



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

Carolina Salama Rodrigues

**Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a  
resposta de timócitos da prole jovem de ratos Wistar**

Rio de Janeiro

2011

Carolina Salama Rodrigues

**Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a resposta de timócitos da prole jovem de ratos Wistar**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Simone Vargas da Silva

Rio de Janeiro

2011

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

R696 Rodrigues, Carolina Salama.  
Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a  
resposta de timócitos da prole jovem de ratos Wistar / Carolina  
Salama Rodrigues - 2011.  
162 f. : il.

Orientadora: Thereza Christina Barja Fidalgo  
Coorientadora: Simone Vargas da Silva.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de  
Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-  
graduação em Biociências.

1. Desnutrição - Teses. 2. Lactação - Teses. 3. Metabolismo  
- Regulação - Teses. 4. Leptina - Teses. I. Fidalgo, Thereza  
Christina Barja. II. Silva, Simone Vargas da.. III. Universidade do  
Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara  
Gomes. IV. Título.

CDU 613.24

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

---

Assinatura

---

Data

Carolina Salama Rodrigues

**Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a resposta de timócitos da prole jovem de ratos Wistar**

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

Aprovada em 16 de março de 2011.

Orientadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina Barja Fidalgo  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Simone Vargas da Silva  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Farias Benjamim  
Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

---

Prof. Dr. Wilson Savino  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2011

## DEDICATÓRIA

À minha família, pela força, incentivo e apoio oferecidos em todas as etapas da minha vida. Principalmente, por tanto amor.

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Thereza Christina pelo exemplo profissional, pela confiança, oportunidade e estrutura para a realização deste trabalho;

À Prof. Dra. Simone Vargas da Silva pela orientação, paciência de sempre, dedicação (afinal, ficar no laboratório até às 3 da manhã comigo é a prova disso, não é mesmo?) e até pelos puxões de orelha. Certamente tudo isso contribuiu para o meu amadurecimento profissional.

À Prof. Dra. Iolanda Margherita Fierro pela torcida de sempre e, principalmente, pela criteriosa revisão desta dissertação. Muito obrigada mesmo, Iô!

À Amiga Mari, minha companheira de bancada, sempre tão alegre. Você me ajudou muito e fez muita falta na “reta final”, mas sei que torceu muito por mim quando não pôde estar presente. Obrigada por tudo!

Ao Edward e a Marta pela grande contribuição ao trabalho. Muito obrigada!

A Aline pela amizade e pensamentos positivos;

A Amanda, minha “hermana” querida, que durante meus momentos de aflição sempre esteve ao meu lado, me ouvindo, apoiando e oferecendo ajuda. Você, sem dúvida, foi um grande presente que ganhei neste laboratório. A irmã que a vida escolheu pra mim;

A Renata e ao Genilson (Genso) pela amizade e apoio técnico indispensável para a realização deste trabalho;

A Jéssica pela grande ajuda nessa etapa final. Obrigada!

Ao Nelcir e ao Joarez, pelos cuidados com o nosso biotério e pela alegria contagiante. A ajuda de vocês foi fundamental!

Aos amigos do laboratório: Cris, Érica, Vany, Augusta, Roberta, Heitor, Rafael Simões, Rafael Amêndola, Andreza, Gabi, Isabela, Pedro, Yan, João, Yann, Renatinha, Luciana, Mariele, Diego, André, Fernanda e Natália. Afinal, é difícil ter alguém nessa lista que nunca tenha me ajudado e incentivado. Além disso, vale ressaltar que me proporcionaram um ambiente de trabalho único e uma excelente convivência diária durante esses quase cinco anos. A vocês todos: muito obrigada!

Aos meus amigos pelo apoio, incentivo e amizade. Em especial, aqueles mais próximos, que puderam acompanhar toda essa trajetória: Gigica, Gordo, Jujuba, Thaís, Lyvia, Aninha, Paula, Nando, Frango, Tati, Vanesetti e minhas amigas dos

tempos de colégio Cruzeiro, em especial, Lalá e Alininha. Obrigada por tudo, de verdade!

Aos novos amigos Paty, Renato, Zezão e Livinha pela torcida e pelos momentos de descontração, muito prazerosos e necessários principalmente nesta fase da minha vida.

À minha família que eu tanto amo, meu bem mais precioso, meu orgulho, minha base.

Aos meus avós, tios, tias, primas e primos, que sempre acreditaram e torceram por mim.

A Lourdinha, que pra mim representa uma tia muito querida e especial, sempre pronta a ouvir e ajudar e minha “prima” Diana. Amo vocês!

Principalmente, ao meu irmão querido, meu grande orgulho e à minha mãe, a melhor que eu poderia ter. Faltam-me palavras para agradecer todo amor, apoio, segurança, confiança, respeito, carinho e união... Amo vocês! Com vocês por perto, todos os obstáculos são mais fáceis de serem superados.

Ao meu namorado, Rodrigo, aquele que me ouve com atenção, me apóia e me proporciona momentos de pura felicidade. Meu companheiro, meu amigo, meu amor. Te amo muito!

O sucesso parece ser, em grande parte, uma questão de persistir quando os outros desistiram.

*William Feather*



## RESUMO

RODRIGUES, Carolina Salama. *Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a resposta de timócitos da prole jovem de ratos Wistar*. 2011.162 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Neste estudo investigamos as consequências da restrição protéica materna durante a lactação sobre a resposta de timócitos da prole jovem de ratos Wistar (grupo D), identificando o papel da leptina nas alterações encontradas. Observamos que, quando comparados ao grupo controle, os animais do grupo D apresentaram, aos 30 dias de vida, uma diminuição significativa tanto do peso corporal quanto do timo. Contudo, não observamos alterações no número de timócitos, no perfil de células CD4/CD8 ou na resposta proliferativa destas células. Sistemicamente, o grupo D não apresentou alterações nos níveis séricos de corticosterona ou no conteúdo nuclear do seu receptor (GR) em timócitos. Apesar dos animais D não apresentarem alterações nos níveis circulantes de leptina, a expressão do seu receptor, ObRb, estava aumentada nos timócitos. Esta alteração foi acompanhada pela amplificação da resposta de sinalização da leptina nestas células, observada por um aumento na ativação de JAK2 e STAT3 após a incubação com leptina. Os timócitos isolados do grupo D apresentaram uma diminuição significativa na taxa de apoptose espontânea quando comparados ao grupo controle. Corroborando estes resultados, demonstramos que os timócitos dos animais D apresentam um aumento na expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 e uma redução da expressão da proteína próapoptótica Bax, além de um maior conteúdo de Pró-caspase-3, entretanto, não encontramos alterações no conteúdo de Bad. Além disso, timócitos do grupo D apresentaram um maior conteúdo da subunidade p65 do NFκB no núcleo, associado a uma menor expressão de IκBα no citoplasma. Finalmente, observamos um aumento na expressão do RNAm para o gene *ob* (leptina) mas não para o gene *db* (receptor) no microambiente tímico dos animais D. Em conjunto, nossos dados mostram que a restrição protéica durante a lactação afeta a homeostase tímica, induzindo uma maior atividade de leptina, que protege os timócitos da apoptose na prole jovem, sugerindo que esses animais poderiam ser mais suscetíveis a alterações na resposta imune na vida adulta.

Palavras-chave: Desnutrição. Programação metabólica. Leptina. Timócitos. Apoptose.

## ABSTRACT

In this study, we investigated the consequences of maternal protein deprivation during lactation on thymocyte responses of the offspring Wistar rats (PD group) and the role of leptin in these alterations. Compared to group C, PD animals showed at 30 days of age, lower body and thymus weights, with no alteration in the thymocyte number or any difference in the profile of T cell subsets, or in their proliferative response. Similar circulating levels of corticosterone and GR nuclear contents were detected in thymic cells of PD or control groups. In contrast, despite the rats from PD group did not present alterations in leptin circulating levels, the expression of leptin receptor ObRb was enhanced in their thymocytes. This change was accompanied by an amplification in leptin signaling response of thymocytes from PD rats, which showed an increase in JAK2 and STAT3 phosphorylation after stimulation with leptin. Moreover, the thymic cells from PD rats presented a decreased rate of spontaneous apoptosis when compared to controls. Accordingly, higher expression of both the anti-apoptotic protein Bcl-2 and Procaspase-3 and lower expression of pro-apoptotic protein Bax were detected in PD thymocytes, however, the pro-apoptotic protein bad expression was similar between the groups. Thymocytes from PD group also exhibited a constitutive higher nuclear content of p65 NFkB associated to a lower IκB content in the cytoplasm. Finally, although there was no change in *db* genic (leptin receptor) expression in PD thymocytes, a higher expression of mRNA for *ob* gene (leptin) was observed in the thymic microenvironment from PD animals. Taken together, the results show that maternal protein deprivation during lactation affects thymic homeostasis, inducing leptin activity, which protect thymocytes from apoptosis in young progeny and, perhaps, may prone these animals for alterations in immune response in adult life.

Keywords: Undernutrition. Metabolic programming. Leptin. Thymocytes. Apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	As três fases da programação metabólica.....	20
Figura 2 –	Processos de seleção no timo.....	29
Figura 3 –	Esquema das vias intrínseca e extrínseca de indução de apoptose.....	32
Figura 4 –	Circuito hormonal envolvido no desencadeamento da depleção de timócitos que ocorre em indivíduos desnutridos..	36
Figura 5 –	Vias de sinalização ativadas pela isoforma longa do receptor de leptina (ObRb).....	40
Figura 6 –	Efeitos da leptina sobre a resposta imune.....	42
Figura 7 –	Mecanismo de ação dos glicocorticóides.....	46
Figura 8 –	Esquema de acasalamento e separação dos grupos de animais controle e desnutridos.....	52
Figura 9 –	Níveis séricos de leptina dos animais dos grupos C e D nos 21º e 30º dias.....	65
Figura 10 –	Expressão do receptor de leptina (ObR) em timócitos isolados dos animais dos grupos C e D.....	67
Figura 11 –	Fosforilação de JAK2 em timócitos isolados dos animais dos grupos C e D.....	68
Figura 12 –	Fosforilação de STAT3 em timócitos isolados dos animais dos grupos C e D.....	69
Figura 13 –	Expressão dos genes <i>ob</i> e <i>db</i> no microambiente tímico.....	70
Figura 14 –	Perfil dos subtipos de timócitos isolados de animais C e D.....	72
Figura 15 –	Apoptose de timócitos isolados de animais C e D.....	74
Figura 16 –	Viabilidade dos timócitos isolados de animais C e D.....	76
Figura 17 –	Proliferação de timócitos isolados de animais C e D.....	78
Figura 18 –	Fosforilação de IRS1 e AKT em timócitos isolados de animais C e D.....	80
Figura 19 –	Expressão de Bcl-2 em timócitos isolados de animais C e D...	82
Figura 20 –	Expressão de Bax em timócitos isolados de animais C e D.....	83
Figura 21 –	Expressão de Bad em timócitos isolados de animais C e D.....	84

Figura 22 –	Expressão de Pró-caspase-3 em timócitos isolados de animais C e D.....	85
Figura 23 –	Expressão de NFκB e IκB em timócitos isolados de animais C e D.....	87
Figura 24 –	Níveis séricos de corticosterona dos animais dos grupos C e D.....	88
Figura 25 –	Expressão de GR no núcleo de timócitos isolados de animais dos grupos C e D.....	90
Figura 26 –	Efeito da restrição protéica materna (8 % de proteína) sobre o timo da prole jovem.....	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição básica da ração industrializada específica para ratos Labina-Purina <sup>®</sup> , utilizada para as ratas lactantes sem restrição protéica e filhotes em crescimento.....	53
Tabela 2 – Composição de micronutrientes da ração industrializada específica para ratos Labina-Purina <sup>®</sup> , utilizada para as ratas lactantes sem restrição protéica e filhotes a partir dos 21 dias de vida.....	53
Tabela 3 – Composição básica da ração artesanal utilizada para as ratas lactantes com restrição protéica (8 % de proteína).....	54
Tabela 4 – Composição de micronutrientes da ração artesanal utilizada para as ratas lactantes com restrição protéica (8 % de proteína).....	54
Tabela 5 – Peso corporal e do timo e número total de timócitos dos grupos controle (C) e desnutrido (D).....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT/PKB	–	Proteína quinase B
Apaf-1	–	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	–	Célula apresentadora de antígeno
BSA	–	Albumina de soro bovino
CD	–	Grupo de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> )
ConA	–	Concanavalina A
DN	–	Timócitos duplo-negativos
DP	–	Timócitos duplo-positivos
DR	–	Receptor de morte
ELISA	–	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FADD	–	<i>Domínio de Morte Associada a Fas</i>
FAO	–	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação ( <i>Food and Agricultural Organization</i> )
GC	–	Glicocorticóides
GR	–	Receptor de glicocorticóides
GREs	–	Elementos responsivos aos glicocorticóides
HSP90	–	Proteína de choque térmico ( <i>Heat Shock Protein 90</i> )
IFN- $\gamma$	–	Interferon gama
I $\kappa$ B	–	Inibidor do fator nuclear kapa B
IL	–	Interleucina
IRS1	–	Substrato 1 do receptor de insulina
JAK	–	Janus quinase
LPS	–	Lipopolissacarídeo
MAPK	–	Proteína quinase ativada por mitógeno
MHC	–	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NF- $\kappa$ B	–	Fator nuclear kappa B
NK	–	Células Natural Killer
NP-40	–	Nonidet P-40
ObR	–	Receptor de leptina
PI3K	–	Fosfatidil-inositol 3 quinase
PMSF	–	Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PVDF –	Polivinilideno difluorido
RT- PCR –	Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SP –	Timócitos simples-positivos
STAT3 –	<i>Transdutor de sinal e ativador</i> de transcrição -3
TCR –	Receptor de células T
T Reg –	Célula T regulatória
Th1 –	Linfócito T Helper 1
TNF- $\alpha$ –	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1 –	Receptor de tipo 1 do <i>fator de necrose</i> tumoral
TRADD –	Domínio de morte associado a TNFR1

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
1.1	<b>Programação metabólica induzida por fatores nutricionais</b> .....	18
1.1.1	<u>Aspectos gerais</u> .....	18
1.1.2	<u>Impacto da programação metabólica induzida por fatores nutricionais sobre a resposta imune</u> .....	22
1.2	<b>Timo</b> .....	25
1.2.1	<u>Localização, estrutura e função</u> .....	25
1.2.2	<u>O Processo de maturação de timócitos</u> .....	26
1.2.3	<u>Apoptose de timócitos</u> .....	30
1.2.4	<u>Timo como um alvo da desnutrição: importância da leptina e glicocorticóides</u> .....	33
1.3	<b>Leptina</b> .....	36
1.3.1	<u>Leptina como um mecanismo integrador do metabolismo e sistema imune</u> .....	36
1.3.2	<u>O receptor de leptina – ObR</u> .....	38
1.3.3	<u>As vias de sinalização da leptina</u> .....	39
1.3.4	<u>O papel da leptina no sistema Imune</u> .....	41
1.4	<b>Glicocorticóides</b> .....	44
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	47
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	49
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	49
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
4.1	<b>Modelo experimental de desnutrição</b> .....	51
4.2	<b>Dietas</b> .....	52
4.3	<b>Coleta de sangue e obtenção de plasma</b> .....	54
4.4	<b>Dosagem de corticosterona</b> .....	55
4.5	<b>Dosagem de leptina</b> .....	55
4.6	<b>Pesagem dos timos</b> .....	56



4.7	Isolamento de timócitos.....	56
4.8	Obtenção do microambiente tímico.....	57
4.9	Análise de marcadores de superfície.....	57
4.10	Análise das células em apoptose.....	58
4.11	Ensaio de viabilidade.....	58
4.12	Ensaio de proliferação <i>in vitro</i> .....	59
4.13	Ensaio de RT-PCR.....	59
4.14	Preparação de extrato celular total.....	60
4.15	Preparação de extrato nuclear.....	60
4.16	Western Blotting.....	61
4.17	Análise estatística.....	62
5	<b>RESULTADOS</b> .....	63
5.1	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre os pesos corporal e tímico e o número total de timócitos isolados da prole jovem.....	63
5.2	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre os níveis séricos de leptina da prole jovem (21 e 30 dias) .....	64
5.3	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a expressão de proteínas da via clássica de sinalização da leptina em timócitos isolados da prole jovem.....	66
5.4	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a expressão dos genes <i>ob</i> e <i>db</i> no microambiente tímico.....	70
5.5	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a maturação de timócitos isolados da prole jovem.....	71
5.6	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a apoptose espontânea de timócitos isolados da prole jovem.....	73
5.7	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a viabilidade de timócitos isolados da prole jovem.....	75
5.8	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a proliferação de timócitos isolados da prole jovem.....	77
5.9	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a via da IRS1-PI3K em timócitos isolados da prole jovem.....	79
5.10	Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a	

	<b>expressão de proteínas pró e antiapoptóticas em timócitos isolados da prole jovem.....</b>	<b>81</b>
5.11	<b>Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a ativação de NFκB em timócitos isolados da prole jovem.....</b>	<b>86</b>
5.12	<b>Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre os níveis séricos de corticosterona da prole jovem.....</b>	<b>88</b>
5.13	<b>Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a translocação nuclear do receptor de glicocorticóides em timócitos isolados da prole jovem.....</b>	<b>89</b>
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>101</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>
	<b>APÊNDICE – Maternal protein deprivation during lactation increases leptin activity and inhibits apoptosis of thymic cells from young offspring</b>	<b>124</b>
	<b>ANEXO – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>162</b>

## INTRODUÇÃO

A desnutrição é conceituada como um quadro de carência nutricional que traz como consequência uma acentuada redução de peso (WHO, 1999) e representa uma das principais consequências da pobreza mundial (Peña & Bacallao, 2002). Em crianças, seus danos são graves, podendo levar a atrasos no crescimento e no desenvolvimento (Rice *et al.*, 2000; Black, 2003).

Apesar do aumento da incidência de obesidade em todas as idades e grupos socioeconômicos (Nishida *et al.*, 2004), as taxas de desnutrição continuam elevadas, sobretudo no Brasil, onde as desigualdades regionais são expressivas (Mondini & Monteiro, 1997; Sawaya *et al.*, 2003; Batista Filho & Rissin, 2003). Deste modo, mesmo diante dos dados animadores da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde (PNDS) (BRASIL, 2008) que mostraram uma tendência à redução da desnutrição no país, um estudo posterior realizado por Coutinho e colaboradores (2008) confirmou o alto número de desnutridos principalmente em regiões mais pobres como o norte e o nordeste.

Em decorrência da desnutrição, registram-se, anualmente, altas taxas de mortalidade e, por isso, ela é reconhecidamente um problema de saúde pública (Chen *et al.*, 1980; Shills *et al.*, 1998; Black *et al.*, 2003). Estudos epidemiológicos relacionam a alta taxa de mortalidade ao aumento da suscetibilidade aos agentes infecciosos e à gravidade destas infecções (Rice *et al.*, 2000; Calder & Jackson, 2000; Black, 2003). Atualmente, percebe-se a importância crucial do estado nutricional na regulação da resposta imune e no risco de desenvolvimento de doenças agudas e crônicas (Chandra, 2002).

Dados publicados pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) indicam a existência de cerca de 963 milhões de pessoas desnutridas no mundo. Deste total, estima-se que 80 % vivam particularmente no sul da Ásia, na África subsaariana e em países em desenvolvimento, afetando, principalmente, crianças e gestantes (Müller & Krawinkel, 2005; FAO, 2008).

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 Programação metabólica induzida por fatores nutricionais

#### 1.1.1 Aspectos gerais

A identificação dos fatores que estão direta ou indiretamente associados ao desenvolvimento de doenças crônicas tem sido alvo de estudos no Brasil e no mundo (Sawaya *et al.*, 2003; Batty *et al.*, 2007; Langley-Evans & McMullen, 2010).

Diversos estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado que o desenvolvimento de tais doenças envolve, além de componentes genéticos, ambientais e comportamentais, um componente nutricional que pode exercer sua influência desde o início da vida (Le Clair *et al.*, 2009; Tamashiro & Moran, 2010). Dentre esses estudos, destacam-se os que utilizam modelos de privação nutricional durante a vida fetal ou no início da vida pós-natal. Nestes modelos, já foi observado que a restrição de nutrientes durante fases críticas do desenvolvimento promove uma redução do peso corporal e também altera mecanismos homeostáticos, como a regulação da pressão sanguínea ou a sensibilidade à insulina, os quais poderiam resultar em um aumento na susceptibilidade à obesidade, diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica (intolerância à glicose, hipertensão e hipertrigliceridemia) (Barker, 1997; Godfrey & Barker, 2001; Ozanne & Hales, 2002; Langley-Evans & McMullen, 2010).

Baseados em observações clínicas, Hales e Barker (1992) lançaram a hipótese denominada “thrifty phenotype” (fenótipo econômico) postulando que, durante os períodos de privação nutricional (má nutrição materna ou disfunção placentária), o feto adotaria estratégias para maximizar a sobrevivência. Inicialmente, ocorreria uma redistribuição do fluxo sanguíneo, selecionando os nutrientes para órgãos mais críticos, como o cérebro, em detrimento de outros, como o pâncreas, o fígado e os músculos, além de reduzir seu gasto energético e aumentar o armazenamento de lipídeos em resposta à oferta diminuída de nutrientes no início da vida.

Esta programação fetal teria a finalidade de maximizar as chances de sobrevivência, inibindo o crescimento e o desenvolvimento fetal, alterando

permanentemente a estrutura, a fisiologia e o metabolismo pós-natal o qual, igualmente, teria a função de aumentar as chances de sobrevivência sob condições de nutrição precária e intermitente. Porém, segundo Petry e colaboradores (2001), esta programação torna-se deletéria quando, posteriormente, a nutrição é excessiva ou mesmo adequada, predispondo a enfermidades metabólicas, endócrinas e cardiovasculares na vida adulta (Pennington *et al.*, 2001; Godfrey & Barker, 2001; Wu *et al.*, 2004; Le Clair *et al.*, 2009). As alterações permanentes no metabolismo da glicose, insulina e outros hormônios poderiam contribuir favorável ou desfavoravelmente para a adaptação a condições pós-natais adversas (Ozanne & Hales, 2002).

Estes estudos fornecem evidências da relação entre a redução no crescimento fetal (e, possivelmente, pós-natal) e o aumento do desenvolvimento de doenças tardias.

Embora a hipótese do "thrifty phenotype" esteja centrada no ambiente nutricional intra-uterino, hoje é aceito que fatores não-genéticos (como a restrição nutricional) aplicados em períodos críticos ou sensíveis do desenvolvimento podem resultar em um efeito de longa duração ou em alterações permanentes dos sistemas fisiológicos, desencadeando padrões diferenciados de respostas metabólicas (Waterland & Garza, 1999). Este conceito é conhecido como programação (ou impressão) metabólica (Lucas, 1998; Waterland & Garza, 1999; Tamashiro & Moran, 2010) e descreve os fenômenos biológicos básicos que estabelecem relações entre as respostas adaptativas a condições adversas específicas ocorridas no início da vida e o desenvolvimento de doenças na vida adulta. Essa programação metabólica consiste em fases, conforme descrito na figura 1.

O período e o tempo de exposição a estímulos parecem ser particularmente importantes, visto que em mamíferos, a maior parte do desenvolvimento relativo ao processo de divisão celular ocorre na vida intrauterina, sendo que em alguns órgãos este desenvolvimento continua após o nascimento (Nyirenda *et al.*, 2001). Desta forma, a gestação e a lactação são períodos críticos para a maturação de órgãos e tecidos, quando ocorre intenso crescimento, replicação e diferenciação celular (Waterland & Garza, 1999). Durante esses períodos, também denominados "janelas ontogênicas críticas", processos organizacionais acontecem rapidamente e são modificados ou interrompidos mais facilmente (Morgane *et al.*, 2002).

