochem*. 2001; 76(3):926-34.

Vaglenova J, Birru S, Pandiella NM, Breese CR. An assessment of the long-term developmental and behavioral teratogenicity of prenatal nicotine exposure. *Behav Brain Res*. 2004; 150(1-2):159-70.

Valerio A, Ghisi V, Dossena M, Tonello C, Giordano A, Frontini A, Ferrario M, Pizzi M, Spano P, Carruba MO, Nisoli E. Leptin increases axonal growth cone size in developing mouse cortical neurons by convergent signals inactivating glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem*. 2006; 281(18):12950-8.

Valleau JC, Sullivan EL. The impact of leptin on perinatal development and psychopathology. *J Chem Neuroanat*. 2014; S0891-0618(14)00037-4.

van Balkom AJ, van Boeijen CA, Boeke AJ, van Oppen P, Kempe PT, van Dyck R. Comorbid depression, but not comorbid anxiety disorders, predicts poor outcome in anxiety disorders. *Depress Anxiety*. 2008; 25(5):408-15.

Van der Merwe MT. Psychological correlates of obesity in women. *Int J Obes (Lond)*. 2007; (31 Suppl 2):S14-8.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000; 1(3):191-8.

Vazdarjanova A, Cahill L, McGaugh JL. Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *Eur. J. Neurosci*. 2001; 14(4):709-718.

Velloso LA, Araújo EP, de Souza CT. Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation*. 2008; 15(3):189-93.

Vicente LL, de Moura EG, Lisboa PC, Monte Alto Costa A, Amadeu T, Mandarim-de-Lacerda CA, Passos MC. Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. *Nutrition*. 2004; 20(10):924-8.



Wada N, Hirako S, Takenoya F, Kageyama H, Okabe M, Shioda S. Leptin and its receptors. *J Chem Neuroanat.* 2014.

Wang DC, Chen TJ, Lin ML, Jhong YC, Chen SC. Exercise prevents the increased anxiety-like behavior in lactational di-(2-ethylhexyl) phthalate-exposed female rats in late adolescence by improving the regulation of hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav.* 2014 Sep 22; 66(4):674-684.

Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett.* 1996; 392(2):87-90.

Web of Science. According to the search performed in October, 2014, using the entering expression "elevated plus-maze", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.

Weng Z, Signore AP, Gao Y, Wang S, Zhang F, Hastings T, Yin XM, Chen J. Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 2007; 282:34479-34491.

Whitmer RA, Gunderson EP, Quesenberry CP Jr, Zhou J, Yaffe K. Body mass index in midlife and risk of Alzheimer disease and vascular dementia. *Curr Alzheimer Res.* 2007; 4(2):103-9.

Wills TA, Vaccaro D, McNamara G. Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse.* 1994; 6(1):1-20.

Wise RA. Cocaine reward and cocaine craving: the role of dopamine in perspective. *NIDA Res Monogr.* 1994; 145:191-206.

Wittchen HU, Essau CA, Krieg JC. Anxiety disorders: similarities and differences of comorbidity in treated and untreated groups. *Br J Psychiatry Suppl.* 1991; (12):23-33.

Wolf PA, Beiser A, Elias MF, Au R, Vasan RS, Seshadri S. Relation of obesity to cognitive function: importance of central obesity and synergistic influence of concomitant hypertension. The Framingham Heart Study. *Curr Alzheimer Res.* 2007; 4(2):111-6.

Wong YN, Cassano WJ Jr, D'mello AP. Acute-stress-induced facilitation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroendocrinology.* 2000; 71(6):354-65.

Woo CC, Leon M. Environmental enrichment as an effective treatment for autism: a randomized controlled trial. *Behav Neurosci.* 2013; 127(4):487-97.

Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res.* 1996; 40(3):438-43.

World Health Organization. (2013). Childhood overweight and obesity. Resource Document. Geneva: World Health

Organization.<http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/>. Acesso em Julho 2014.

Wyvell CL, Berridge KC. Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward “wanting” without enhanced “liking” or response reinforcement, *J. Neurosci.* 2000; 20(21):8122-8130.

Xia L, Wang C, Lu Y, Fan C, Ding X, Fu H, Qi K. Time-Specific Changes in DNA Methyltransferases Associated With the Leptin Promoter During the Development of Obesity. *Nutr Hosp.* 2014; 30(n06):1248-1255.

Yaffe K. Metabolic syndrome and cognitive decline. *Curr Alzheimer Res.* 2007; 4(2):123-6.

Yanagihara N, Utsunomiya K, Cheah TB, Hirano H, Kajiwara K, Hara K, Nakamura E, Toyohira Y, Uezono Y, Ueno S, Izumi F. Characterization and functional role of leptin receptor in bovine adrenal medullary cells. *Biochem Pharmacol.* 2000; 59(9):1141-5.

Yannielli PC, Kanterewicz BI, Cardinali DP. Daily rhythms in spontaneous and diazepam-induced anxiolysis in Syrian hamsters. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 54(4):651-6.

Yoshida-Komiya H, Takano K, Fujimori K, Niwa S. Plasma levels of leptin in reproductive-aged women with mild depressive and anxious states. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2014; 68(7):574-81.

Younes-Rapozo V, de Moura EG, Manhães AC, Peixoto-Silva N, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning by maternal prolactin inhibition leads to higher NPY and astrogliosis in the hypothalamus of the adult rat offspring. No prelo.

Younes-Rapozo V, de Moura EG, da Silva Lima N, Barradas PC, Manhães AC, de Oliveira E, Lisboa PC. Early weaning is associated with higher neuropeptide Y (NPY) and lower cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressions in the paraventricular nucleus (PVN) in adulthood. *Br J Nutr.* 2012; 108(12):2286-95.

Younes-Rapozo V, Moura EG, Manhães AC, Pinheiro CR, Santos-Silva AP, de Oliveira E, Lisboa PC. Maternal nicotine exposure during lactation alters hypothalamic neuropeptides expression in the adult rat progeny. *Food Chem Toxicol.* 2013; 58:158-68.

Zhang F, Chen J. Leptin protects hippocampal CA1 neurons against ischemic injury. *J. Neurochem.* 2008; 107:578-587.

Zhang F, Wang S, Signore AP, Chen J. Neuroprotective effects of leptin against ischemic injury induced by oxygen-glucose deprivation and transient cerebral ischemia, *Stroke.* 2007; 38(8):2329-2336.

Zhang Y, Matheny M, Tümer N, Scarpace PJ. Aged-obese rats exhibit robust responses to a melanocortin agonist and antagonist despite leptin resistance. *Neurobiol Aging*. 2004; 25(10):1349-60.

Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*. 1997; 8;387(6629):206-9.

Zheng H, Berthoud HR. Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism. *Physiology (Bethesda)*. 2008; 23:75-83.