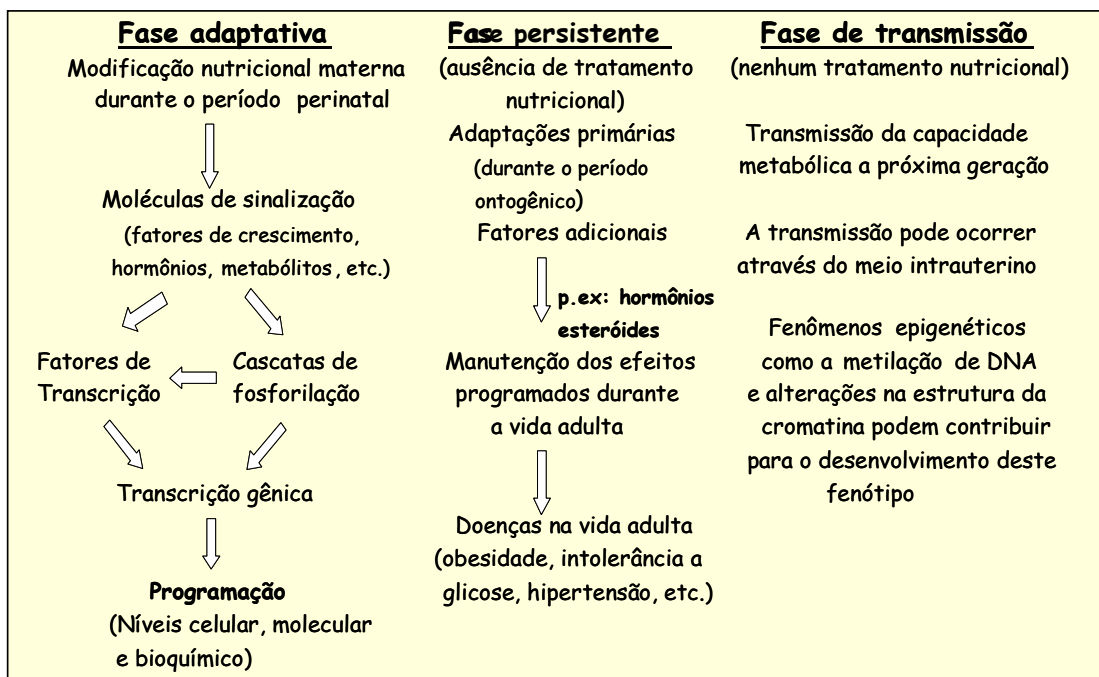


Figura 1 - As três fases da programação metabólica. Mecanismos possíveis para as adaptações a intervenções nutricionais durante o período de lactação (fase adaptativa), a permanência destas adaptações durante a vida adulta (fase persistente) e a sua transmissão à progênie (fase de transmissão) (adaptada de Patel & Srinivasan, 2002).

O estado nutricional perinatal afeta profunda e permanentemente o desenvolvimento endócrino, neurológico e a função cognitiva da prole (Waterland & Garza, 1999; Barja-Fidalgo *et al.*, 2003; Fagundes *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008), visto que o crescimento e a organização dos sistemas nervoso e endócrino ocorrem do período pré-natal até os primeiros anos de vida (Symonds *et al.*, 2001; Borwick *et al.*, 2003; Plagemann, 2005). Assim, Estudos conduzidos em animais demonstraram que a desnutrição neste período, além de alterar a secreção e a ação de diferentes hormônios, pode levar a efeitos permanentes no cérebro, tais como redução do tamanho, número de células e dificuldades nos processos de aprendizagem e memória (Smart, 1986).

Durante esse período, o hipotálamo, o qual desempenha um importante papel no balanço energético, é vulnerável às influências ambientais, o que pode contribuir para o desencadeamento de doenças na vida adulta (Davidowa & Plagemann, 2001; Bouret *et al.*, 2004)

Dados apontam que um déficit nutricional, especialmente de proteínas durante a gestação, provoca mudanças no desenvolvimento do pâncreas, alterando o número de células betapancreáticas, atribuído ao aumento da apoptose e decréscimo da proliferação, com consequente impacto na resposta insulínica (Barker, 1998; Petrik *et al.*, 1999; Whincup *et al.*, 2008).

Baseado nesses dados, estudos utilizando um modelo de restrição protéica onde ratas recebem dieta com baixos níveis de proteína (8 %) durante a gestação e/ou durante a lactação (21 dias pós-parto) demonstraram que a prole adulta apresenta alterações na tolerância à glicose e na resistência à insulina, que podem culminar no estabelecimento de diabetes em animais mais velhos (Sugden & Holness, 1995; Ozanne & Hales, 1999).

Nosso grupo demonstrou que a restrição protéica grave (0 % de proteína) durante o início da lactação programa uma diminuição significativa na secreção de insulina da prole adulta, que parece desenvolver mecanismos adaptativos para otimizar a captação de glicose, uma vez que estes animais não apresentam alterações nos níveis glicêmicos, sugerindo o desenvolvimento de uma maior sensibilidade à insulina (Moura *et al.*, 1997).

Apesar dos crescentes estudos, os mecanismos envolvidos na programação metabólica não foram totalmente esclarecidos e cresce o número de questões a serem elucidadas para o melhor entendimento deste fenômeno. Uma questão que se estabelece é onde a “memória” destes eventos iniciais é estocada em um período intermediário e o que induz o desenvolvimento de doenças na maturidade, apesar da contínua replicação e substituição celular.

Os mecanismos propostos incluem os efeitos adaptativos sobre a expressão gênica transmitidos às células, ou uma seleção clonal adaptativa, levando à eliminação ou aumento de células individuais específicas, de modo que a quantidade ou proporção de populações celulares em um determinado tecido possa ser permanentemente alterada (Lucas, 1991; 1998).

Modificações epigenéticas são desencadeadas por mudanças no meio e podem ocorrer tanto em linhagens celulares somáticas quanto germinativas (Monk, 1995; Thorvaldsen & Bartolomei, 2000). Recentes estudos em humanos e animais têm demonstrado os efeitos da dieta materna sobre o epigenoma dos seus descendentes (Warner & Ozanne, 2010).

Desta forma, alterações nutricionais no início da vida podem modificar os padrões celulares específicos de dimetilação e acetilação de histonas (Warner & Ozanne, 2010) e de metilação do DNA, afetando a expressão gênica em tecidos específicos (Muller & Kersten, 2003; Burdge *et al.*, 2007; Zeisel, 2009; Ho & Zempleni, 2009). Tais mudanças na estrutura dos tecidos levariam a alterações na atividade metabólica, nos processos de controle da homeostase e afetariam significativamente a função orgânica levando à predisposição a doenças crônicas (Godfrey & Barker, 2001; Zeisel, 2009).

### 1.1.2 Impacto da programação metabólica induzida por fatores nutricionais sobre a resposta imune

Evidências suportam a hipótese que deficiências nutricionais durante períodos críticos do desenvolvimento programam o sistema imune em humanos e animais (Hanson *et al.*, 1996, Calder & Jackson, 2000; Chandra, 2002; Cunningham-Rundles *et al.*, 2005; Langley-Evans & Carrington, 2006) podendo ocasionar alterações na resposta específica aos patógenos (Marcos *et al.*, 2003) e aumento na frequência e na severidade a infecções (Calder & Jackson, 2000; Katona & Katona-Apte, 2008).

A resposta aos agentes patológicos pelo sistema imunológico envolve mecanismos associados com a resposta imune inata e específica (ou adaptativa). A defesa inata está presente desde o nascimento, permanece constante ao longo da vida e envolve uma resposta rápida contra patógenos invasores, porém, de forma inespecífica e sem produzir células de memória. A imunidade inata compreende barreiras estruturais (pele e membranas mucosas) e fisiológicas (pH e níveis de oxigênio), além de proteínas solúveis (Sistema Complemento) e diversos tipos celulares, incluindo granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos), mastócitos, macrófagos, células dendríticas e células natural killers (NK) (Abbas *et al.*, 2003; Biron, 2010).

Por outro lado, a resposta imune adaptativa é lenta e duradoura (Scroferneker & Pohlmann, 1998; Abbas *et al.*, 2003) e manifesta-se com uma alta especificidade, capacidade de reconhecimento de um expressivo número de antígenos e memória.



Devido a essas propriedades é muito eficaz e resulta na imunidade contra a re-infecção ao mesmo agente infectante (Scroferneker & Pohlmann, 1998; Biron, 2010).

A imunidade celular é mediada por linfócitos T e promove a defesa contra microorganismos intracelulares, destruindo-os ao provocar a lise das células infectadas (células T citotóxicas) ou auxiliando outras células imunes (células T auxiliares) através da produção de mediadores protéicos solúveis, denominadas citocinas (Abbas *et al.*, 2003; Roitt *et al.*, 2003).

A eficácia do sistema imunológico envolve uma rede complexa de interações celulares e moleculares que requerem replicação de DNA, expressão de RNAm e síntese protéica, eventos biológicos que necessitam de grande quantidade de energia (Brunetto *et al.*, 2007).

Desta forma, diante de uma nutrição desequilibrada, os componentes necessários às transformações constantes que as células imunes sofrem (como crescimento celular, diferenciação e replicação), além da produção de imunoglobulinas, proteínas de fase aguda e mediadores protéicos e lipídicos (citocinas e eicosanóides, respectivamente) necessários ao desenvolvimento e à geração de uma resposta imunológica eficaz, podem estar reduzidos (Calder & Jackson, 2000; Marcos, 2003; Langley-Evans & Carrington, 2006; Fock *et al.*, 2007).

Dados da literatura apontam que crianças com desnutrição grave apresentam uma diminuição da resposta inflamatória (Sirisinha *et al.*, 1973; Kulapongs, 1977). Em animais, estes prejuízos são estudados em diversos modelos experimentais, onde várias alterações já foram descritas, dentre as quais podemos citar: redução no número de macrófagos nos sítios inflamatórios, atribuída à menor produção de quimiocinas em modelos de peritonite (Cunningham-Rundles *et al.*, 2005), diminuição da migração de monócitos, prejudicando a resposta inflamatória induzida por irritantes químicos (Tchervenkov *et al.*, 1988) e redução da formação de granuloma e da ativação de macrófagos induzida pela vacina BCG (Reynolds *et al.*, 1992).

Nosso grupo demonstrou ainda que animais cujas mães foram submetidas à restrição protéica grave durante o início da lactação (Moura *et al.* 1997) apresentam uma resposta inflamatória aguda significativamente inibida quando adultos, com uma diminuição na migração leucocitária (Barja-Fidalgo *et al.*, 2003), além de alterações na produção de citocinas e proteínas envolvidas na resposta imune inata (Silva *et al.*, 2010).

Além disso, vários estudos demonstraram que durante a desnutrição, a disponibilidade de componentes do sistema complemento (opsoninas) e consequentemente, a capacidade dos fagócitos de internalizar e destruir patógenos encontram-se reduzidas (Sirishinha *et al.*, 1973; Chandra, 1975; Sakamoto *et al.*, 1998; Chandra, 2002).

Outras alterações já descritas foram a redução da resposta de células NK (Chandra, 2002), comprometimento da atividade das células dendríticas (Abe *et al.*, 2003) e prejuízos nas barreiras das membranas mucosas (Cunningham-Rundles *et al.*, 2005), críticas para a patogênese de infecções respiratórias, gastrointestinais e do trato urinário.

Os prejuízos no sistema imune não se resumem apenas à resposta inata, visto que diversos estudos demonstram que os órgãos linfóides centrais e periféricos apresentam hipotrofia ou até mesmo atrofia na desnutrição (Faulk, 1976; Chandra, 1992). As consequências são drásticas, pois as células da linhagem linfóide, antes de se tornarem células maduras e capazes de exercer funções específicas, passam por sucessivos processos de aquisição de imunocompetência, nos órgãos linfóides primários (as células B, na medula óssea e as células T, no timo) (Abbas *et al.*, 2003). Após a fase de amadurecimento, células imunocompetentes circulam entre a corrente sanguínea e o tecido linfóide periférico até encontrarem o seu antígeno específico (Roitt *et al.*, 2003).

É de fundamental importância ressaltar que tanto a resposta imune celular quanto a resposta imune humoral são diretamente afetadas em situações de desnutrição. Conforme revisto por Cunningham-Rundles e colaboradores (2005), a deficiência nutricional pode afetar a produção de anticorpos, a afinidade do anticorpo para o antígeno e o sistema complemento.

Por outro lado, em decorrência da involução do timo (Chandra, 1992), tanto a estrutura quanto a função deste órgão são prejudicadas pela desnutrição e, consequentemente, as células T podem apresentar falhas no processo de diferenciação (Chandra, 1974; Keusch *et al.*, 1987), levando a mudanças na proporção entre os subtipos de linfócitos T (Chandra, 2002; Najera *et al.*, 2004; Cortés-Barberema *et al.*, 2008) e redução da resposta celular (Nájera *et al.*, 2004).

Estudos em crianças desnutridas comprovam tais achados. Observa-se uma diminuição na resposta de linfócitos T frente a mitógenos (Nájera *et al.*, 2001;

Rodríguez *et al.*, 2005), além de prejuízos na resposta das células Th1, com redução acentuada da produção de citocinas (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) (Rodríguez *et al.*, 2005).

Por vezes, os efeitos da desnutrição podem ser revertidos pela re-nutrição, visto que em crianças e adolescentes desnutridos, este tratamento restaura as atividades fagocítica e microbicida, a quimiotaxia e a proliferação celular em paralelo ao ganho antropométrico (Cunningham-Rundles *et al.*, 2005).

## 1.2 Timo

Há algum tempo o timo vem sendo descrito como um órgão profundamente afetado em estados de privação nutricional, sendo por isso considerado um barômetro da desnutrição (Prentice, 1999). Conforme mencionado anteriormente, a grave atrofia deste órgão é a principal alteração descrita em indivíduos desnutridos (revisto por Chandra, 1992) e resulta em prejuízos permanentes na imunidade celular devido à sua importância para o desenvolvimento de células T.

### 1.2.1 Localização, estrutura e função

O timo situa-se no mediastino anterior e é formado por dois lobos. Cada lobo é dividido em múltiplos lóbulos por septos fibrosos e cada lóbulo consiste em um córtex externo e uma medula interna. O córtex contém maior densidade celular, enquanto a medula possui uma população mais esparsa (Abbas *et al.*, 2003).

A principal função deste órgão é fornecer o ambiente adequado para o estabelecimento da sequência ordenada de eventos associados à diferenciação, seleção e maturação dos linfócitos T, a partir de células progenitoras migrantes da medula óssea (Savino, 2002; Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2007; Petrie & Zúñiga-Pflücker, 2007).

O microambiente tímico é densamente vascularizado e formado principalmente por células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos e células dendríticas (Savino *et al.*, 2004; Petrie & Zúñiga-Pflücker, 2007).

Estas células além de exercerem função estrutural, fornecem sinais de proliferação e sobrevivência e coletivamente influenciam o processo de diferenciação dos timócitos durante os diferentes estágios de maturação, através de moléculas de superfície e pela secreção de citocinas, quimiocinas, matriz extracelular, fatores de crescimento e hormônios como timulina, timopoetina e timosina- $\alpha$ 1 (Gray *et al.*, 2002; Savino, 2002; Savino *et al.*, 2004; Petrie & Zúñiga-Pflucker, 2007).

### 1.2.2 O processo de maturação de timócitos

O desenvolvimento dos timócitos avança concomitantemente com a migração destas células do córtex para a medula tímica (Takahama, 2006; Romagnani, 2006; Ciofani & Zúñiga-Pflucker, 2007) através de um processo ordenado que envolve modificações sequenciais intensas das moléculas expressas na superfície e rearranjos gênicos do receptor de células T (TCR) (Abbas *et al.*, 2003; Savino & Dardenne, 2010).

Oriundos da medula óssea, os precursores das células T chegam ao timo através do sangue e caracterizam-se pela ausência na expressão dos co-receptores CD4 e CD8 na superfície, sendo então denominados de timócitos duplo-negativos (DN) ou ainda  $CD4^-CD8^-$  (Witt & Robey, 2005; Takahama, 2006). Desta forma, representam a população de estágio mais imaturo e encontram-se predominantemente no córtex tímico (Abbas *et al.*, 2003).

À medida que a maturação se processa, o TCR e os marcadores CD4 e CD8 são expressos (Abbas *et al.*, 2003; Witt & Robey, 2005). Neste estágio, os timócitos encontram-se próximos das junções córtico-medulares e recebem a denominação de duplo-positivos (DP), sendo  $CD4^+CD8^+$  (Hayday & Pennington, 2007). Esta subpopulação é a mais abundante no timo e representa entre 75 e 85 % da população total (Savino & Dardenne, 2010).

Um vasto repertório de receptores de antígenos é gerado através de rearranjos aleatórios de diferentes segmentos gênicos (recombinação somática), resultando na variedade necessária para fornecer a proteção contra os diferentes agentes infecciosos com os quais o indivíduo defronta-se ao longo da vida (Abbas *et*

*al.*, 2003). Entretanto, se por um lado a existência de um número adequado e diverso de linfócitos T com especificidade para variados antígenos é essencial para o desenvolvimento de respostas imunológicas protetoras contra infecções, a presença de células que reconhecem e reagem aos antígenos próprios na periferia é indesejável (Romagnani, 2006; Hayday & Pennington, 2007). Portanto, a diversidade de moléculas de TCR produzida deve ser conferida e selecionada para garantir a maturação apenas de linfócitos T que expressam TCR funcional, capaz de reconhecer o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e com especificidade antigênica restrita aos elementos estranhos ou “não-próprios” (Abbas *et al.*, 2003).

Desta forma, os timócitos DP antes de atingirem a região medular sofrem um processo de triagem denominado de seleção positiva, na qual interagem com antígenos próprios apresentados por células do microambiente (células dendríticas, células endoteliais e macrófagos) (Witt & Robey, 2005; Takahama, 2006). Os timócitos que não apresentam afinidade aos complexos MHC-peptídeo morrem por negligência (Romagnani, 2006), assegurando apenas o desenvolvimento de timócitos que expressam TCR útil, capaz de se ligar adequadamente às moléculas de MHC.

Neste ponto, os timócitos que apresentam receptores com afinidade muito alta (auto-reativos, com probabilidade de ocasionarem doenças auto-imunes) sofrem apoptose, sendo então eliminados por um processo denominado seleção negativa ou tolerância central (Abbas *et al.*, 2003; Hogquist *et al.*, 2005; Griesemer *et al.*, 2010), enquanto as células que reconhecem os antígenos próprios com baixa afinidade são poupadas da apoptose e seguem em direção à maturação (Starr *et al.*, 2003; Hogquist *et al.*, 2005) (Fig.2).

Durante estes processos, os timócitos perdem um dos co-receptores, CD4 ou CD8, e são agora denominados simples-positivo (SP) CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. As células T CD4<sup>+</sup> são restritas ao reconhecimento de antígenos através de moléculas de MHC de classe II e as células T CD8<sup>+</sup>, através de moléculas de MHC de classe I (Abbas *et al.*, 2003).

Neste estágio, as células sobreviventes são finalmente consideradas maduras e deixam o timo rumo aos órgão linfóides periféricos aptos a participarem da resposta aos antígenos estranhos (Hogquist *et al.*, 2005). Desta forma, o timo

produz subtipos de células T com funções e potenciais regulatórios distintos (Hayday & Pennington, 2007).

Na periferia, enquanto as células T CD4<sup>+</sup> ativadas podem se diferenciar em células T auxiliares, cuja função efetora é mediada por determinadas moléculas de membrana e pela produção de citocinas, as células T CD8<sup>+</sup> podem se diferenciar em linfócitos T citotóxicos, cuja principal função efetora é lisar células-alvo infectadas (Abbas *et al.*, 2003).

Além disso, células T reguladoras originam-se no timo como um subtipo de célula T distinto, que possui um papel fundamental no controle de células T auto-reativas que escaparam da seleção negativa, garantindo assim a tolerância periférica aos autoantígenos e protegendo o organismo do desenvolvimento de doenças autoimunes (Romagnani, 2006).

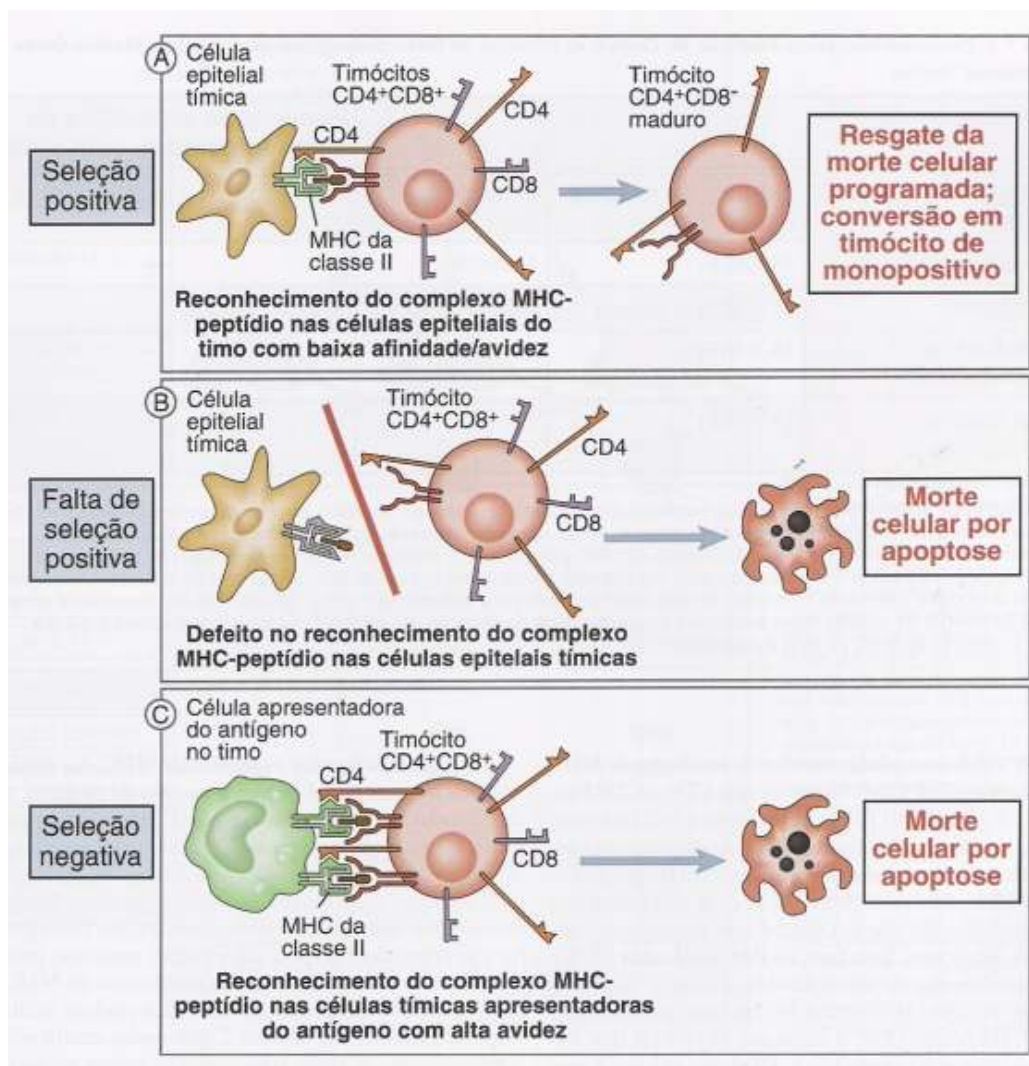


Figura 2 - Processos de seleção no timo. Os clones de linfócitos imaturos dos órgãos linfóides primários, após expressarem os receptores de antígenos, são submetidos aos processos de seleção positiva e negativa. A. Seleção positiva: os TCRs dos timócitos interagem com baixa afinidade com as moléculas próprias do MHC das células epiteliais tímicas, sendo selecionados para sobreviver e continuar o processo de maturação; B. Falta de seleção positiva: se os TCRs dos timócitos não fizerem qualquer tipo de interação com o complexo peptídeo-molécula própria de MHC nas células epiteliais do timo, eles morrerão por apoptose; C. Seleção negativa: Se os TCRs dos timócitos ligam-se ao complexo peptídeo-MHC nas células epiteliais tímicas com grande afinidade ou avidéz, é induzida a morte celular programada por apoptose. Como resultado, no repertório de linfócitos maduros, praticamente não existe células capazes de responder aos antígenos próprios (Extraída de Abbas *et al.*, 2003).

### 1.2.3 Apoptose de timócitos

Conforme mencionado anteriormente, durante todo o processo de desenvolvimento dos timócitos, uma grande parte dessas células morre por apoptose (mais de 95 %). Isto se deve principalmente aos arranjos mal sucedidos das cadeias de TCR e aos processos de seleção positiva e negativa. Portanto, estima-se que apenas uma pequena parcela (3 a 5 %) dos linfócitos gerados no timo complete todo o processo de maturação e seja exportada para os órgãos linfóides periféricos (Abbas *et al.*, 2003; Takahama, 2006).

A apoptose é caracterizada por clivagem do DNA, condensação e fragmentação nuclear, vesiculação da membrana plasmática, alterações na distribuição lipídica da membrana e deslocamento das células da matriz extracelular. As células em apoptose são rapidamente fagocitadas porque expressam moléculas de membrana que são reconhecidas por uma variedade de receptores expressos nos fagócitos. Esse tipo de morte celular fisiológica contrasta com a necrose, na qual a integridade da membrana plasmática é rompida e os conteúdos celulares são enzimaticamente degradados e liberados, resultando em inflamação patológica (Abbas *et al.*, 2003).

Nos linfócitos, há duas vias principais de regulação da apoptose: a via extrínseca, mediada por receptores de morte (DR – *death receptor*) presentes na membrana plasmática e a via intrínseca, mediada pela mitocôndria (Hail *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2009; Soriano & Scorrano, 2010). As duas vias culminam na ativação de um grupo de caspases, denominadas iniciadoras, que clivam e posteriormente ativam outras caspases. Estas caspases, quando ativadas, funcionam como efetoras, atuando sobre uma variedade de substratos, incluindo nucleases e proteínas do envoltório nuclear, dando início à fragmentação do DNA e à degradação nuclear, os marcos da apoptose (Abbas *et al.*, 2003). Como mecanismo de proteção contra ativação inadvertida, essas enzimas são sintetizadas na forma de precursores inativos (zimogênios), necessitando de clivagem para iniciar sua ativação (Hengartner, 2000).

Na via extrínseca, o processo é ativado por estímulos externos por meio de ligantes a receptores de morte (sendo o Receptor de tipo 1 do fator de necrose tumoral, TNFR1, e Fas os mais conhecidos) específicos presentes na membrana



celular. Após a interação ligante/receptor, este último interage com uma proteína adaptadora intracelular (Fas com o Domínio de Morte Associada a Fas, FADD; TNFR1 com Domínio de morte associado a TNFR1, TRADD), que juntamente com caspase-8 (iniciadora) gera um complexo de sinalização de indução de morte (DISC). Este complexo ativa caspases efetoras que resultam na execução da morte celular apoptótica (Hengartner, 2000, Zhang *et al.*, 2004).

A mitocôndria participa da manutenção de funções celulares vitais, tais como respiração celular e síntese de ATP, modulação do estado redox da célula, regulação osmótica, controle do pH, homeostasia do cálcio no citosol e sinalização intracelular. Paradoxalmente, esta organela guarda no espaço intermembrana, substâncias letais capazes de deflagrar o processo de morte celular. Portanto, para a manutenção da integridade celular é necessário que tais componentes pró-apoptóticos não sejam liberados para o citosol (Gupta *et al.*, 2009; Soriano & Scorrano, 2010; García-Sáez *et al.*, 2010).

Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial e consequente, à liberação de citocromo-c. Este se associa a duas proteínas presentes no citosol: a apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) e a pró-caspase-9, formando o apoptossomo que vai culminar na ativação da caspase-3 (Gupta *et al.*, 2009). Neste ponto, as vias intrínseca e extrínseca convergem, desencadeando sinais que irão resultar na morte celular (Petros *et al.*, 2004; Hail *et al.*, 2006). Uma representação esquemática das duas vias pode ser observada na figura 3.

A permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de citocromo c dependem da modulação de proteínas anti e próapoptóticas da família Bcl-2 (Leibowitz & Yu, 2010; Soriano & Scorrano, 2010). Esta família possui cerca de vinte proteínas já identificadas, cada uma delas com duas ou mais isoformas. Dentre essas proteínas, Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bim exercem funções próapoptóticas, enquanto as proteínas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 têm funções antiapoptóticas (Chan & Yu, 2004; Leibowitz & Yu, 2010). Assim, se prevalecer a expressão de membros próapoptóticos, ocorrerá um comprometimento do potencial de membrana mitocondrial, com saída do citocromo c, que culminará na cascata de eventos que resulta na ativação da caspase 9 e, subsequentemente, na apoptose (Lomonosova & Chinnadurai, 2008; García-Sáez *et al.*, 2010). Em contrapartida, se prevalecem os membros antiapoptóticos, a integridade da membrana é mantida.

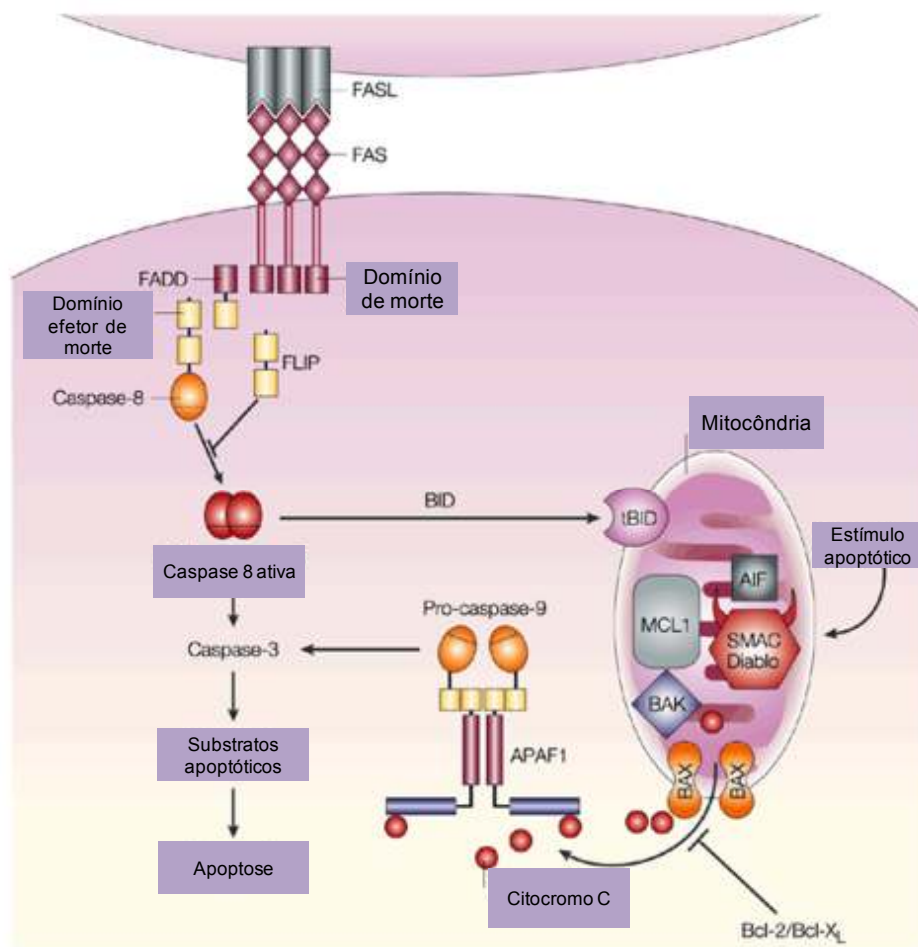


Figura 3 - Esquema das vias intrínseca e extrínseca de indução de apoptose. A via Intrínseca é iniciada com os sinais apoptogênicos gerados no interior da própria célula, os quais dirigem-se de algum modo à mitocôndria, promovendo a liberação de fatores apoptogênicos para o citosol, onde induzirão a ativação de moléculas executoras da morte celular. A via Extrínseca, é estimulada por fatores extracelulares, os quais se ligam aos membros de uma família de proteínas presentes na superfície celular, denominada Receptores de Morte (Adaptada de Pope, 2002).

#### 1.2.4 Timo como um alvo da desnutrição: importância da leptina e glicocorticóides

O desenvolvimento tímico ocorre durante o período fetal e no início da vida pós-natal. Por isso, um insulto nutricional durante estes períodos pode levar à perda da arquitetura normal (Mugerwa, 1971) e atrofia do órgão, resultando em alterações no repertório de células T e na redução da saída de células T *naive* (Chandra, 1992). Desta forma, a desnutrição pode causar prejuízos permanentes à imunidade celular (Sellmeyer *et al.*, 1972; Chandra, 1974; Cortés-Barberena *et al.*, 2008), podendo desencadear imunossupressão e um aumento da susceptibilidade a infecções (Calder & Jackson, 2000; Katona & Katona-Apte, 2008).

De acordo com essa hipótese, Moore e colaboradores (1999) demonstraram através de um estudo em indivíduos africanos, que a mortalidade relacionada a infecções em adultos nascidos durante a estação da fome foi dez vezes maior do que naqueles nascidos na estação da colheita. Os autores atribuíram os dados aos danos sofridos pelo timo no início da vida, visto que identificaram menor proporção de células CD4 / CD8 nestes indivíduos e atrofia do órgão. Além disso, outro estudo conduzido na Guiné-Bissau mostrou uma correlação inversa entre a mortalidade infantil e o tamanho do timo ao nascimento (Aaby *et al.*, 2002).

Outros estudos suportam a hipótese de que tal atrofia relacionada à restrição nutricional seja causada pela depleção de timócitos, que parece resultar do aumento da morte por apoptose (principalmente timócitos corticais) (Chandra, 1992; Howard *et al.*, 1999) somada ao decréscimo da proliferação (Mitsumori *et al.*, 1996; Savino, 2002; Sakai *et al.*, 2006). Corroborando com esses autores, Kuvibidila e colaboradores (1990) evidenciaram que timócitos de animais sujeitos a protocolos de restrição nutricional distintos exibiram uma menor resposta proliferativa frente a mitógenos. Esses eventos combinados levam a prejuízos na maturação imunológica (Lamont *et al.*, 1988; Pallaro *et al.*, 2001; Nassar *et al.*, 2007), com desproporção entre a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e T regulatórios (T reg), além de alterações funcionais nestas células (Pallaro *et al.*, 2001; Savino, 2002; Hosea *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2009). Outra característica observada em indivíduos desnutridos foi a alta proporção de linfócitos T imaturos circulantes (Keusch *et al.*, 1997).

Além dos prejuízos já mencionados, diversas pesquisas têm mostrado alterações morfológicas e histológicas no timo, onde se encontram degeneração dos corpúsculos de Hassall (estruturas possivelmente envolvidas na seleção negativa de timócitos e geração de células T regulatórias) (Revillard & Cozon, 1990; Takahama *et al.*, 2006) e, principalmente, um aumento do depósito dos componentes da matriz extracelular (como fibronectina, laminina e colágeno) (Lyra *et al.*, 1993). De forma interessante, o aumento da matriz extracelular tímica em indivíduos desnutridos correlaciona-se positivamente com o grau de depleção de timócitos, o que pode representar uma relação de causa-efeito no qual o contato dos timócitos com altas quantidades de matriz extracelular desencadeia e/ou aumenta a morte celular programada (Savino & Dardenne, 2010).

Além disso, foi mostrado que o volume do tecido epitelial no córtex e na medula dos timos de camundongos desnutridos encontra-se diminuído (Mittal *et al.*, 1988) e tais células apresentam acúmulo de colesterol e ausência de vacúolos citoplasmáticos, indicando prejuízos na secreção hormonal (Mittal & Woodward, 1985). De fato, decréscimos na produção de hormônios por células tímicas têm sido frequentemente documentados em vários tipos de restrição nutricional (Savino, 2002; Marcos *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que camundongos com restrição protéica apresentavam baixos níveis circulantes de timulina (Chandra, 1992). Os mesmos dados foram confirmados por outros autores em ratos e humanos (Mittal *et al.*, 1988; Jambon *et al.*, 1988).

A diminuição dos hormônios tímicos na desnutrição não é restrita apenas à timulina, visto que também já foram observados prejuízos na produção de timopoetina (McDade *et al.*, 2001). Nesse estudo realizado em Filipinos, os autores mostraram a associação entre a desnutrição perinatal, a redução na estatura durante o primeiro ano de vida e a diminuição na produção deste hormônio na adolescência. Estes resultados somados a outras evidências suportam a hipótese de que eventos ocorridos durante a fase perinatal afetam especialmente o timo, podendo trazer implicações no sistema imunológico.

A fisiologia do timo é influenciada por uma variedade de hormônios e neuropeptídeos (Savino & Dardenne, 2000). Os glicocorticóides (GC), hormônios bem conhecidos por sua ação imunossupressora, possuem efeitos negativos sobre este órgão. Altos níveis de GC estão relacionados com queda da celularidade e atrofia tímica (Barnard, 2008; Gruver & Sempowsky, 2008). Em contrapartida,

diversos estudos demonstram a capacidade da leptina em inibir a apoptose de timócitos e modular a expressão de citocinas tímica (Matarese *et al.*, 2005; Mansour *et al.*, 2006; Velloso *et al.*, 2009).

Foi descrito ainda que animais com deficiência na produção de leptina (*ob/ob*) exibem uma atrofia dos tecidos linfóides, particularmente o timo, e tal alteração pôde ser revertida pela reposição do hormônio (Howard *et al.*, 1999). Outro estudo demonstrou que a adrenalectomia em camundongos *ob/ob* levou à restauração do número de timócitos, tornando possível a especulação de que glicocorticóides sejam os principais mediadores da atrofia tímica na ausência de leptina (Trotter-Mayo & Roberts, 2008). Estas evidências, em conjunto, demonstram os papéis antagônicos exercidos por estes hormônios no timo.

De forma interessante, tem sido mostrado que os níveis circulantes de GC estão aumentados em camundongos com restrição protéica (Savino, 2002) e este aumento é suficiente para produzir a depleção de timócitos (Barone *et al.*, 1993). Além do aumento de GC, a desnutrição é acompanhada por uma redução significativa nos níveis de leptina (Faggioni *et al.*, 2001; Savino, 2002).

Considera-se, ainda, que este fenômeno exerça um papel importante na morfologia e função tímica anômalas observadas durante períodos de privação nutricional (Howard *et al.*, 1999), pois após o tratamento com leptina, os níveis de GC são parcialmente diminuídos e a atrofia tímica prevenida (Howard *et al.*, 1999; Mito *et al.*, 2004).

Em outro estudo realizado em crianças com desnutrição, a diminuição dos níveis de leptina estava associada ao desbalanço entre a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-4). A restauração do estado nutricional destas crianças reverteu este quadro (Palacio *et al.*, 2002).

Desta forma, como descrito na figura 4, foi levantada a hipótese de que em estados de desnutrição, o desbalanço entre a produção de leptina e glicocorticóides seja, pelo menos parcialmente, responsável pela depleção de timócitos e consequente atrofia deste órgão (Savino 2002). Tais alterações podem ser um mecanismo potencial para o aumento na susceptibilidade a infecções e prejuízos na imunidade celular em resposta a períodos de privação nutricional (Savino & Dardenne, 2010).

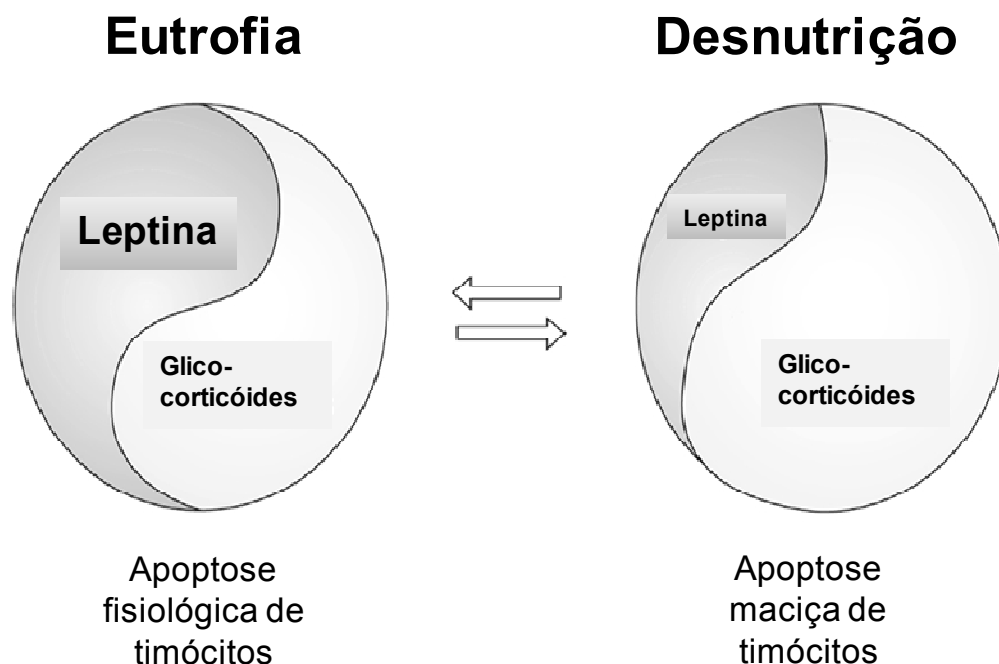


Figura 4 - Circuito hormonal envolvido no desencadeamento da depleção de timócitos que ocorre em indivíduos desnutridos. Em condições fisiológicas, há o balanço entre os níveis de glicocorticóides (próapoptóticos) e leptina (antiapoptótico), contribuindo para o padrão normal de timócitos em apoptose. Na desnutrição há um decréscimo nos níveis de leptina, levando à prevalência do estímulo do eixo hipotálamo-pituitaria-arenal que resulta no aumento nos níveis de hormônios glicocorticóides e conseqüente aumento da apoptose de timócitos. Indicado pelas setas, essa situação por vezes pode ser revertida pelo reestabelecimento de uma dieta apropriada (Adaptada de Savino, 2002).

### 1.3 Leptina

#### 1.3.1 Leptina como um mecanismo integrador do Metabolismo e Sistema imune

A leptina é uma proteína não glicosilada de 16-kDa, codificada pelo gene *ob*, localizado nos cromossomos 7 em humanos, 6 em camundongos e 5 em ratos (Zhang *et al.*, 1994; La Cava *et al.*, 2004).

Inicialmente, observou-se que a leptina exercia um efeito antiadipogênico, prevenindo o armazenamento de lipídios pelo tecido adiposo. Neste contexto, age no hipotálamo reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto metabólico (Hamann & Matthaei, 1996; Friedman, 2002).

Posteriormente, descobriu-se que as ações da leptina não são limitadas à regulação do peso corporal, possuindo efeitos pleiotrópicos nos órgãos e tecidos periféricos, resultando no aumento da termogênese, inibição da formação óssea através da ativação do sistema nervoso simpático, regulação da reprodução (Scarpace & Matheny, 1998; Takeda *et al.*, 2003; Bajari *et al.*, 2004), além da modulação de vários eixos endócrinos, como a supressão da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e regulação da sensibilidade à insulina (Harris, 2000; Proulx *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2006).

Os prejuízos na resposta imune em camundongos (Howard *et al.*, 1999) e humanos (Farooqi *et al.*, 2002), com deficiências na produção de leptina ou no seu receptor, demonstram o papel deste hormônio neuroendócrino na modulação da resposta imune/inflamatória (Friedman, 2002). Atualmente a leptina ocupa uma importante posição como um mecanismo de integração entre o estado nutricional e a função imune (Matarese & La Cava, 2004; Matarese *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2005).

A definição da estrutura terciária da leptina mostrou uma molécula composta de quatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas interconectadas, que partilham alta similaridade com as citocinas IL-6, IL-11, IL-12 e fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) (Madej *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997). Todavia, no que diz respeito a suas múltiplas ações em distintos órgãos e tecidos, a leptina age como um hormônio, justificando a criação de uma nova terminologia, adipocina, para designar a leptina e outras substâncias derivadas de tecido adiposo (Mora & Pessin, 2002; Velloso *et al.*, 2009).

Adipócitos do tecido adiposo branco são quantitativamente as principais fontes desta proteína (Friedman, 2002). Entretanto, outros tecidos, incluindo mamário, epitélios gástrico e do cólon, músculo esquelético, placenta, pituitária e linfócitos podem produzir leptina, que atua de uma maneira autócrina/parácrina no microambiente para modular a resposta imune (Lam & Lu, 2007). Por exemplo, a leptina secretada pela mucosa gástrica pode estar envolvida na proteção contra úlceras pépticas, enquanto a leptina produzida por células epiteliais do cólon poderia contribuir potencialmente para a proliferação celular e ativação de células calciformes (Hardwick *et al.*, 2001; Adeyemi *et al.*, 2005).

Trabalhos demonstram que a leptina sintetizada e secretada por linfócitos T murinos e humanos (Sanna *et al.*, 2003; Siegmund *et al.*, 2004; De Rosa *et al.*,

2007) está envolvida na regulação da proliferação de linfócitos T e modulação do balanço entre células T reg e T efectoras (De Rosa *et al.*, 2007).

Hormônios, como glicocorticóides, testosterona e insulina, bem como nutrientes, como ácidos graxos, glicosamina e malonil-coenzima A modulam a expressão da leptina, indicando um maior suporte para os papéis metabólicos e endócrinos dessa proteína (Fried *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2007). Adicionalmente, a expressão desta adipocina também é regulada por estímulos imunológicos, como lipopolissacarídeo, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Sarraf, *et al.*, 1997; Finck, *et al.*, 1998). Assim, vários estudos têm demonstrado um aumento nos níveis circulantes de leptina durante a infecção e inflamação, o que ilustra a sua integração com o sistema imune (Grunfeld *et al.*, 1996; Janik *et al.*, 1997).

### 1.3.2 O receptor de leptina - ObR

Muitos estudos *in vitro* têm demonstrado que a leptina age diretamente pela ligação ao seu receptor específico, ObR, que pertence à família de receptores de citocinas do tipo 1. Este receptor é codificado pelo gene da diabetes (*db*) e resulta do *splicing* alternativo do RNAm quando, pelo menos, seis isoformas podem ser geradas (ObRa-ObRf), apresentando um domínio extracelular comum para a ligação à leptina (Tartaglia, 1997; Banks *et al.*, 2000). Entretanto, a isoforma longa (ObRb) é a única conhecida capaz de promover sinalização intracelular devido à presença de vários motivos requeridos para interação com componentes *downstream* das vias de sinalização, enquanto as isoformas curtas são capazes de recrutar apenas um número limitado de moléculas de sinalização (Kloek *et al.*, 2002).

As isoformas curtas desse receptor são expressas em vários tecidos não-imunes e parecem mediar o transporte e degradação de leptina (Uotani *et al.*, 1999; Hileman *et al.*, 2000). O receptor solúvel (ObRe) é capaz de ligar-se à leptina com alta afinidade, desempenhando um papel na regulação dos níveis de leptina plasmática livre (Chan *et al.*, 2002).

A isoforma longa é expressa no hipotálamo, em áreas que são responsáveis pela secreção de neuropeptídeos e neurotransmissores que regulam o apetite, o peso corporal (Tartaglia *et al.*, 1995; Friedman & Halaas, 1998; Banks *et al.*, 2000) e



a massa óssea (Ducy *et al.*, 2000). Também é expressa nos tecidos periféricos como rins, pulmão e glândula adrenal (Cioffi *et al.*, 1996), células hematopoiéticas (Gainsford *et al.*, 1999), células endoteliais, células betapancreáticas, ovários e em todos os tipos celulares da resposta imune inata e adaptativa (Sierra-Honigmann *et al.*, 1998; Lord *et al.*, 1998; Lam & Lu 2007; Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2001; 2004; Zhao *et al.*, 2002; Fernández-Riejos *et al.*, 2010). Desta forma, cada tipo de célula imune testada até hoje é capaz de responder diretamente à estimulação com leptina exógena *in vitro* (Lam & Lu 2007).

### 1.3.3 As vias de sinalização da leptina

Assim como outros membros da família de citocinas de classe I, o ObR não possui atividade tirosina quinase intrínseca e depende da ativação de uma quinase intracelular para a completa funcionalidade das vias de transdução de sinal (Tartaglia, 1997).

Conforme ilustrado na figura 5, após a ligação da leptina ao sítio de ligação extracelular do ObRb, ocorre uma mudança conformacional deste, ativando a quinase intracelular da família Janus, JAK2. Subsequentemente, esta proteína sofre autofosforilação e fosforila o próprio receptor em múltiplos sítios de tirosina e com isso permite o recrutamento do fator de transcrição STAT3 (Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3). A STAT3 sofre fosforilação e homodimerização e, ao se dissociar do receptor, migra para o núcleo celular onde se liga a sequências específicas de DNA nas regiões promotoras dos genes de resposta à leptina. Finalmente, ativa a transcrição de diversos genes (Banks *et al.*, 2000; Zabeau *et al.*, 2003), incluindo reguladores negativos como a SOCS3 (supressor da sinalização de citocinas 3) (Bjorbaek *et al.*, 1999) e a PTP1B (proteína tirosina fosfatase 1B) (Cheng *et al.*, 2002).

Além de sinalizar via JAK2/STAT3 com acesso direto ao núcleo, a leptina é capaz de ativar outras vias de sinalização intracelulares, tais como a via da MAP Quinase (Proteína quinase ativada por mitógeno) (Banks *et al.*, 2000; Dunn *et al.*, 2005), a via fosfatidilinositol-3 quinase/AKT (PI3-K)/AKT (Vecchione *et al.*, 2002) e IRS1 (substrato do receptor de insulina 1) (Carvalho *et al.*, 2003).

Através dessas vias, é possível que haja uma integração entre a sinalização da leptina e um complexo sistema intracelular de *cross-talk* que regula funções tais como crescimento celular, mitogênese, metabolismo e apoptose (Friedman, 2002; La Cava *et al.*, 2004; Matarese & La Cava, 2004).

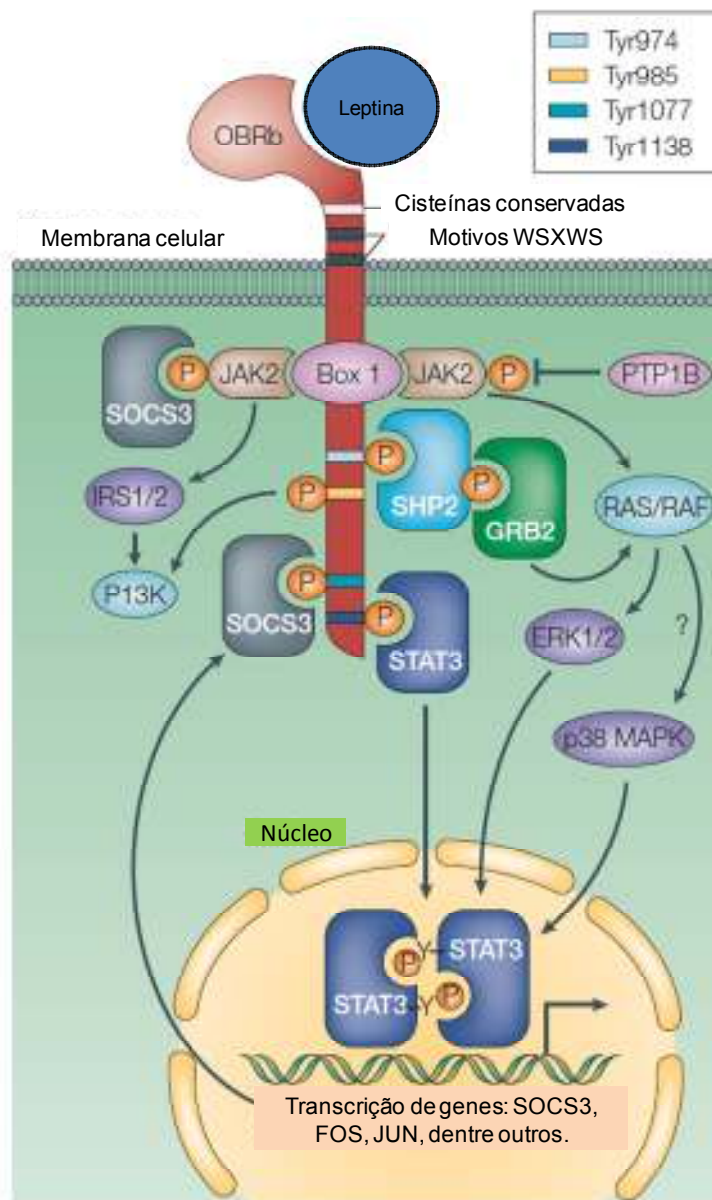


Figura 5 - Vias de sinalização ativadas pela isoforma longa do receptor de leptina (ObRb) (Adaptada de La Cava & Matarese, 2004).

#### 1.3.4 O papel da leptina no sistema Imune

Conforme observado na figura 6, a leptina possui efeitos nas imunidades inata e adquirida através da modulação direta da apoptose, ativação, proliferação, maturação e produção de mediadores inflamatórios em uma variedade de células imunes (Zhao *et al.*, 2002; Fantuzzi, 2005; Lam & Lu, 2007; Fernández-Riejos *et al.*, 2010).

A liberação de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos (Caldefie-Chezet *et al.*, 2003), a promoção da maturação, a sobrevivência e ativação de células dendríticas (Mattioli *et al.*, 2005), a ativação da resposta dos monócitos (Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2001; 2004), o aumento da resposta fagocítica dos macrófagos, além do aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias e a inibição da produção de citocinas anti-inflamatórias (Lord *et al.*, 1998) são alguns exemplos de suas ações na imunidade inata.

Com relação à regulação da imunidade adaptativa, evidências indicam que a leptina atua por meio de uma ação direta em linfócitos (Matarese *et al.*, 2005). Resumidamente, os estudos entram em consenso no que diz respeito às ações da leptina na proteção da apoptose, indução da proliferação frente a estímulos mitogênicos (Lord *et al.*, 1998; Martin-Romero *et al.*, 2000), promoção da diferenciação em direção ao fenótipo Th1 (participa da proteção contra parasitas intracelulares) (Mattioli *et al.*, 2005; Matarese *et al.* 2007) e supressão da produção de citocinas Th2 (Lord *et al.*, 1998; Goldberg *et al.*, 2009). Além disso, já foi descrito que esta adipocina inibe a atividade das células T regulatórias (De Rosa *et al.* 2007) e, por isso, exerce um importante papel em desordens autoimunes.

De acordo com esses trabalhos, a redução de leptina observada em humanos e roedores submetidos à restrição nutricional correlaciona-se com uma significativa deficiência de células T, prejuízos nas funções destas células e aumento da susceptibilidade a infecções (Howard *et al.*, 1999; Savino, 2002). Esta associação é confirmada por vários estudos que mostraram que a leptina é capaz de restaurar a proliferação e a resposta inflamatória do tipo Th1 em indivíduos desnutridos (Lord *et al.* 1998; Palacio *et al.* 2002; Goldberg *et al.*, 2009).

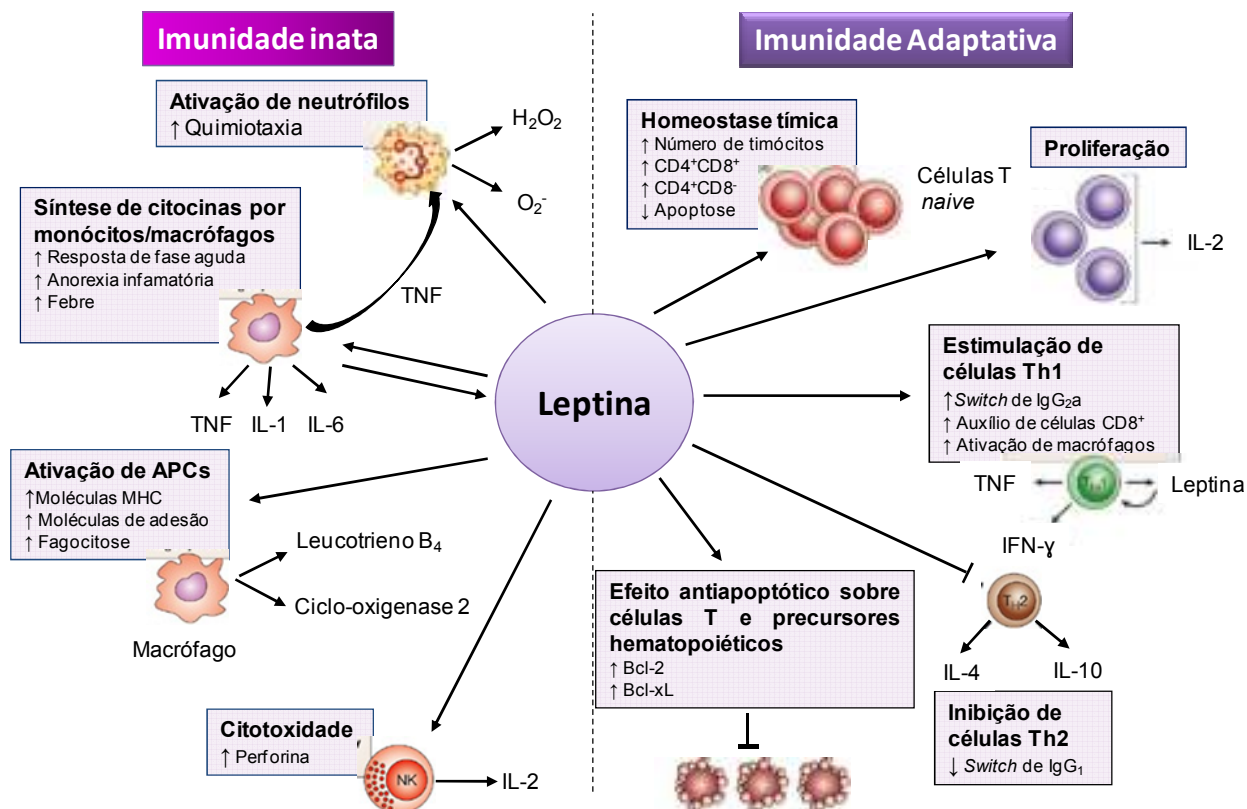


Figura 6 - Efeitos da leptina sobre a resposta imune. Na imunidade inata, leptina modula a atividade e função de neutrófilos pelo aumento da quimiotaxia e secreção de radicais de oxigênio (peróxido de hidrogênio, e superóxido) através de mecanismos diretos e indiretos. Em camundongos, a leptina parece ativar neutrófilos diretamente. Em humanos, as ações da leptina parecem ser mediadas pelo TNF secretado por monócitos. Leptina aumenta a fagocitose de monócitos/macrófagos e aumenta a secreção de mediadores pró-inflamatórios de resposta de fase aguda e a expressão de moléculas de adesão. Nas células NK, leptina aumenta a habilidade citotóxica e a secreção de perforina e IL-2. Na imunidade adaptativa, leptina afeta a geração, maturação e sobrevivência de células tímicas através da redução das taxas de apoptose. Em células T *naive*, leptina aumenta a proliferação e secreção de IL-2 através das vias da MAPK e PI3K. Nas células T de memória, leptina induz o fenótipo Th1 pelo aumento das secreções de TNF e IFN $\gamma$ . Esse processo é aumentado ainda pela secreção de leptina por essas células, que age autocrinamente. Finalmente, leptina exerce um efeito anti-apoptótico em células T maduras e precursores hematopoiéticos (Adaptada de La Cava & Matarese, 2004).

Existem poucos casos relatados de humanos com defeitos nas funções da leptina, permitindo apenas evidências circunstanciais (Montague *et al.*, 1997; Strobel *et al.*, 1998). Além disso, camundongos *ob/ob* e *db/db*, que apresentam prejuízos na produção de leptina ou defeitos no seu receptor, respectivamente, têm sido

utilizados para entender mais claramente as funções desta adipocina no sistema imune.

Dados da literatura demonstram que seres humanos ou animais com prejuízos nas funções da leptina apresentam hiperinsulinemia, aumento da ingestão alimentar e redução do gasto energético, resultando em obesidade extrema desde o início da vida. Entretanto, além das alterações metabólicas, estes indivíduos apresentam uma complexa síndrome caracterizada por prejuízos na hematopoiese e linfopoiese e são gravemente imunodeficientes (Bray & York, 1979; Zhang *et al.*, 1994; Montague *et al.*, 1997; Strobel, *et al.*, 1998; La Cava *et al.*, 2004). De forma interessante, quando tratados com leptina exógena, a restauração de diferentes aspectos da resposta imune é observada (Howard *et al.*, 1999; Farooqi *et al.*, 2002; Ferraroni *et al.*, 2005).

A imunodeficiência observada na ausência desta adipocina em humanos e roedores (*ob/ob* e *db/db*) é acompanhada pela atrofia do timo, baço e linfonodos (Dardenne *et al.*, 1983; Howard *et al.*, 1999; Faggioni *et al.*, 2000), prejuízo na produção de citocinas por diversas células imunes e produção inadequada de anticorpos após imunização (Lord *et al.*, 1998; Farooqi *et al.*, 2002; 2007; Munzberg & Myers, 2005). Também já foi mostrado que o número absoluto de células CD4<sup>+</sup> no sangue periférico é reduzido, enquanto CD8<sup>+</sup> e CD19<sup>+</sup> são aumentados, alterando a relação de células CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> (Farooqi *et al.*, 2002, 2007).

Consequentemente, camundongos *ob/ob* e *db/db* são mais suscetíveis à morte induzida por injeção de lipopolissacarídeo (LPS) (Faggioni *et al.*, 1999). O tratamento exógeno com leptina restaura a resposta de células T em camundongos, reverte a atrofia do timo e outros órgãos linfóides e diminui a susceptibilidade à morte induzida pelo LPS (Hick *et al.*, 2006; Gruver & Sempowski, 2008).

Diversos trabalhos têm mostrado a importância deste hormônio/citocina na manutenção do funcionamento normal do timo. Está bem estabelecido que o timo de camundongos obesos apresenta, além de diferenças anatômicas e estruturais, diferenças consideráveis na distribuição das subpopulações de timócitos. O número absoluto de células é reduzido em aproximadamente 10 vezes, principalmente devido à proliferação significativamente reduzida (Howard *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 2006) e à significativa perda de timócitos corticais (DP) (Prentice, 1999; Howard *et al.*, 1999; Savino, 2002; Fujita *et al.*, 2002; Hick *et al.*, 2006).

A administração de leptina nestes animais pode proteger os timócitos da apoptose, reverter a atrofia tímica ou ainda, atuar em células do estroma tímico que dirigem a timopoiese (Considine *et al.*, 1996; Hick *et al.*, 2006). Além disso, o desequilíbrio nas subpopulações de timócitos é rapidamente recuperado, com o decréscimo na percentagem de timócitos DN e um aumento nos timócitos DP, demonstrando o papel da leptina na diferenciação de timócitos imaturos (Kim *et al.*, 2010).

Estudos prévios mostraram que a transferência do tecido adiposo branco de camundongos WT (controle) para camundongos *ob/ob* ou a administração de leptina exógena nestes camundongos foram capazes de aumentar e normalizar a celularidade tímica (Howard *et al.*, 1999; Hick *et al.*, 2006; Sennello *et al.*, 2006).

Além disso, sabe-se que a leptina é capaz de inibir a função adrenocortical (Walker *et al.*, 2004) e superar os efeitos pró-apoptóticos dos glicocorticóides (Fujita *et al.*, 2002), entretanto, outros estudos demonstram os efeitos antiapoptóticos da leptina em sistemas de células isoladas (Lord *et al.*, 1998, Fujita *et al.*, 2002), assim, ocorrendo independentemente dos efeitos sistêmicos deste hormônio na função adrenocortical.

Confirmando o papel da leptina na sobrevivência dos timócitos, Montez e colaboradores (2005) mostraram que camundongos WT submetidos a depleção crônica de tecido adiposo branco e, conseqüentemente, com prejuízos na produção de leptina, também apresentam redução no número de timócitos e aumentada apoptose destas células.

#### 1.4 Glicocorticóides

Os hormônios glicocorticóides (cortisol no homem; cortisterona em roedores) são produzidos no córtex da adrenal sob o controle do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). Exercem papéis importantes em vários órgãos e sistemas, participando da regulação fisiológica e da adaptação às situações de estresse (Andrews & Walker, 1999).

Apresentam efeitos sobre a homeostase glicêmica, tanto sob condições normais quanto patológicas (Mc Mahon *et al.*, 1998; Andrew & Walker, 1999),

regulam o balanço hidroeletrólítico, a pressão sangüínea, o metabolismo e a função imune, sendo reconhecidos por sua potente ação antiinflamatória e imunossupressora (Barnes, 1998, Adcock & Caramori, 2001).

Estes hormônios exercem suas ações através de sua ligação a receptores citosólicos (GR) presentes em praticamente todas as células do organismo. Uma vez secretados, os glicocorticóides (GC) circulam ligados à globulinas e, devido à sua estrutura lipofílica, podem facilmente se difundir através das membranas ligando-se aos seus receptores intracelulares. Estes receptores encontram-se no citoplasma na sua forma inativa quando formam complexos com proteínas chaperonas, HSP90 (Proteína de choque térmico 90) (Barnes, 2005).

A ligação do hormônio ao sítio de ligação do receptor leva a ativação do GR e a sua dissociação das HSP90. O complexo glicocorticóide-receptor ativado sofre transformação conformacional e torna-se capaz de dimerizar e penetrar no núcleo onde se liga a regiões promotoras do DNA, denominadas elementos responsivos aos GC (GREs), o que resulta na regulação da transcrição gênica (Eggert *et al.*, 2001) (Fig. 7) Os GC também atuam por meio de um mecanismo não-genômico chamado de transrepressão em que monômeros de moléculas de GC e receptores de GC interagem com fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear kB (NFkB) e promovem efeito inibitório de suas funções, levando a atenuação de eventos transcricionais *downstream* (Song *et al.*, 2005).

Este mecanismo de ação garante aos glicocorticóides um potente efeito como supressor da resposta inflamatória e imune através do aumento da transcrição de genes anti-inflamatórios incluindo a lipocortina-1, IL-10, o antagonista do receptor de IL-1, e o I $\kappa$ B, além do efeito inibitório sobre a expressão de vários genes inflamatórios responsáveis pela produção de citocinas (TNF- $\alpha$ ; IL-1, IFN- $\gamma$ ; IL-6, etc), quimiocinas (IL-8, RANTES, etc), enzimas (óxido nítrico sintase - iNOS, ciclooxigenase-2 – COX-2 e hemeoxigenase-1 – HO-1) e moléculas de adesão (Barnes, 1998; 2005; Adcock & Caramori, 2001). Desta forma, são utilizados na terapia de diferentes enfermidades, incluindo doenças autoimunes, doenças inflamatórias e para a prevenção da rejeição a transplantes.

Os glicocorticóides também atuam, pelo menos em parte, na indução e aceleração da apoptose, um processo que envolve a modulação da expressão de genes pró e antiapoptóticos, incluindo Bcl-2, Mcl-1, Bim e Bax. Tais efeitos foram

observados em vários tipos celulares, incluindo timócitos imaturos e células T ativadas (revisto por Almawi *et al.*, 2004).

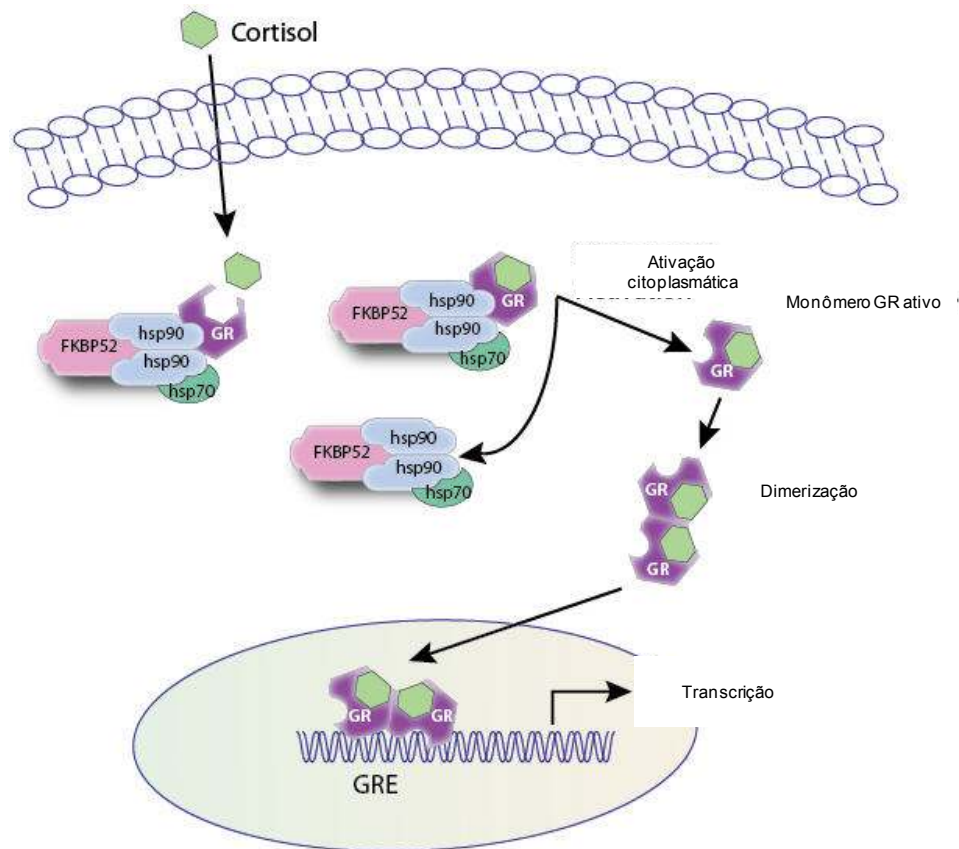


Figura 7 - Mecanismo de ação dos glicocorticóides. Disponível em: <http://www.panomics.com>)



## 2 JUSTIFICATIVA

Conforme descrito anteriormente, a restrição nutricional imposta no início da vida representa um desafio para o organismo, que desenvolve respostas adaptativas na tentativa de aperfeiçoar a sobrevivência. Entretanto, estas adaptações podem afetar uma variedade de estruturas e sistemas de forma permanente, podendo trazer consequências tardias (Tamashiro & Moran, 2010).

Dentre os sistemas afetados pela restrição nutricional em períodos críticos (gestação e lactação), podemos destacar o sistema imune (McDade *et al.*, 2001; Cunningham-Rundles *et al.*, 2005), visto que para a manutenção da proteção a agentes invasores e montagem de uma resposta imune/inflamatória adequada, o organismo necessita de um grande aporte de nutrientes (Calder & Jackson, 2000).

Nosso grupo tem estudado como a programação metabólica induzida pelo estresse nutricional materno pós-natal pode afetar o desenvolvimento da resposta imune inata na vida adulta (Barja-Fidalgo *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2010), entretanto, os efeitos sobre componentes específicos da imunidade mediada por células T também não estão completamente compreendidos.

Em termos de componente-alvo, o timo vem sendo bastante estudado em modelos animais por ser altamente suscetível à desnutrição perinatal. Além disso, representa um órgão central para o desenvolvimento da imunidade celular por fornecer um microambiente único no qual as células T precursoras promovem o seu desenvolvimento, maturação, diferenciação e expansão clonal (Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2007; Savino *et al.*, 2007).

Os linfócitos utilizam complexas vias de transdução de sinais que regulam a proliferação, apoptose, diferenciação celular e suas funções efetoras (Abbas *et al.*, 2003). Muitos autores demonstraram que um déficit nutricional durante fases iniciais da vida alteram elementos fisiológicos em vários tipos celulares, como receptores de hormônios (Delghingaro-Augusto *et al.*, 2004; Gnanalingham *et al.*, 2005), moléculas de sinalização (Agote *et al.*, 2001; Gavete *et al.*, 2002; Lopes da Costa *et al.*, 2005; Sampaio de Freitas *et al.*, 2003; Garcia-Souza *et al.*, 2008) e enzimas regulatórias (Sampaio de Freitas *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Garcia-Souza *et al.*, 2008).

Utilizando o modelo de restrição protéica materna (8 %) em ratos durante todo o período de lactação, vários estudos foram desenvolvidos, mostrando: alterações

na função tireoidiana (Passos *et al.*, 2002), alterações na expressão do RNAm para hormônio do crescimento (De Moura *et al.*, 2007), modificações na composição corporal e na homeostase da glicose (Fagundes *et al.*, 2007), maior expressão do receptor de leptina na pituitária (Vicente *et al.*, 2004) e um aumento nos níveis séricos de leptina ao final da lactação (21º dia de vida) (Teixeira *et al.*, 2002). Este último achado é particularmente interessante, visto que conforme mencionado anteriormente, a leptina representa um *link* entre os sistemas imune e metabólico (Savino *et al.*, 2007; Velloso *et al.*, 2009). Além disso, vem sendo estabelecida uma estreita relação entre a diminuição dos níveis deste hormônio/citocina e alterações na função tímica durante a desnutrição sugerindo que este seja um mecanismo potencial para o aumento da suscetibilidade a infecções e prejuízos na imunidade celular durante períodos de privação nutricional (Savino & Dardenne, 2010).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Os objetivos deste estudo são investigar e caracterizar o efeito da restrição protéica materna (8 % de proteína) durante a lactação sobre a resposta de timócitos isolados da prole jovem (30 dias de vida) de ratos Wistar, identificando o papel da leptina nas alterações encontradas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito da desnutrição protéica materna (8 % de proteína) sobre o peso corporal e do timo da prole jovem (30 dias);
  - b) Avaliar o efeito da desnutrição protéica materna sobre o número de timócitos da prole jovem (30 dias);
  - c) Dosar os níveis séricos de leptina (21º e 30º dia) e corticosterona (30º dia) na prole jovem de fêmeas submetidas à restrição protéica durante a lactação;
  - d) Em timócitos isolados da prole jovem (30 dias) de fêmeas submetidas a restrição protéica durante a lactação:
    - Quantificar as subpopulações de timócitos (CD4/CD8);
    - Avaliar a resposta apoptótica e a viabilidade celular;
    - Analisar a resposta proliferativa frente ao estímulo mitogênico da Concanavalina A (ConA).
- Avaliar a expressão e a ativação de proteínas-chave envolvidas na cascata de sinalização da leptina, tais como: a isoforma longa e funcional do seu receptor, ObRb; as proteínas da via clássica, JAK2 e STAT3; proteínas da via

alternativa, AKT e IRS-1.

- Correlacionar as possíveis alterações na apoptose com modificações na expressão e ativação de proteínas-chave da via de sinalização da apoptose, tais como: a proteína antiapoptótica Bcl-2; as proteínas próapoptóticas Bad, Bax e Pró-Caspase-3; o fator de transcrição NF $\kappa$ B e sua chaperona, I $\kappa$ B;

- Avaliar a expressão do receptor de glicocorticóide no núcleo.

e) Quantificar a expressão dos genes *ob* e *db* no microambiente tímico da prole jovem de fêmeas submetidas à restrição protéica durante a lactação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos animais utilizados neste estudo foram realizados de acordo com as normas internacionais para utilização e tratamento de animais, com aprovação pela Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Protocolo n° CEA/047/2009).

### 4.1 Modelo experimental de desnutrição

Ratos Wistar machos e fêmeas provenientes da Fundação Oswaldo Cruz foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia da UERJ, sob condições controladas de ciclos claro/escuro de 12 por 12 horas, 60 % de umidade, temperatura ambiente de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e livre acesso a ração e água. O acasalamento foi realizado durante o período de 10 dias, na proporção de três fêmeas virgens para um macho. Após a fecundação, as fêmeas foram separadas dos machos e alocadas em gaiolas individuais, recebendo ração industrializada específica para roedores contendo 22% de proteína (Labina-Purina®) e água à vontade durante todo o período da gestação.

Para um melhor desempenho lactotrófico, imediatamente após o nascimento foram separados aleatoriamente 6 animais (machos) por ninhada (Moura *et al.*, 1996).

As ratas lactantes foram separadas em grupo controle (**C**) e grupo desnutrido (**D**), e receberam ração industrializada contendo 22 % de proteína ou ração artesanal com 8 % de proteína, respectivamente, durante todo o período de lactação. No 21<sup>o</sup> dia os animais de cada grupo foram separados da mãe, e após o desmame, receberam água e ração industrializada contendo 22 % de proteína até o momento da realização dos experimentos, 30 dias após o nascimento (Fig. 8)

Os animais utilizados em todos os experimentos foram escolhidos aleatoriamente e foram provenientes de pelo menos três ninhadas diferentes.

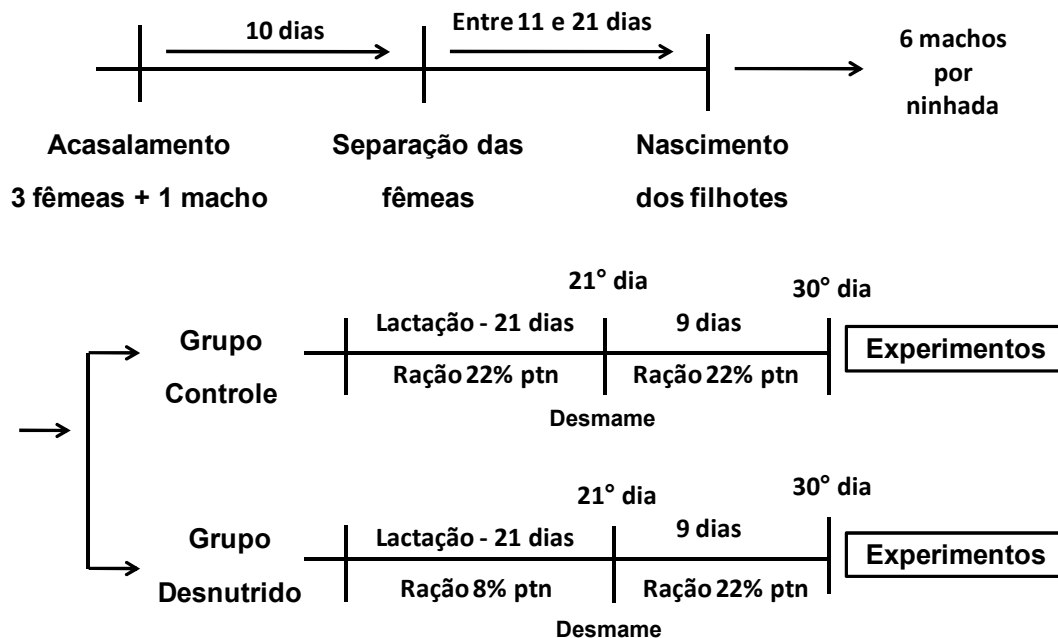


Figura 8 - Esquema de acasalamento e separação dos grupos de animais controle e desnutridos.

## 4.2 Dietas

A ração industrializada específica para roedores (Labina-Purina®), obtida comercialmente, é um alimento equilibrado e segue as recomendações do *National Research Council Institute-USA*. Basicamente, a ração é composta por: carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, mistura de minerais, vitaminas e aminoácidos (Tabelas 1 e 2).

A ração artesanal utilizada para o grupo de ratas lactantes desnutridas é isocalórica em relação à ração industrializada, hipoprotéica (8 % de proteína) (Fagundes *et al.*, 2007) e produzida artesanalmente no Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Celular (LFBC) situado no Instituto de Biologia da UERJ. (Tabelas 3 e 4). A proteína utilizada foi preparada utilizando a dieta controle, substituindo parte da quantidade de proteína por amido de milho, que foi calculada de maneira que compensasse a diminuição do teor de energia. A suplementação de vitaminas e sais minerais foi baseada na suplementação da ração comercial específica para ratos (Labina-Purina®), nosso grupo controle.

Tabela 1 - Composição básica da ração industrializada específica para ratos Labina-Purina® utilizada para as ratas lactantes sem restrição protéica e filhotes em crescimento

**Ração específica para ratos Labinal® (Purina®)**

**Níveis de garantia**

Umidade (máxima)	12,5 %
Proteína bruta (mínimo)	22,0 %
Carboidrato (mínimo)	72,6 %
Lipídeos (mínimo)	5,4 %
Calorias/1 g de ração	4,21 Kcal ou 17,68 Kj
Material mineral (máximo)	10 %
Matéria fibrosa (máximo)	8,0 %
Cálcio (máximo)	1,4 %
Fósforo (mínimo)	0,8%

Tabela 2 - Composição de micronutrientes da ração industrializada específica para ratos Labina-Purina®, utilizada para ratas lactantes sem restrição protéica e filhotes a partir dos 21 dias de vida

<b>Ração específica para ratos Labina-Purina®</b>	
<b>Suplementação por Kg não mais do que:</b>	
Vitaminas	Vitamina A: 12.000 UI, vitamina D3 : 1800 UI, vitamina E: 30 mg, vitamina K : 3 mg, vitamina B1: 5 mg, vitamina B2: 6 mg, vitamina B6: 7 mg, vitamina B12: 20 µg, ácido fólico: 1 mg, biotina: 1,5 mg, colina: 600 mg, niacina: 60 mg e ácido pantotênico: 20 mg.
Microelementos minerais	Ferro: 50 mg, zinco: 60 mg, cobre: 10 mg, iodo: 2 mg, manganês: 60 mg, selênio: 0,05 mg e cobalto: 1,5 mg
Aminoácidos	DL-metionina: 300 mg e lisina: 100 mg

Tabela 3 - Composição básica da ração artesanal utilizada para as ratas lactantes com restrição protéica (8 % de proteína)

<b>Ração artesanal hipoprotéica (LFBC/IB/UERJ)</b>	
Proteína	8 %
Carboidrato	86 %
Lipídeos	6 %
Calorias/g de ração	4,21 kCal ou 17,68 kJ

Tabela 4 - Composição de micronutrientes da ração artesanal utilizada para as ratas lactantes com restrição protéica (8 % de proteína)

<b>Ração específica artesanal (LFBC/IB/UERJ)</b>	
<b>Suplementação por Kg não mais do que:</b>	
Vitaminas	Vitamina A: 12.000 UI, vitamina D3 : 1800 UI, vitamina E: 30 mg, vitamina K : 3 mg, vitamina B1: 5 mg, vitamina B2: 6 mg, vitamina B6: 7 mg, vitamina B12: 20 µg, ácido fólico: 1 mg, biotina: 1,5 mg, colina: 600 mg, niacina: 60 mg e ácido pantotênico: 20 mg.
Microelementos minerais	Ferro: 50 mg, zinco: 60 mg, cobre: 10 mg, iodo: 2 mg, manganês: 60 mg, selênio: 0,05 mg, cobalto: 1,5 mg, cálcio: 4207 mg, potássio: 2765 mg e sódio: 1226 mg

#### 4.3 Coleta de sangue e obtenção de plasma

Os animais foram mantidos em jejum por aproximadamente 12 horas e anestesiados com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg); o sangue foi coletado através de punção cardíaca, com o auxílio de seringa e agulha contendo



anticoagulante (500  $\mu$ L de EDTA 5 % em PBS estéril). Após a coleta, o sangue foi centrifugado em tubos de ensaio a 3.000 rpm por 10 minutos e o plasma foi coletado, aliquotado e estocado em freezer - 70°C para dosagem de corticosterona e leptina.

#### 4.4 Dosagem de corticosterona

Os níveis de corticosterona plasmática dos animais em jejum foram avaliados em placas de 96 poços, utilizando-se um *kit EIA* (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, EUA), conforme instruções do fabricante.

O ensaio baseia-se na competição entre a corticosterona presente nas amostras de plasma e a corticosterona conjugada a acetilcolinesterase (AChE, o “traçador”), pela ligação ao anticorpo específico.

Após lavagens, a placa foi incubada com o reagente Ellman`s (que contém o substrato para AChE) por aproximadamente duas horas a temperatura ambiente. A intensidade da coloração do produto desta reação enzimática foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 405 nm.

A absorvância média das duplicatas é proporcional à quantidade de traçador ligado à placa e inversamente proporcional à quantidade de corticosterona presente na amostra.

A partir da curva padrão calculou-se a concentração de corticosterona presente nas amostras, conforme instruções do fabricante.

#### 4.5 Dosagem de leptina

A dosagem de leptina no plasma dos animais em jejum foi realizada por ELISA utilizando um kit comercialmente disponível (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). A dosagem foi realizada conforme as instruções do fabricante.

Uma placa de 96 poços foi coberta com anticorpo de captura na concentração de 100  $\mu$ g/mL e incubada *overnight* em temperatura ambiente. Após este período, a

placa foi lavada seis vezes (Tween-20 0,05 % em PBS) e em seguida, bloqueada (BSA 1 % em PBS) por duas horas. Após novas lavagens, a curva padrão (de 2 ng/ml a 0,0125 ng/ml) e as amostras foram incubadas por duas horas em um volume de 100 µl/poço. Em seguida, a placa foi lavada novamente e incubada com anticorpo de detecção (100 µg/ml) por duas horas.

Após novas lavagens, adicionou-se à placa 100 µL/poço de Avidina-HRP diluída 1 : 2.000 em solução diluente (Tween-20 0,5 %, BSA 0,1 % em PBS).

Após 30 minutos, o substrato 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico - ABTS) (Sigma, St Louis, MO) foi adicionado e a placa foi mantida protegida da luz.

A leitura da placa foi realizada a cada cinco minutos, em leitor de placas (BIORAD), no comprimento de onda de 405 nm com correção a 650 nm. Todas as dosagens foram feitas em triplicatas.

#### **4.6 Pesagem dos timos**

Animais dos grupos controle e desnutrido foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o timo foi coletado cuidadosamente e pesado em balança de precisão (FILIZOLA® Modelo MF-3L).

#### **4.7 Isolamento de timócitos**

Os timos de ratos jovens (30 dias de idade) foram macerados e os timócitos foram isolados por densidade através de centrifugação em gradiente de Ficoll-hypaque (Pharmacia) conforme descrito por Neto e colaboradores (2007).

Resumidamente, o timo foi coletado e dissociado em 5 ml de meio RPMI incompleto. Após dissociação, 5 ml do sobrenadante foram aplicados sobre 5 ml de Ficoll-hypaque e submetidos à centrifugação (700 x g; 40 minutos; acc/dcc 5, a 20°C). Em seguida, a monocamada de células foi coletada e as células foram lavadas em 10 ml de RPMI incompleto.

Após a lavagem, as células foram incubadas em placas de 6 poços durante aproximadamente duas horas em estufa umidificada a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub> para a aderência de macrófagos. Em seguida, as células não aderidas (linfócitos) foram coletadas e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, diluindo-se alíquotas em solução de azul de Tripán, na proporção de 1:180. Em todos os experimentos, > 97% das células estavam viáveis.

Após a contagem, as células foram incubadas em RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS).

#### 4.8 Obtenção do microambiente tímico

Os timos de ratos jovens (30 dias de idade) foram macerados em peneiras (trama de 200 µm de espessura) e o microambiente retido foi coletado para análise dos genes *ob* (Leptina) e *db* por RT-PCR.

#### 4.9 Análise de marcadores de superfície

Os timócitos ( $1,5 \times 10^6$ /ml) foram incubados na ausência ou presença de leptina ( $10^{-8}$  M) por 24 horas a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes em tampão de ligação (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,8 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,4) e centrifugadas a 400 x *g* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas por uma hora com solução bloqueio (BSA 2 %, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl em PBS).

Após esse período, as células foram incubadas por 20 minutos a 4°C, na ausência de luz, com anticorpo anti-CD4 conjugado a PE (0,2 mg/ml) e anticorpo anti-CD8 conjugado a FITC (0,5 mg/ml) diluídos em tampão de ligação.

Em seguida foram lavadas duas vezes com tampão de ligação, colocadas em tubos de ensaio e analisadas por citometria de fluxo (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) e foram determinadas as porcentagens das células duplo-negativas (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>), duplo-positivas (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) e simples positivas (CD4<sup>+</sup> ou

CD8<sup>+</sup>) utilizando-se CellQuest software (Becton Dickinson Biosciences). Isotipos controles PE-IgG e FITC-IgG foram usados como controle negativo.

#### 4.10 Análise por citometria de fluxo das células em apoptose

Os timócitos foram incubados na ausência ou presença de leptina ( $10^{-8}$  M) por 24 horas a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Ao final do período de incubação, o número de células em apoptose ou necrose foi identificado pelo ensaio de externalização de fosfatidilserina conforme descrito por Saldanha-Gama e colaboradores (2010).

Resumidamente, as células foram lavadas em tampão de ligação e em seguida, adicionou-se uma solução de anexina V conjugada com FITC (1:500) diluída em tampão de ligação. Após incubação por 20 minutos na ausência de luz, o iodeto de propideo foi adicionado (15 mg/ml; Sigma Chemicals, St Louis, USA).

As análises foram realizadas imediatamente em citômetro de fluxo (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA), utilizando-se CellQuest software (Becton Dickinson Biosciences), no qual foram determinadas as porcentagens de células viáveis (iodeto e anexina V negativas), em necrose (iodeto positivas e anexina V negativas), apoptose tardia (iodeto e anexina V positivas) e apoptose inicial (iodeto negativas e anexina V positivas). Os grupos foram comparados utilizando a percentagem de células em apoptose inicial.

Timócitos isolados de animais do grupo C, não marcados, foram suspensos em tampão de ligação e utilizados como controle negativo para a determinação das regiões a serem analisadas.

#### 4.11 Ensaio de viabilidade

Os timócitos isolados dos animais C e D ( $1,0 \times 10^6$ /ml) foram incubados a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> na presença ou ausência de leptina ( $10^{-8}$  M) e / ou dexametasona (1 µM) por 24 e 48 horas. Após esse período, a análise da viabilidade celular foi realizada pelo método de exclusão por azul de Tripán, onde qual as células mortas

incorporam o corante e adquirem cor azulada, enquanto as células viáveis excluem o corante devido à manutenção da integridade da membrana plasmática.

Para isso, a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, diluindo-se alíquotas em solução de azul de Tripán, na proporção de 1:20 e a viabilidade celular foi calculada a partir da seguinte fórmula: viabilidade celular (%) = (número de células não-coradas/ número total de células) x 100.

#### 4.12 Ensaio de proliferação *in vitro*

Após a separação, as células foram plaqueadas ( $2,0 \times 10^5$  células/poço) em placas de 96 poços. Os timócitos foram incubadas com Concanavalina A (ConA – Sigma, 2  $\mu\text{g/mL}$ ) e/ou Leptina ( $10^{-8}\text{M}$ ) durante 24 e 48 horas em estufa umidificada a 37°C e 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Durante as últimas seis horas de ensaio, adicionou-se a cultura  $\text{H}^3$ [Timidina] (Amersham Biosciences) (1  $\mu\text{Ci/poço}$ ). Após esse tempo, as células foram lavadas três vezes com tampão salina fosfato (PBS) e a proliferação foi medida pela incorporação de  $\text{H}^3$ [Timidina], como determinado pela contagem em líquido de cintilação (Beta Counter, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

#### 4.13 Ensaio de RT-PCR

O RNA total dos timócitos ( $1,0 \times 10^7$  células) e do microambiente tímico foi extraído com o reagente Trizol®, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A quantificação do RNA total foi feita em espectrofotômetro na absorvância de 260 nm. Após o tratamento com DNase (RQ1 RNase-Free DNase; Promega, São Paulo, SP, Brasil), o DNA complementar foi sintetizado a partir do RNA total (2,0  $\mu\text{g}$ ) utilizando a transcriptase reversa do vírus de leucemia murina de moloney (M-MLV) e oligo (dT) 15 como primer.

O PCR em tempo real foi realizado em rotor gene Q utilizando-se um sistema de quantificação de fluorescência verde emitida por SYBR (Qiagen) para quantificar

amplicons. As condições padrões de PCR foram 95°C por cinco minutos, 35 ciclos a 95°C (5 s) e 60°C (10 s) seguido pela curva padrão de desnaturação.

Primers baseados na sequência do gene *ob* de *Rattus norvegicus* (banco de acesso do gene n°: NM\_013076.3) foram usados para amplificar o CDNA de 81 pares de base: sentido: 5'-TCCTGTGGCTTTGGTCCTAT-3' e antisense: 5'-TGATGAGGGTTTTGGTGTCA-3'; o gene *db* de *Rattus norvegicus* (banco de acesso do gene n°: AF\_287268) foram usados para amplificar o cDNA de 132 pares de base: sentido: 5'-CTGCTGGAGTCCCAAACAAT-3' e antisense: 5'-CATTCCCAAAGCAACAGTGG-3'; primers do GAPDH foram utilizados para validar os cDNA (banco de acesso do gene n° DQ\_403053) de cada reação; sentido: 5'-TCAACGGGAAACCCATCACCATCT-3' e antisense: 3'-ACGACATACTCAGCACCAGCATCA-3'.

#### 4.14 Preparação de extrato celular total

Para análise da expressão de ObRb, pJAK, JAK, pSTAT3, STAT3, pAKT, AKT, pIRS-1, IRS-1, I $\kappa$ B, Pró-Caspase-3, Bad, Bcl-2, Bax e actina, os timócitos foram isolados conforme descrito anteriormente, homogeneizados por 30 minutos no gelo em tampão de lise contendo HEPES 50 mM (pH 6,4), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ortovanadato de sódio 2 mM, Triton X-100 1 %; DNase 1  $\mu$ g/mL, RNase 0,5  $\mu$ g/mL e os inibidores de proteases: PMSF 1 mM, aprotinina 1  $\mu$ M, leupeptina 1  $\mu$ M, pepstatina 1  $\mu$ M e inibidor de tripsina de soja 1  $\mu$ M. O conteúdo total destas proteínas foi analisado por Western Blotting, conforme descrito no item 4.16.

#### 4.15 Preparação de extrato nuclear

Para análise da expressão de nuclear de histona, NF $\kappa$ B e do receptor de glicocorticoide, os timócitos isolados conforme descrito anteriormente foram homogeneizados, no gelo, em tampão A (HEPES 10 mM-Ph7,9; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; EGTA 0,1 mM; ditionitrol 1 mM e PMSF 1 mM) e, após 15 minutos de

incubação à 4°C, adicionou-se NP-40 a concentração final de 0,5 % (v/v). O extrato celular foi centrifugado a 12.000 x g por 5 minutos a 4° C. Ressuspendeu-se o precipitado em tampão C (HEPES 20 mM- pH 7,9; NaCl 400 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; ditioneitol 1 mM; PMSF 1 mM; pepstatina 1 µg/ml; leupeptina 1 µg/ml e (v/v) glicerol 20 %) e incubou-se por 30 minutos no gelo. As proteínas nucleares foram coletadas no sobrenadante após centrifugação (12.000 x g por 10 minutos a 4° C) e a expressão das proteínas foi analisada por Western Blotting.

#### 4.16 Western Blotting

A quantificação das proteínas, presentes nos extratos celular e nuclear, foi determinado pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Em seguida, as amostras foram tratadas com tampão de amostra 5x concentrado (Tris-HCl 50 mM, pH 6,8; SDS 1 %; β -mercaptoetanol 5 %; glicerol 1 %; azul de bromofenol 0,001 %) por cinco minutos a 95°C e em seguida congeladas para serem submetidas ao SDS-PAGE.

Amostras contendo 30 µg de proteínas (extrato celular total) ou 10 µg de proteínas (extrato nuclear) foram separadas por eletroforese em gel desnaturante a 8, 10, 12 ou 15 % de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Um padrão de diferentes pesos moleculares foi utilizado em todas as eletroforeses por SDS-PAGE (Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham Biosciences) para estimar o peso molecular das proteínas. Após a separação eletroforética, foi realizada a transferência das proteínas para membranas de PVDF (PVDF Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) por uma hora utilizando-se o sistema Semi-dry (BIO-RAD). Em seguida, as membranas foram incubadas, durante uma hora, com solução de bloqueio contendo 5 % de albumina de soro bovino (BSA; Sigma) e T-PBS (Tween-20 0,1% em PBS) seguidas de incubação *overnight* com os anticorpos primários específicos. Os seguintes anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology) foram utilizados: goat anti-pIRS-1 (sc 17.200; 1:250), goat anti-IRS-1 (sc 559-G; 1:1.000), goat anti-AKT (sc 7126; 1:500), rabbit anti-pAKT (sc 7985-R; 1:500), mouse anti- $\kappa$ B $\alpha$  (sc 371; 1:1.000), mouse anti-ObRb (sc 8391; 1:250), rabbit anti-caspase-3

(sc 7148; 1:1.000), rabbit anti-Bad (sc 7869; 1:500), rabbit anti-Bax (sc 6236; 1:500), rabbit anti-GR (sc 8992; 1:1.000), mouse anti-STAT3 (sc 8019;1:1.000), mouse anti-pSTAT3 (sc 8059; 1:1.000), rabbit anti-Bcl2 (sc 783; 1:500), mouse anti-actina (sc 8432; 1:1000), mouse anti-JAK2 (sc 294; 1:1.000), goat anti-pJAK2 (sc 21870; 1:1.000) rabbit anti-NF $\kappa$ B (sc 372; 1:1.000), goat anti-histona (sc 8654; 1:1.000).

As membranas foram lavadas com T-PBS e então incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado com biotina (1:5.000-1:10.000, Santa Cruz Biotechnology) por uma hora. Em seguida, as membranas foram lavadas com T-PBS e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:5.000 - 1:10.000, Zymed, S. San Francisco, California, USA), por uma hora.

As membranas foram strippadas com tampão de Stripping (62,5 mM Tris-HCl, SDS 2 % e 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) e re-blotadas com anticorpos anti-actina ou anti-histona.

As proteínas imunorreativas foram visualizadas pela marcação com ECL, utilizando-se o kit ECL plus (Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) e os filmes foram escaneados e analisados. As bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando-se o Software Image J (NIH, USA).

A expressão das proteínas nos extratos nucleares e celulares foi normalizada pelos níveis de histona e actina, respectivamente.

#### **4.17 Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os resultados obtidos para cada grupo experimental foram analisados estatisticamente utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *t* e de Bonferroni. A significância foi considerada para valores de  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados utilizando GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, USA).



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre os pesos corporal e tímico e o número total de timócitos isolados da prole jovem

Inicialmente, investigamos o efeito da restrição protéica materna (8% de proteína) durante a lactação sobre os pesos corporal e do timo da prole jovem (30 dias) (grupo D). Conforme demonstrado na **tabela 5**, os animais do grupo D apresentam uma diminuição significativa nos pesos corporal (aproximadamente 37 %) e do timo (aproximadamente 27 %) quando comparados ao grupo C, entretanto, essas alterações se deram de maneira proporcional, visto que a razão entre estes valores foi similar entre os grupos.

Apesar do menor peso dos timos no grupo D, não observamos alterações no número total de timócitos ou no número de células por miligrama de tecido, sugerindo que o modelo de restrição protéica materna utilizado não prejudica o timo da prole.

Tabela 5 - Peso corporal e do timo e número total de timócitos dos grupos Controle (C) e Desnutrido (D)

	C	D
<b>Peso Corporal (g)</b>	<b>95,83 ± 2,81</b>	<b>60,36 ± 2,58 *</b>
<b>Peso do Timo (g)</b>	<b>0,41 ± 0,01</b>	<b>0,30 ± 0,02 *</b>
<b>Peso tímico / Peso Corporal</b>	<b>0,0046 ± 0,0004</b>	<b>0,0044 ± 0,0003</b>
<b>Nº total de timócitos (x 10<sup>8</sup>)</b>	<b>4,03 ± 0,33</b>	<b>3,42 ± 0,29</b>
<b>Nº de timócitos / mg de tecido (x10<sup>5</sup>)</b>	<b>0,98 ± 0,08</b>	<b>1,08 ± 0,09</b>

Valores representam a média ± EPM de 8-16 animais por grupo. \*p<0,05 quando comparado ao grupo C.

## 5.2 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre os níveis séricos de leptina da prole jovem (21 e 30 dias)

Os níveis de leptina plasmática foram avaliados nos grupos controle e desnutrido aos 21 e 30 dias de idade. Confirmando estudos anteriores (Teixeira *et al.*, 2002), os animais do grupo desnutrido apresentam um aumento (aproximadamente 85 %) nos níveis séricos de leptina aos 21 dias, quando comparados ao grupo controle (**Figura 9A**). Entretanto, nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada nos animais aos 30 dias de vida (**Figura 9B**), idade dos animais utilizados neste estudo.

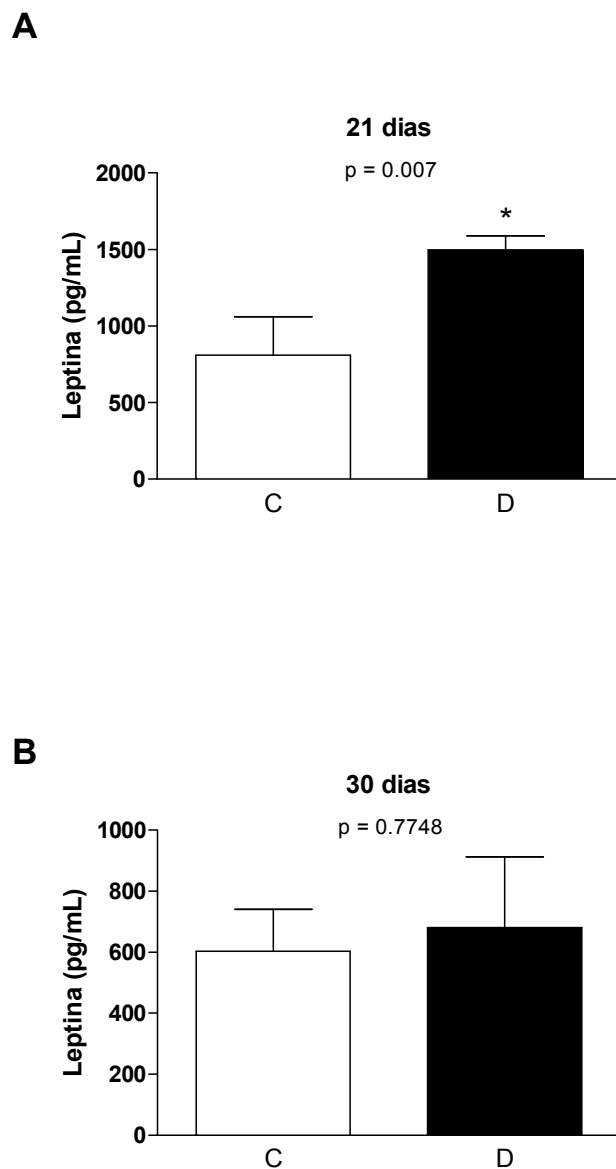


Figura 9 - Níveis séricos de leptina dos animais dos grupos C e D nos 21º e 30º dias. Animais com 21 (A) e 30 (B) dias de vida deixados em jejum por aproximadamente 12 horas foram anestesiados com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O soro foi utilizado para a determinação da concentração de leptina por ELISA. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 8-12 animais por grupo. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

### 5.3 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a expressão de proteínas da via clássica de sinalização da leptina em timócitos isolados da prole jovem

Investigamos a via clássica de transdução de sinal mediada pela leptina em timócitos isolados de ratos C e D, investigando, inicialmente, a expressão do RNAm para ObRb.

A expressão gênica da isoforma longa e funcional do receptor de leptina foi similar nos grupos C e D, conforme analisado por meio da técnica de PCR em tempo real (**Figura 10A**). Entretanto, avaliando a expressão protéica por Western Blotting, demonstramos que os timócitos do grupo desnutrido apresentam um aumento de 73 % nos níveis deste receptor, quando com-parados ao grupo controle (**Figura 10B**). Esse resultado sugere que a sinalização da leptina nos timócitos do grupo D poderia estar potencializada.

Para testar esta hipótese, avaliamos a ativação de JAK2 e STAT3, através da fosforilação destas proteínas. Em condições basais, nenhuma diferença significativa foi observada nos conteúdos de pJAK e pSTAT3 em timócitos isolados de animais C e D (**Figuras 11A e 12A**, respectivamente).

Como esperado, o tratamento das células com leptina por uma hora aumentou a fosforilação de JAK2 e STAT3 em ambos os grupos, entretanto, esses aumentos foram mais expressivos no grupo D (C+Lep: aproximadamente 1,5 vs D+Lep: aproximadamente 2 vezes; C+Lep aproximadamente 2 vs D+Lep: aproximadamente 3,2 vezes, respectivamente) (**Figuras 11B e 12B**, respectivamente).

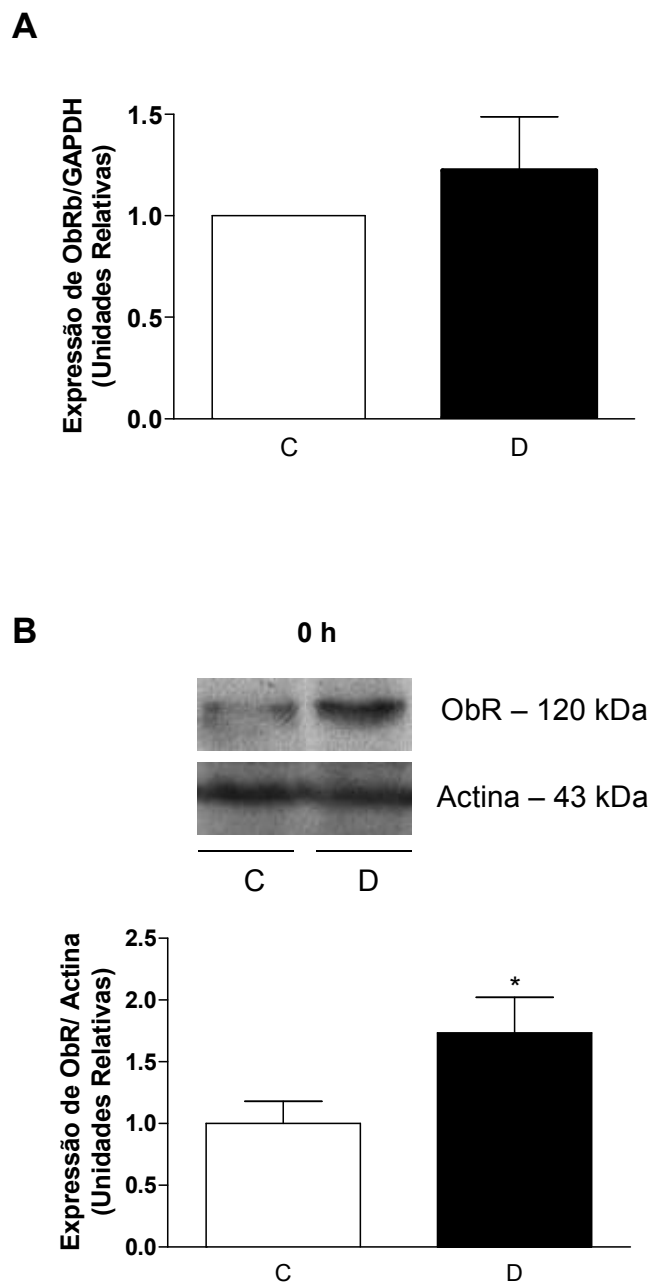


Figura 10 - Expressão do receptor de leptina (ObR) em timócitos isolados dos animais dos grupos C e D. (A) Timócitos ( $1,0 \times 10^7$  cél/ml) foram isolados dos animais C e D e o RNAm foi extraído e analisado por PCR em tempo real para expressão de ObRb e normalizado pela expressão de GAPDH. (B)  $5,0 \times 10^6$  cél/ml foram lisadas em tampão de lise e o extrato total foi submetido a SDS-PAGE e o Western Blotting realizado para a expressão de ObR e actina conforme descrito em Material e Métodos. A quantificação das bandas é expressa em unidades relativas. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle.

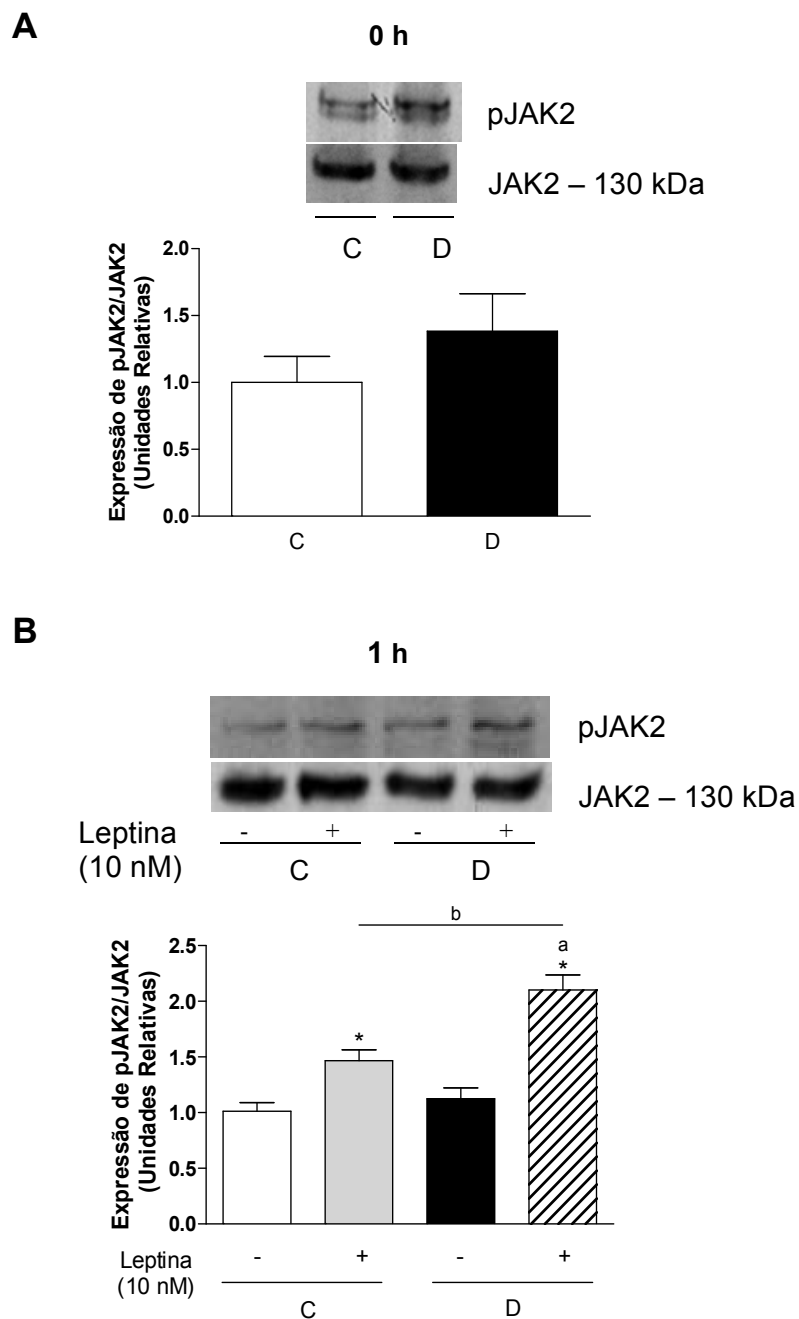


Figura 11 - Fosforilação de JAK2 em timócitos isolados dos animais dos grupos C e D. Timócitos ( $5,0 \times 10^6$  cél/ml) foram incubados com leptina (10 nM) durante uma hora a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . O extrato total de proteínas e o Western Blotting para a expressão de pJAK2 e JAK2 foram realizados conforme descrito em Material e Métodos. A quantificação das bandas é expressa em unidades relativas. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle não estimulado; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo D não estimulado e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo C+Leptina.

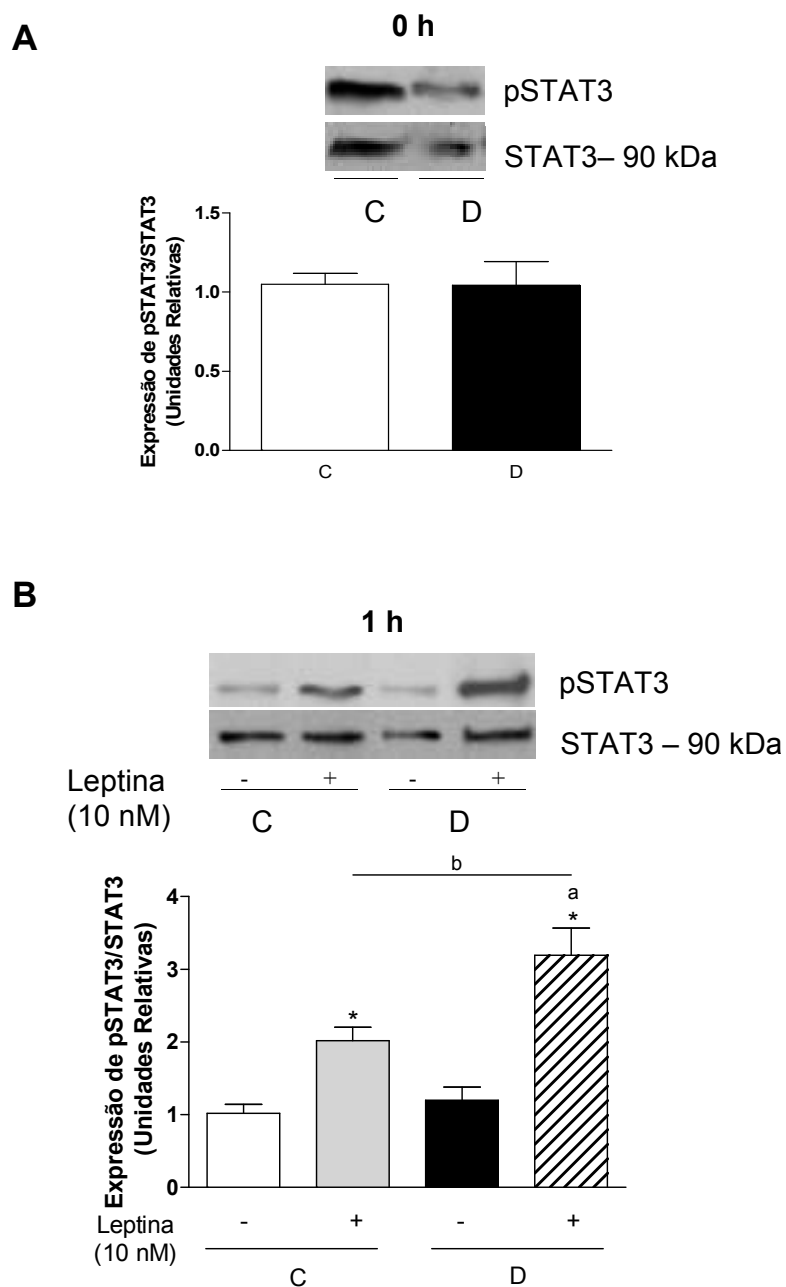


Figura 12 - Fosforilação de STAT3 em timócitos isolados dos animais dos grupos C e D. Timócitos ( $5,0 \times 10^6$  cél/ml) foram incubados com leptina (10 nM) durante uma hora a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . O extrato total e o Western Blotting para a expressão de pSTAT3 e STAT3 foram realizados conforme descrito em Material e Métodos. A quantificação das bandas é expressa em unidades relativas. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle não estimulado; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo D não estimulado e <sup>b</sup>  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo C+Leptina

#### 5.4 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a expressão dos genes *ob* e *db* no microambiente tímico

Já foi observado que outros tipos celulares, além de linfócitos, são capazes de secretar leptina (Lam & Lu, 2007). Visto que os níveis de leptina circulante são similares entre os grupo C e D (30 dias), nós avaliamos a expressão dos genes *ob* (leptina) e *db* (receptor) no microambiente tímico isolado destes animais.

De forma interessante, mostramos que o microambiente tímico do grupo D apresenta um grande aumento nos níveis do RNAm para o gene *ob* (aproximadamente 9 vezes) quando comparado ao grupo C. Contudo, nenhuma diferença foi observada nos níveis de RNAm para o gene *db*.

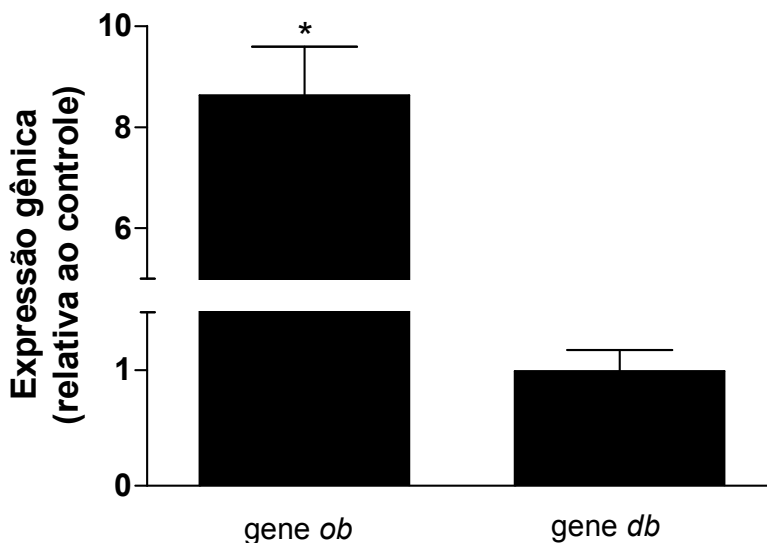


Figura 13 - Expressão dos genes *ob* e *db* no microambiente tímico. Os timos foram macerados em peneira e o microambiente retido foi utilizado para a análise da expressão dos genes *ob* (Leptina) e *db* (receptor) por RT-PCR conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados indicam o aumento da expressão gênica do grupo desnutrido em relação ao grupo controle. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo; \*  $p < 0,05$ .



### 5.5 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a maturação de timócitos isolados da prole jovem

Para determinar se a privação protéica materna durante a lactação afeta a maturação de timócitos da prole jovem, avaliamos a expressão dos marcadores CD4 e CD8 na superfície dessas células.

Conforme demonstrado na **Figura 14**, observamos uma proporção similar dos subtipos de timócitos entre os grupos controle e desnutrido. A maioria das células tímicas de ambos os grupos é duplo-positiva,  $CD4^+CD8^+$ . As células maduras simples-positivas ( $CD8^+$  ou  $CD4^+$ ) e a população duplo-negativa ( $CD4^-CD8^-$ ), que representa o fenótipo mais imaturo, constituem juntas, aproximadamente apenas 20 % da população total.

Vimos também, que a incubação com leptina (10 nM) por 24 horas não alterou este perfil.

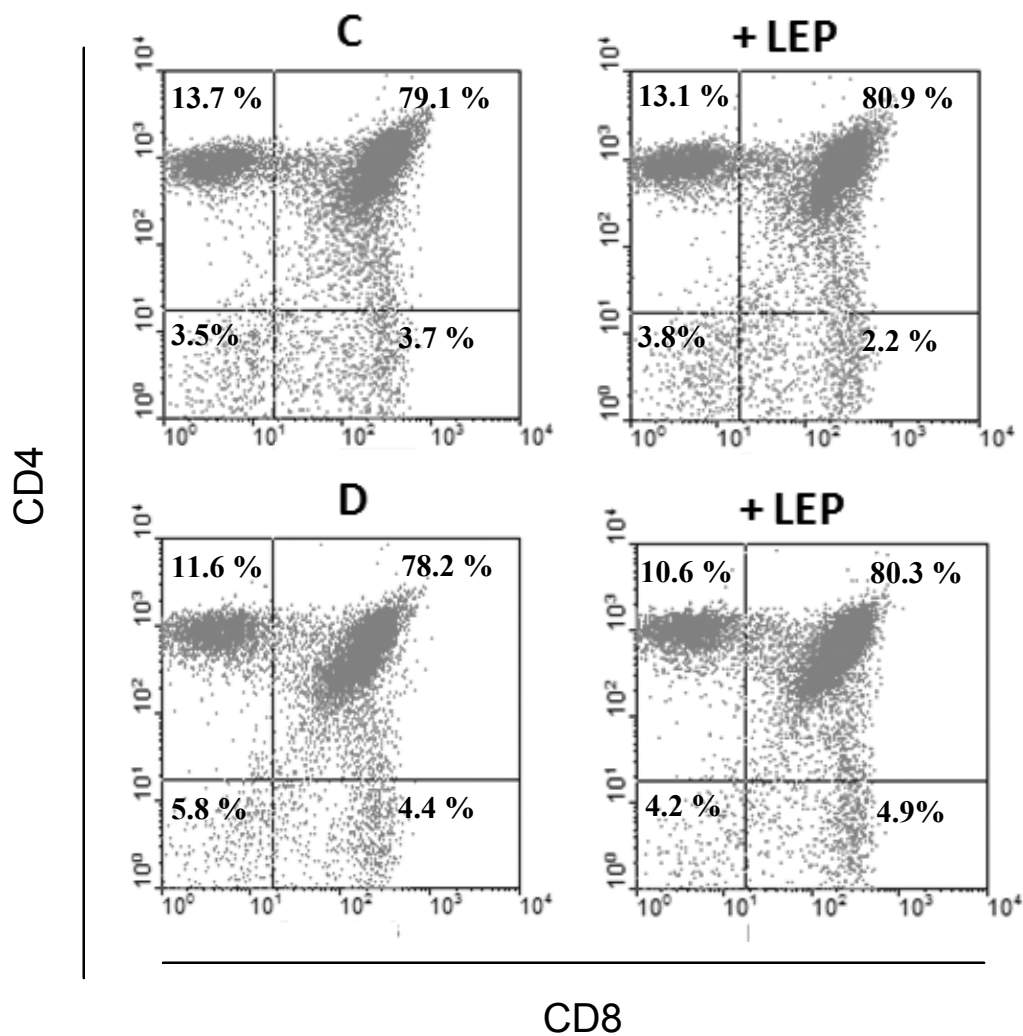


Figura 14 - Perfil dos subtipos de timócitos isolados de animais C e D. Timócitos ( $1,5 \times 10^6$  cél/ml) foram incubados na ausência ou presença de leptina (10 nM) por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . A expressão das moléculas de superfície CD4 e CD8 foi avaliada por citometria de fluxo. Os números dentro dos quadrantes representam a proporção de células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (duplo-positivas), CD4<sup>+</sup> Simples-positiva, CD8<sup>+</sup> Simples-positiva e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (duplo-negativas). A figura representa a análise por citometria de fluxo de um experimento representativo. N= 6 animais por grupo.

## 5.6 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a apoptose espontânea de timócitos isolados da prole jovem

Muitos estudos demonstraram que a leptina possui um potente efeito antiapoptótico nas células tímicas através da regulação positiva de vias de sobrevivência (Fujita *et al.*, 2002; Najib & Sanchez-Margalet, 2002; Mansour *et al.*, 2006).

A apoptose dos timócitos foi avaliada mensurando-se a exposição de fosfatidilserina nas membranas plasmáticas por citometria de fluxo. Como demonstrado na **Figura 15A**, timócitos isolados de animais D, quando comparados ao grupo C, apresentam uma diminuição significativa na apoptose espontânea após 24 horas de incubação em meio RPMI suplementado com 10 % de FBS, conforme revelado pela marcação positiva para anexina V. Além disso, a incubação com leptina ( $10^{-8}$  M) protegeu claramente os timócitos da apoptose em ambos os grupos.

A **Figura 15B** mostra que na ausência de soro, as células de ambos os grupos encontram-se em apoptose mesmo após a incubação com leptina.

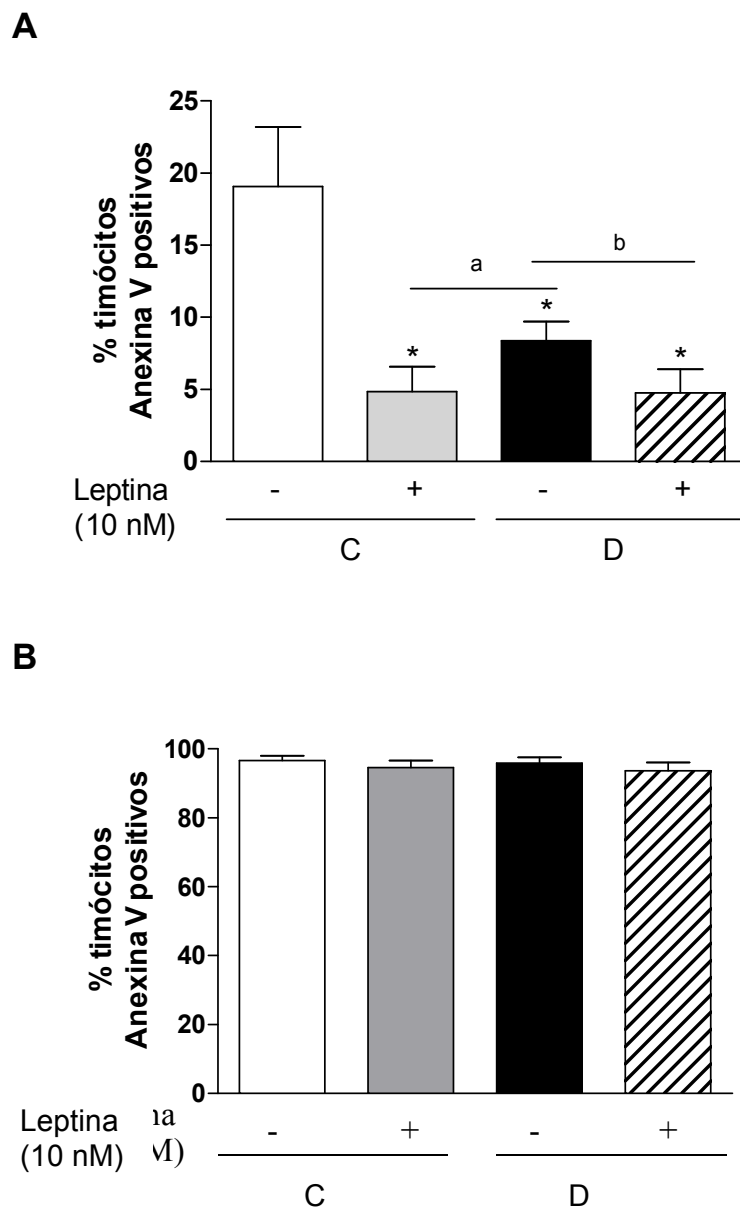


Figura 15 - Apoptose de timócitos isolados de animais C e D. Timócitos ( $1,0 \times 10^6$  cél/ml) foram incubados em meio RPMI suplementado (A) ou não (B) com 10 % de FBS na ausência ou presença de leptina (10 nM) por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . A apoptose de timócitos foi avaliada através da expressão de anexina V por citometria de fluxo. O resultado representa a média  $\pm$  EPM de 3-6 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo C não estimulado; <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo C + Lep; <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo D não estimulado.

### 5.7 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a viabilidade de timócitos isolados da prole jovem

Para confirmar os dados anteriores, timócitos isolados de animais C e D foram incubados em meio RPMI suplementado com 10 % de FBS a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> por 24 e 48 horas. Após estes tempos, avaliamos a viabilidade das células por exclusão por azul de tripan. Utilizamos a dexametasona (1 µM) como controle positivo.

Nossos dados mostram que em 24 horas de incubação, a viabilidade dos timócitos foi similar entre os grupos mesmo após a incubação com leptina, mantendo-se em torno de 60 % (**Figura 16A**).

Após 48 horas, observamos uma diminuição da viabilidade celular em todos os grupos avaliados. A incubação com leptina por este período prolonga a sobrevivência do timócitos isolados do grupo controle, entretanto, não interfere na viabilidade do grupo D. Entretanto, as células do grupo D apresentam uma maior viabilidade na ausência de estímulo (aproximadamente 50 %) (**Figura 16B**).

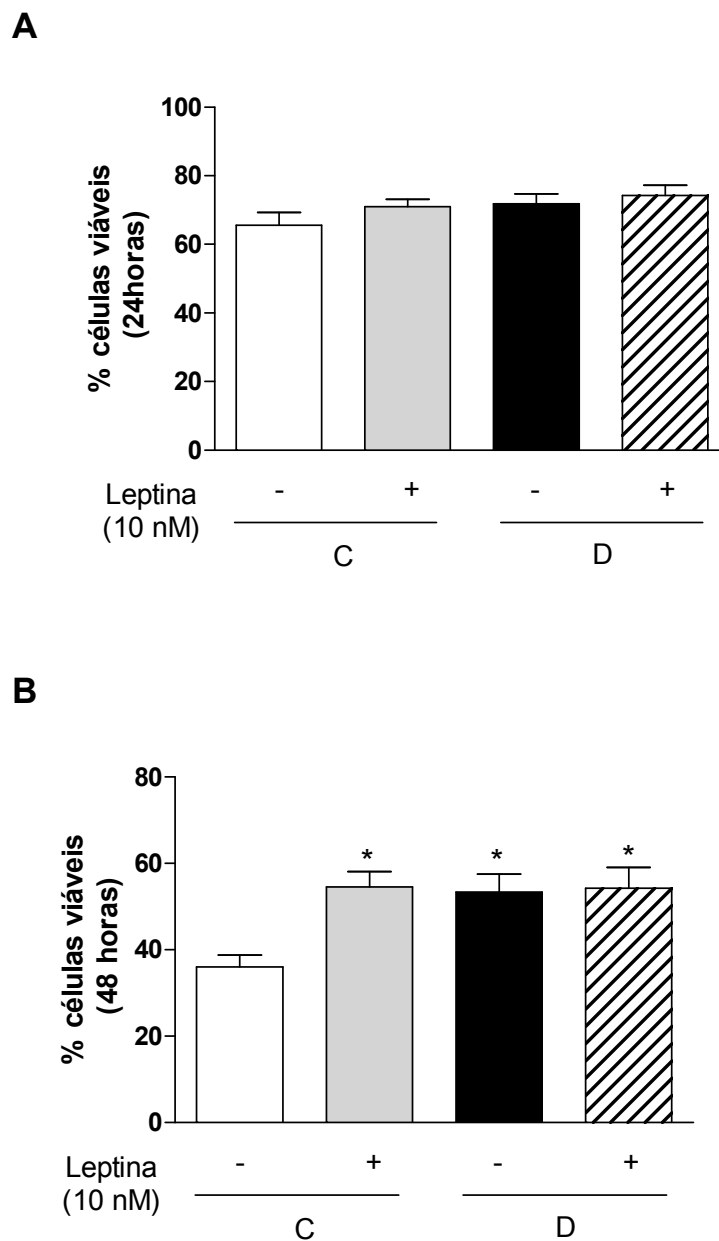


Figura 16 - Viabilidade dos timócitos isolados de animais C e D. Timócitos ( $1,0 \times 10^6$  cél/ml) isolados de animais C e D foram incubados na presença ou ausência de leptina ( $10^{-8}$  M) em meio RPMI suplementado com 10 % de FBS a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  por 24 (A) ou 48 horas (B). A viabilidade celular foi avaliada por exclusão por azul de tripan (1:20) através de microscopia óptica (40 X em câmara de Neubauer). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6-10 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo C não estimulado.

### 5.8 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a proliferação de timócitos isolados da prole jovem

Como a maior taxa de sobrevivência observada nos timócitos do grupo D poderia estar relacionada a um aumento da proliferação destas células, analisamos a resposta proliferativa.

Para isso, timócitos isolados do grupo C e D foram incubados com Concanavalina A (ConA - 2  $\mu\text{g/mL}$ ), um potente agente mitogênico e/ou leptina (10 nM) por 24 e 48 horas. A incorporação de [ $\text{H}^3$ ] -timidina ao DNA refletiu a proliferação celular.

Conforme demonstrado na **figura 17**, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos, seja em condições basais ou após a incubação com leptina.

Como esperado, a estimulação dos timócitos com o mitógeno ConA por 24 e 48 horas induziu um aumento significativo e similar na proliferação em ambos os grupos. A incubação simultânea com leptina não alterou a capacidade proliferativa induzida pela ConA em nenhum dos grupos.

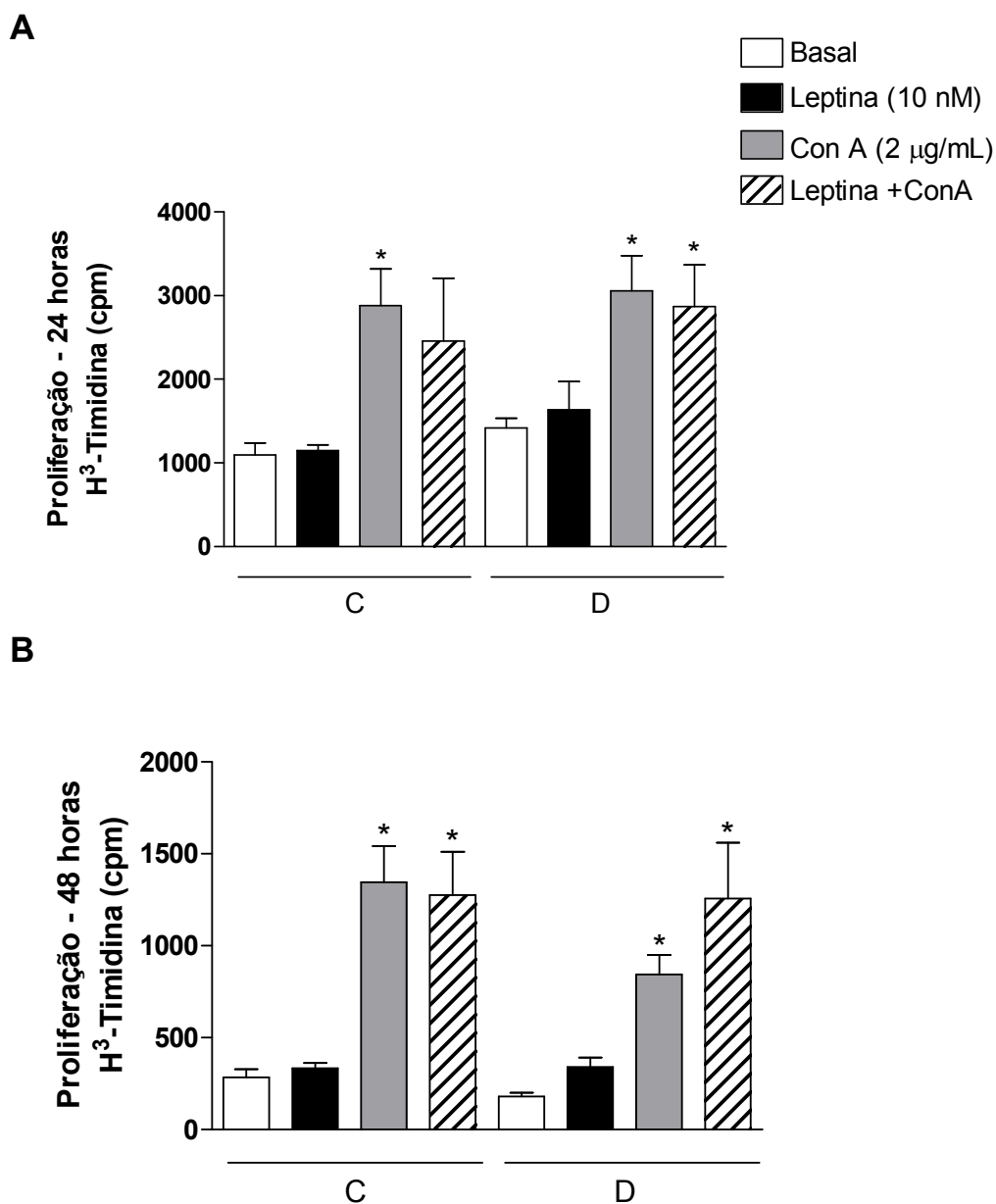


Figura 17 - Proliferação de timócitos isolados de animais C e D. Timócitos ( $2,0 \times 10^5$  cél/poço) foram incubados com ConA ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) e/ou leptina ( $10 \text{ nM}$ ) durante 24 (A) ou 48 horas (B) a  $37^\circ\text{C}$ ;  $5\% \text{ CO}_2$ . Nas últimas 6 horas de incubação, adicionou-se [ $^3\text{H}$ ]-Timidina ( $1 \mu\text{Ci/poço}$ ) a cultura. Após lavagem, as células foram recolhidas sobre filtros de papel e contadas no contador de cintilação. Os resultados são expressos em CPM (cintilação por minuto). Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo; \*  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo controle não estimulado.



### 5.9 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a via da IRS1-PI3K em timócitos isolados da prole jovem

Sabendo-se que a AKT é um componente importante da via de sinalização intracelular envolvido na regulação da sobrevivência e apoptose e que dados da literatura demonstram um papel da leptina na proteção dos timócitos da apoptose através da ativação da via da IRS-1-PI3K (Mansour *et al.*, 2006), nosso próximo passo foi determinar se a diminuição na apoptose observada em timócitos dos animais desnutridos estaria relacionada a alterações nesta via.

Entretanto, não observamos diferenças significativas na ativação de IRS-1 e AKT entre os grupos C e D, em condições basais (**Figura 18**).

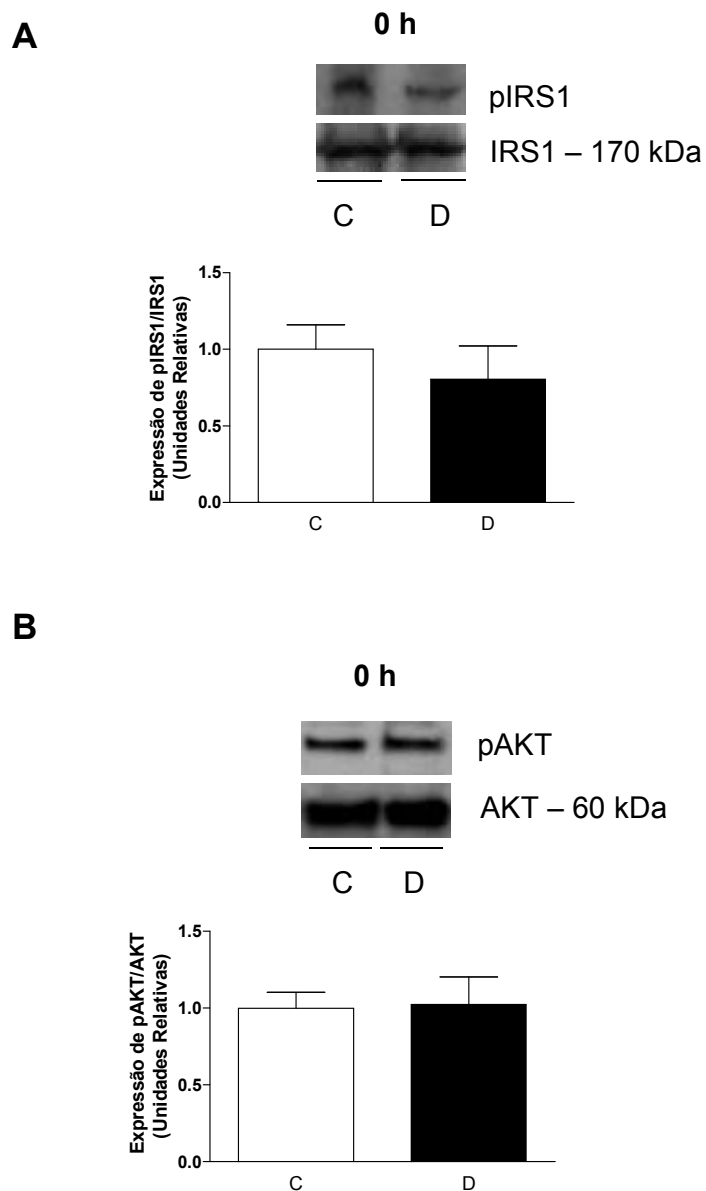


Figura 18 - Fosforilação de IRS1 e AKT em timócitos isolados de animais C e D. O extrato total obtido de timócitos ( $5,0 \times 10^6$  cél/ml) foi submetido a SDS-PAGE e o Western Blotting realizado para a expressão de pIRS1, IRS1, pAKT e AKT conforme descrito em Material e Métodos. A quantificação das bandas é expressa em unidades relativas. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 5-10 animais por grupo.

### 5.10 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a expressão de proteínas pró- e antiapoptóticas em timócitos isolados da prole jovem

Para investigar se a diminuição da apoptose observada em timócitos do grupo desnutrido estava relacionada com alterações no balanço entre as proteínas pró e antiapoptóticas, nós avaliamos a expressão das proteínas anti-apoptótica Bcl-2 e próapoptóticas Bad, Bax e Pró-Caspase-3. Como demonstrado na **Figura 19**, após 24 horas de incubação, os níveis de Bcl-2 estão aumentados nos animais D (aproximadamente 100 %), já os níveis de Bax encontram-se diminuídos (aproximadamente 57 %) (**Figura 20**). Nenhuma alteração significativa foi observada na expressão de Bad (**Figura 21**) entre os grupos. Além disso, encontramos também uma maior expressão de Pró-caspase-3 (**Figura 22**) no grupo D (aproximadamente 93 %), demonstrando que esta proteína está predominantemente na sua forma inativa.

O estímulo da leptina por 24 horas alterou o balanço entre as proteínas pró- e antiapoptóticas, aumentando significativamente a expressão de Bcl-2 e diminuindo os níveis de Bax no grupo controle. No entanto, nenhuma alteração significativa foi observada no conteúdo destas proteínas nas células do grupo desnutrido após o estímulo. Além disso, a leptina induziu um aumento de Pró-caspase-3 apenas no grupo desnutrido.





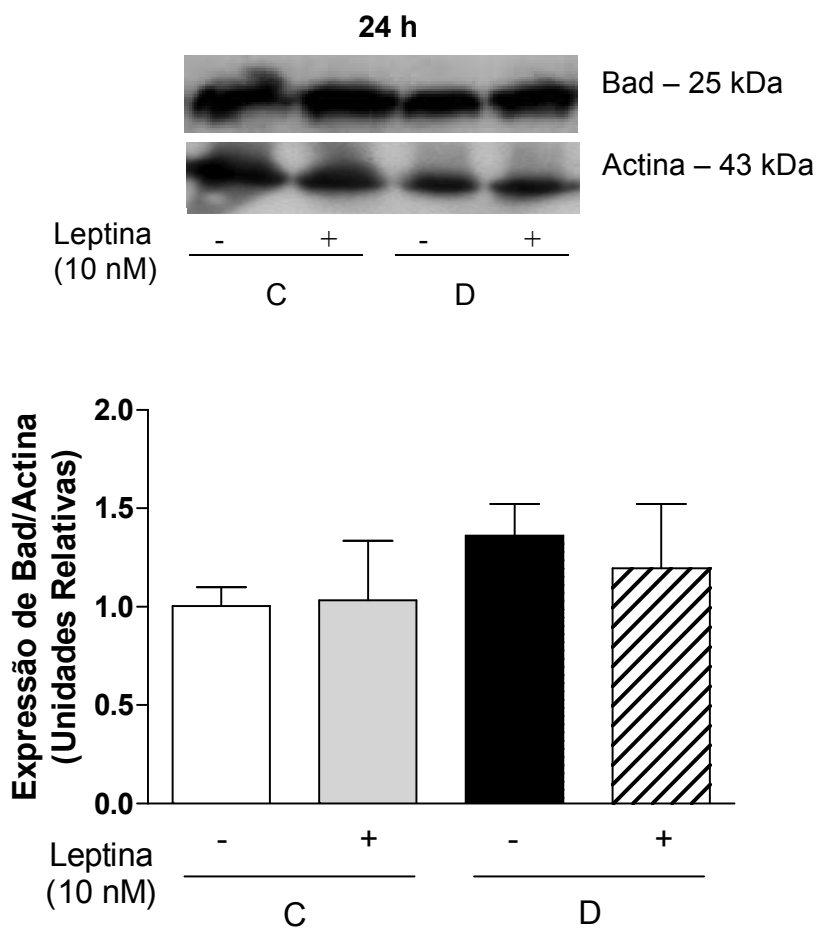


Figura 21 - Expressão de Bad em timócitos isolados de animais C e D. Timócitos ( $5,0 \times 10^6$  células/ml) foram incubados com leptina (10 nM) durante 24 horas a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. O extrato total e o Western Blotting para a expressão de Bad e Actina foram realizados conforme descrito em Material e Métodos. A quantificação das bandas é expressa em unidades relativas. Os valores representam a média  $\pm$  EPM 6 animais por grupo.

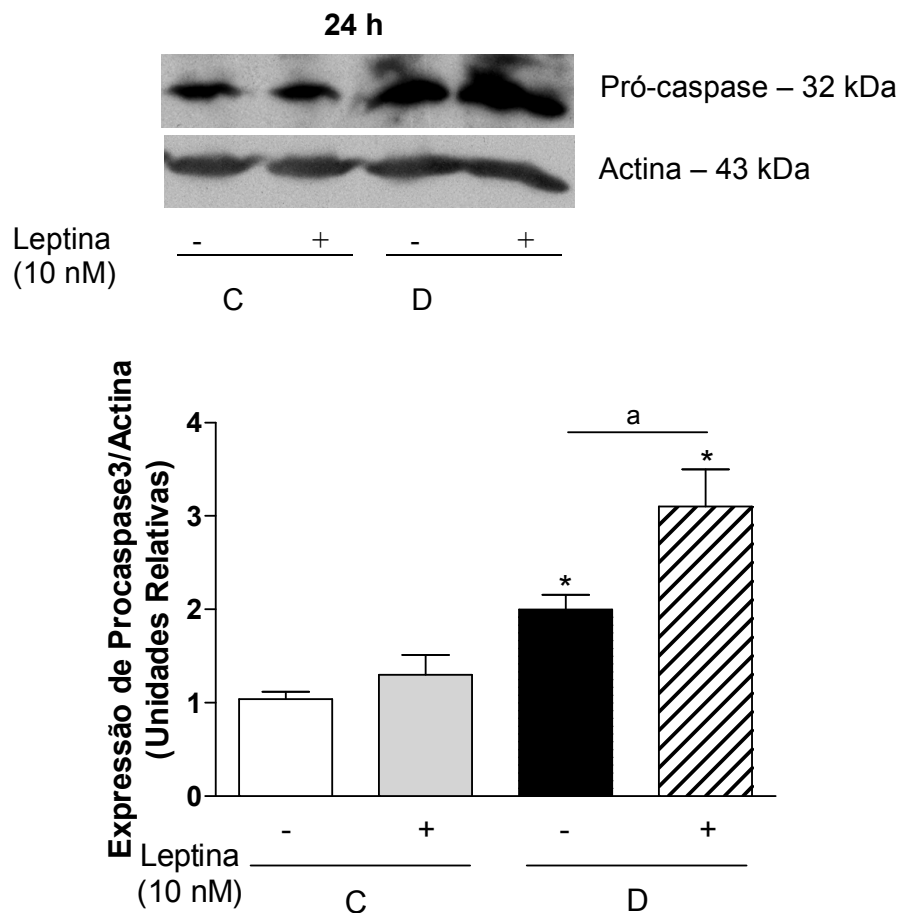


Figura 22 - Expressão de Pró-Caspase-3 em timócitos isolados de animais C e D. Timócitos ( $5,0 \times 10^6$  cél/ml) foram incubados com leptina (10 nM) durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . O extrato total e o Western Blotting para a expressão de Pró-Caspase-3 e Actina foram realizados conforme descrito em Material e Métodos. A quantificação das bandas é expressa em unidades relativas. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo; \*  $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle não estimulado; <sup>a</sup>  $p < 0,05$  quando comparados ao grupo desnutrido não estimulado.

### 5.11 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a ativação de NFκB em timócitos isolados da prole jovem

Sabe-se que o NFκB é um fator de transcrição envolvido na sobrevivência de inúmeros tipos celulares, dentre eles, células T (Kane *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2004). Portanto, analisamos o efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a ativação de NFκB nos timócitos da prole jovem. Para isso, o conteúdo nuclear da subunidade p65 do NFκB foi determinado por Western Blotting.

Conforme observado na **Figura 23 A**, mostramos que após 24 horas de incubação, mesmo na ausência de estímulo, os timócitos isolados de animais desnutridos apresentam um aumento de cerca de 50 % do conteúdo nuclear de NFκB, quando comparados ao grupo controle. Este evento é acompanhado por uma diminuição de IκB no citoplasma (**Figura 23 B**). A incubação com leptina por 24 horas não foi capaz de alterar os níveis de expressão destas proteínas em nenhum dos grupos.





### 5.12 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre os níveis séricos de corticosterona da prole jovem

Conforme mencionado anteriormente, tem sido descrito que em alguns estados de desnutrição, o desbalanço entre a produção de leptina e glicocorticóides é, pelo menos parcialmente, responsável pelas alterações tímicas encontradas (Savino, 2002).

Entretanto, o modelo de restrição protéica materna durante a lactação utilizado neste trabalho não altera os níveis circulantes de corticosterona da prole jovem.

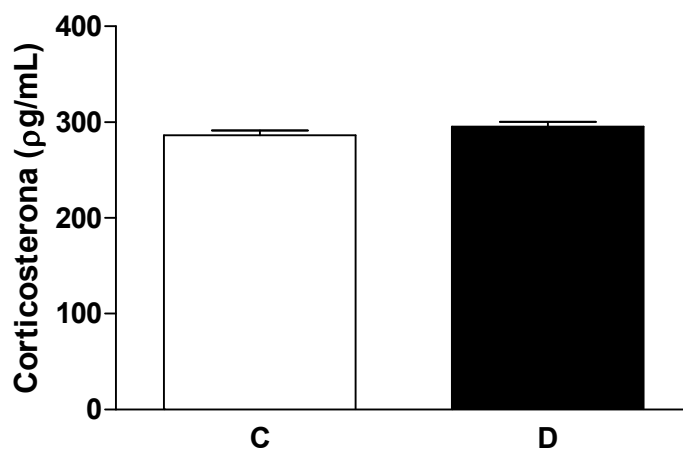


Figura 24 - Níveis séricos de corticosterona dos animais dos grupos C e D. Animais em jejum foram anestesiados com quetamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O soro foi utilizado na dosagem de corticosterona por EIA conforme descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam média  $\pm$  EPM de 10 animais por grupo.

### 5.13 Efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre a translocação nuclear do receptor de glicocorticóides em timócitos isolados da prole jovem

Finalmente, avaliamos a translocação do GR para o núcleo em timócitos isolados dos grupos C e D.

Conforme demonstrado na **figura 25**, a restrição protéica materna durante a lactação não afetou a translocação do receptor de glicocorticóide para o núcleo em condições basais ou após 24 horas de incubação. Além disso, não observamos alterações na ativação do GR após a incubação com leptina em nenhum dos grupos.

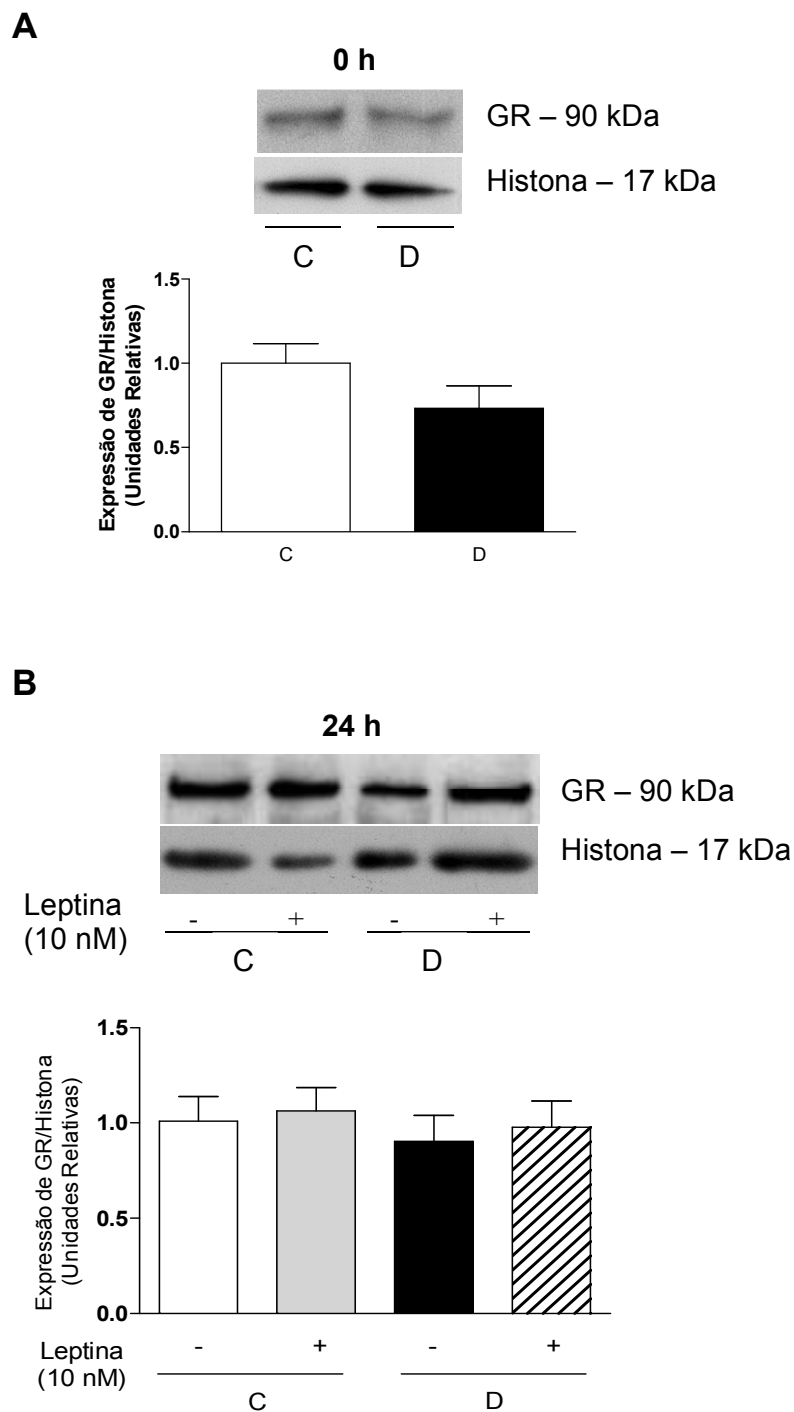


Figura 25 - Expressão de GR no núcleo de timócitos isolados de animais dos grupos C e D. Timócitos ( $5,0 \times 10^6$  cél/ml) foram incubados com leptina (10 nM) durante 24 horas a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. O extrato nuclear e o Western Blotting para a expressão de GR e Histona foram realizados conforme descrito em Material e Métodos. A quantificação das bandas é expressa em unidades relativas. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo.

## 6 DISCUSSÃO

É consensual na literatura que fatores ambientais no início da vida têm uma influência fundamental para o risco de desenvolvimento de doenças na fase adulta (Lucas, 1998; Waterland e Garza, 1999).

Esta programação fisiológica tem sido estudada em uma variedade de sistemas e reflete a ação de mecanismos específicos exercidos durante um determinado período do desenvolvimento, que podem causar efeitos persistentes e afetar a estrutura e a fisiologia de diversos órgãos e tecidos (Tamashiro & Moran, 2010). Estes mecanismos modulam as adaptações ocorridas para maximizar as chances de sobrevivência do indivíduo em condições adversas, tais como: a oferta diminuída ou aumentada de nutrientes, o estresse, entre outros. Entretanto, estas respostas podem ser deletérias se uma mudança inesperada ocorrer em um ambiente futuro (Seckl, 1998; Petry *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de modelos experimentais de restrição nutricional em animais é de grande importância para a elucidação deste processo e para o entendimento de suas consequências sobre diversos sistemas, sobretudo o sistema imune, tendo em vista que todas as formas de imunidade podem ser afetadas durante a desnutrição, ocasionando um aumento na suscetibilidade a infecções (Chandra, 1974; Keusch *et al.*, 1987, Rodríguez *et al.*, 2005; Savino *et al.*, 2007; Cortés-Barberena *et al.*, 2008). Porém, as defesas não específicas e a imunidade mediada por células são ainda mais severamente afetadas do que a imunidade humoral (Calder & Jackson, 2000).

Neste contexto, o timo se destaca por ser um órgão profundamente afetado durante a desnutrição (Savino, 2002), refletindo em prejuízos permanentes na imunidade celular (Sellmeyer *et al.*, 1972; Chandra, 1974; Cortés-Barberena *et al.*, 2008) devido às suas funções no desenvolvimento, maturação, diferenciação e expansão clonal de células T (Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2007; Savino *et al.*, 2007).

Desta forma, no presente estudo, investigamos os efeitos da programação metabólica induzida pela restrição protéica materna durante a lactação sobre a resposta de timócitos, na prole jovem.

Inicialmente, avaliamos o peso corporal destes animais, tendo em vista que diversos trabalhos demonstram que alterações nutricionais durante a gestação e/ou

lactação induzem uma restrição do crescimento (Moura *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 2002; Barja-Fidalgo *et al.*, 2003; Sampaio de Freitas *et al.*, 2003; Garcia-Souza *et al.*, 2008). Nossos resultados corroboram com estes autores, tendo em vista a redução de cerca de 40 % do peso corporal do grupo D. Utilizando este mesmo modelo experimental, Teixeira e colaboradores (2002) demonstraram uma redução no peso corporal dos animais do grupo D já nos primeiros dias de vida e esta redução foi mantida até os seis meses. É importante ressaltar que o baixo peso corporal durante o desenvolvimento é frequentemente associado a um aumento na suscetibilidade ao aparecimento de desordens metabólicas durante a vida adulta (Godfrey & Barker, 2001; Fernandez-Twinn & Ozanne, 2010).

A atrofia linfóide é reconhecidamente uma consequência da desnutrição tanto em seres humanos como em animais (Faulk, 1976; Good *et al.*, 1982; Prentice, 1999; Yajima *et al.*, 2007). Particularmente, o timo é profundamente afetado com respeito ao tamanho, peso, composição celular e estrutura (Kuvibidila *et al.*, 1990; Pallaro *et al.*, 2001; Savino *et al.*, 2007). Nossos resultados mostraram que, embora os timos dos ratos do grupo D sejam significativamente menores que os dos controle, este efeito parece ser consequência da restrição do crescimento dos animais, visto que a perda de peso do timo é proporcional à perda de peso corporal. Além disso, o número de timócitos por miligrama de tecido foi similar entre os grupos.

Portanto, ao contrário do que esperávamos, o modelo de restrição protéica materna utilizado não parece causar alterações severas no tamanho do timo ou no número total de timócitos da prole, sugerindo que alguns fatores poderiam estar envolvidos na proteção deste órgão.

Sabe-se que a desnutrição e/ou o estresse nutricional durante períodos críticos do desenvolvimento são acompanhados por mudanças metabólicas e endócrinas significativas no metabolismo da glicose, insulina, glicocorticóides e leptina, que podem contribuir de forma potencial para alterações no sistema imune (Waterland & Garza, 2002; Sampaio de Freitas *et al.*, 2003; Barja-fidalgo *et al.*, 2003; Garcia-souza *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2010)

Estudos têm sugerido a leptina como um potencial candidato às alterações observadas na resposta imune durante quadros de desnutrição. De acordo com estes estudos, a leptina (agindo como uma citocina) é capaz de modular, por exemplo, a homeostase do timo, aumentando o número de timócitos e inibindo a

apoptose destas células (Lord *et al.*, 1998; Mansour *et al.*, 2006; Savino *et al.*, 2007; Velloso *et al.*, 2009). A partir destes estudos, investigamos o efeito da restrição protéica materna durante a lactação sobre os níveis de leptina da prole jovem.

Corroborando com outro grupo (Teixeira *et al.*, 2002), mostramos que a restrição protéica materna durante a lactação induz um aumento da secreção de leptina na prole aos 21 dias de vida. Entretanto, em animais com 30 dias, idade utilizada neste estudo, não observamos diferenças nos níveis séricos desta adipocina entre os grupos C e D.

Sabe-se que a leptina pode ser transferida aos filhotes através do leite (Casabiell *et al.*, 1997) e, já foi observado, utilizando - se o mesmo modelo de restrição protéica adotado em nosso estudo, que as fêmeas lactantes do grupo D apresentam hiperleptinemia no último dia de lactação (21º dia) (Lisboa *et al.*, 2006). Estes dados justificam a oscilação nos níveis de leptina da prole.

Alterações nutricionais durante o desenvolvimento podem afetar a sensibilidade à leptina (Unger, 2002; Krechowec *et al.*, 2006). Foi demonstrado em ratos superalimentados durante as fases iniciais da vida pós-natal um estado de resistência à leptina mediada pela diminuição da expressão do receptor, ObRb (Myers, 2004; López *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, timócitos isolados de animais do grupo D não apresentam alterações no RNAm para ObRb, porém, apresentam uma maior expressão protéica deste receptor quando comparados ao controle, indicando a existência de um mecanismo de regulação pós-transcricional. Neste modelo também já foi observado um aumento na expressão deste receptor na pituitária (Vicente *et al.*, 2004). Esses resultados sugerem que estes animais podem ter um aumento na resposta celular à leptina.

Desta maneira, avaliamos a via de sinalização clássica mediada pela leptina (JAK2/STAT3) em timócitos isolados do grupo D e observamos que em condições basais não há diferenças significativas na ativação de JAK2 e STAT3 entre os grupos C e D. Como esperado, a incubação (*in vitro*) com leptina induziu a ativação desta via de sinalização em ambos os grupos, porém, essa ativação foi mais expressiva no grupo desnutrido. Desta forma, é possível especular que os timócitos dos animais D tenham um aumento na sensibilidade à leptina. Este efeito poderia ser consequência do aumento da expressão de ObRb nestas células.

O microambiente tímico também pode ser afetado nos estados de desnutrição severa (Mittal & Woodward, 1985; Savino & Dardenne, 2000; Savino, 2002), sendo descritas alterações na produção de hormônios pelas células que compõem este compartimento (Mittal *et al.*, 1988; Jambon *et al.*, 1988; Chandra, 1992; McDade *et al.*, 2001).

Como previamente revisado (Savino & Dardenne, 2000), muitos hormônios peptídicos, classicamente conhecidos por serem produzidos por glândulas endócrinas, são também produzidos no timo. Recentemente, foi mostrado que o timo contém depósitos de adipócitos capazes de produzir leptina, que pode atuar no microambiente para modular respostas celulares (Yang *et al.*, 2009; Youm *et al.*, 2009).

Além disso, estudos preliminares de Lacerda e Savino (dados não publicados) sugerem uma expressão constitutiva do gene *ob* (leptina) no epitélio tímico humano (*apud* Velloso *et al.*, 2009). Em nosso modelo, observamos que, apesar dos níveis similares de leptina circulante, o grupo D apresenta um aumento significativo da expressão do RNAm para o gene *ob* no microambiente tímico. Assim, é possível que, além de agir sobre o timo através de um circuito endócrino, esta adipocina atue de modo autócrino e/ou parácrino sobre este órgão (Velloso *et al.*, 2009). Portanto, a leptina, produzida por células do microambiente tímico do grupo D em grande quantidade, poderia atuar nos timócitos destes animais que, além de apresentarem um aumento do receptor, apresentam uma maior resposta a essa citocina. Esses eventos combinados poderiam contribuir positivamente para a homeostase tímica. Esta hipótese representa um ponto interessante que necessita de maiores investigações.

Os timócitos são caracterizados pela expressão de moléculas de superfície celular que determinam o seu estágio de maturação, sendo as moléculas CD4 e CD8 consideradas as mais importantes (Starr *et al.*, 2003; Savino & Dardenne, 2010).

A depleção de timócitos é característica em modelos experimentais de restrição protéica aguda ou crônica e ocorre principalmente devido à perda das células do fenótipo imaturo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Savino, 2002). Neste trabalho, não observamos alterações na proporção de subpopulações entre os grupos estudados. Este perfil está de acordo com estudos anteriores, onde a maioria dos timócitos (cerca de 80 %) é CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> e o restante são células maduras simples-positivas



(CD4<sup>+</sup> SP ou CD8<sup>+</sup> SP) e a população duplo-negativa (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), que representa a população mais imatura, proveniente da medula óssea (Savino *et al.*, 2007; Gruver & Sempowsk, 2008).

Tem sido postulado que a leptina pode afetar significativamente a diferenciação de células T imaturas, induzindo um fenótipo mais maduro (Hick *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2006; Singer *et al.*, 2008). Em nossos resultados, apesar do aumento do gene *ob* no microambiente tímico, não observamos alterações no número de timócitos maduros (CD4 ou CD8) no grupo D, em condições basais. Estudos anteriores mostraram que os efeitos da leptina sobre a timopoiese são limitados a certas condições, como: camundongos deficientes de leptina ou com atrofia tímica induzida por LPS. Em condições normais não foi observado nenhum efeito da leptina (Hick *et al.*, 2006; Kim *et al.* 2010).

Nossos resultados demonstram ainda que o tratamento com leptina também não afetou a população de timócitos em nenhum dos grupos estudados. Tal fato pode ser explicado pela ausência das células do microambiente tímico durante nossos experimentos *in vitro*, visto que a interação destas células com os timócitos em desenvolvimento é crucial para que a timopoiese ocorra (Nitta *et al.*, 2008; Boehm, 2008).

Em um estudo recente, Kim e colaboradores (2010) mostraram que a incubação de timócitos com leptina (na ausência do microambiente tímico) foi incapaz de induzir a diferenciação de células DP em CD4 ou CD8 SP. Por outro lado, quando as células foram incubadas com leptina na presença de células do estroma tímico, os timócitos DP foram diferenciados principalmente em CD4 SP.

Outro estudo demonstrou que a deficiência de ObR nos timócitos não afeta o seu desenvolvimento. No entanto, a ausência do receptor de leptina nas células do estroma tímico prejudica a maturação dos timócitos (Palmer *et al.*, 2006). Além disso, dados recentes de Gruver e colaboradores (2009) mostraram que a leptina promove a timopoiese através da indução de IL-7 (um importante fator de crescimento de timócitos) pelas células epiteliais tímicas.

Com base nesses dados, acreditamos que, em nossos experimentos, a ausência de alterações na proporção de timócitos, mesmo na presença de leptina, se deva ao fato desta adipocina agir diretamente sobre as células epiteliais tímicas, promovendo a produção de fatores que induzem a diferenciação de timócitos, entretanto, esta hipótese precisa ser melhor elucidada.

A geração do repertório de células T no timo é um processo biológico complexo que compreende proliferação, diferenciação, apoptose e seleção, culminando em diferentes linhagens (Abbas *et al.*, 2003).

Sabe-se que a involução tímica relacionada à desnutrição resulta do aumento da morte das células tímicas em conjunto com o decréscimo da proliferação de células T e alterações no microambiente tímico (Lyra *et al.*, 1993; Poetschke *et al.*, 2000; Savino, 2002).

Em nosso estudo, a restrição protéica materna durante a lactação parece proteger os timócitos da morte, induzindo uma menor taxa de apoptose espontânea, sem causar alterações na resposta proliferativa.

Vários autores já demonstraram que a leptina atua, em particular, inibindo diretamente a apoptose de timócitos *in vivo* e *in vitro* (Howard *et al.*, 1999; Matarese *et al.*, 2005; Mansour *et al.*, 2006; Savino *et al.*, 2007). Nossos dados estão de acordo com esses achados, visto que após a incubação com leptina, os timócitos foram claramente protegidos da apoptose.

Dadas as similaridades entre os grupos C e D em relação à ativação de JAK2 e STAT3 em condições basais, sugerimos que os efeitos deste hormônio/citocina em suprimir a apoptose no grupo D não envolvem esta via clássica de sinalização. Nossos dados são consistentes com outros trabalhos (Mansour *et al.*, 2006; Jiang & Rui, 2008) que mostraram que, em roedores, a capacidade da leptina de inibir a apoptose de timócitos se dá de modo dependente do ObRb, porém, independente da ativação de JAK2. Na verdade, nenhum estudo ainda forneceu evidências conclusivas do requerimento da via de sinalização JAK/STAT na inibição da apoptose pela leptina neste tipo celular. Segundo Dunn e colaboradores (2005), através desta via a leptina regularia o *feedback* negativo do sinal e não a apoptose tímica.

Mansour e colaboradores (2006) demonstraram que a inibição da proteína IRS1 ou da via da PI3 quinase, suprimiria parcialmente os efeitos antiapoptóticos da leptina sobre os timócitos. Em vários tipos celulares, a leptina é capaz de induzir a fosforilação de IRS1 em tirosina, porém a quinase responsável por tal evento ainda é desconhecida (Niswender & Schwartz, 2003; Hegyi *et al.*, 2004).

Nós consideramos a possibilidade desta via estar mediando os efeitos protetores da leptina observados em timócitos do grupo D. Entretanto, não encontramos diferenças no conteúdo basal de pAKT ou pIRS1. Investigações

adicionais devem ser realizadas para entender os mecanismos envolvidos neste efeito.

Outra hipótese é que a inibição da apoptose observada nos timócitos dos animais desnutridos pode estar relacionada a mudanças no balanço das proteínas pró- e antiapoptóticas, visto que é bem estabelecido que os membros de proteínas da família Bcl-2 exercem um papel importante no desenvolvimento de células T e estão envolvidos em diferentes tipos de morte celular em timócitos (Sentman *et al.*, 1991; Strasser *et al.*, 1994; Williams & Brady, 2001).

Em particular, a proteína Bcl-2 é expressa em altos níveis em timócitos maduros e células T periféricas (Williams & Brady, 2001) e a superexpressão desta proteína protege os timócitos de múltiplos estímulos apoptóticos (Chao & Korsmeyer, 1998). A função molecular da proteína em questão é a inibição de proteínas próapoptóticas da família Bcl-2, entre elas a Bax (Bouillet & Strasser, 2002; Chan & Yu, 2004), contudo, quando a proteína próapoptótica está em maior quantidade, a morte celular é acelerada. Neste sentido, Oltvai e colaboradores (1993) mostraram que a razão Bcl-2/Bax determina a morte ou a sobrevivência da célula, na presença ou não, de um estímulo apoptótico.

De fato, timócitos de camundongos transgênicos que superexpressam Bax mostram uma apoptose acelerada em resposta à dexametasona (Brady *et al.*, 1996) e recentemente, um estudo *in vivo* mostrou um envolvimento das proteínas Bax e caspase 3 na apoptose induzida por 5-fluorouracil em timócitos murinos (Aquino Esperanza *et al.*, 2008).

Nossos resultados confirmam os trabalhos acima, pois a diminuição da apoptose observada nos timócitos do grupo D, em condições basais, está associada a um fenótipo antiapoptótico caracterizado pelo aumento da expressão de Bcl-2 e pela redução da expressão de Bax, em conjunto com uma inibição da ativação de Caspase-3.

Vimos também que a incubação (*in vitro*) com leptina foi capaz de induzir o aumento da expressão Bcl-2 e a diminuição da expressão de Bax no grupo controle. Essas evidências estão de acordo com outros estudos *in vivo* em timócitos (Girasol *et al.*, 2009) e *in vitro* em linfócitos B (Lam *et al.*, 2010), células beta pancreáticas (Brown & Dunmore, 2007) e células de hepatocarcinoma humano (Chen *et al.*, 2007).

O fator de transcrição NF $\kappa$ B é um importante regulador da ativação e funcionalidade de linfócitos (Patra *et al.*, 2004). Em muitos tipos celulares, a ativação transcricional dependente de NF $\kappa$ B regula a transcrição de moléculas das vias de apoptose, controlando desta forma, o balanço entre sinais de sobrevivência e morte (Liu *et al.*, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996, Valéro *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que todos os subtipos de timócitos apresentam alguma expressão de NF $\kappa$ B constitutiva e, notavelmente, a inibição de NF $\kappa$ B *ex vivo* em timócitos DN desencadeia a apoptose (Voll *et al.*, 2000), sugerindo que esta proteína forneça sinais de sobrevivência essenciais para estas células.

No presente estudo, mostramos um *link* entre a diminuição das taxas de apoptose observada em timócitos do grupo D e o aumento da ativação de NF $\kappa$ B, visto que essas células exibiram um alto conteúdo constitutivo da subunidade p65 do NF $\kappa$ B no núcleo associado a um menor conteúdo de I $\kappa$ B (a sua chaperona) no citoplasma, comparado ao controle.

Entretanto, a leptina, na concentração e no tempo utilizado neste estudo, não foi capaz de induzir a ativação de NF $\kappa$ B em timócitos. Embora este fator de transcrição seja um indutor clássico da expressão gênica de Bcl-2 em diferentes células (Luqman & Pezzuto, 2010), a leptina parece atuar através de outros mecanismos na indução da expressão desta proteína neste tipo celular.

Recentemente, foi demonstrado em linfócitos B, que a leptina é capaz de elevar os níveis de Bcl-2 através de dois importantes mecanismos: pela ativação direta de seu promotor e pela supressão de micro RNAs, pequenos RNAs não codificantes que podem reduzir a expressão de um gene- alvo em nível pós-transcricional (Lam *et al.*, 2010). Portanto, este fenômeno seria um ponto interessante para futuras investigações.

Não é a primeira vez que o nosso grupo demonstra um aumento na translocação nuclear de NF $\kappa$ B como resultado da restrição nutricional materna. Já foi demonstrado que o sistema do NF $\kappa$ B está constitutivamente ativado em neutrófilos circulantes da prole adulta de ratos cujas mães foram submetidas à privação protéica severa (0 % de proteína) durante o início da lactação, sugerindo um nível basal de ativação, que poderia proteger estas células da apoptose (Silva *et al.*, 2010).

Outro possível mecanismo que poderia contribuir para as alterações encontradas no grupo D é a modulação da produção de glicocorticóides, visto que estes hormônios são potentes indutores de apoptose em timócitos (Wang *et al.*, 2006; Van den Brandt *et al.*, 2007) e alterações na ativação do eixo HPA muitas vezes são consequências da privação nutricional (Borwick, 2003). Por exemplo, roedores sujeitos a restrição calórica apresentam níveis elevados de corticosterona sistêmica, acompanhado por um aumento expressivo da apoptose, afetando principalmente timócitos DP (Barone *et al.*, 1993; Howard *et al.*, 1999; Savino, 2002).

Nosso grupo demonstrou previamente que ratos adultos submetidos à restrição protéica materna severa (0 % de proteína) durante o início da lactação apresentam altos níveis de corticosterona circulantes (Barja-Fidalgo *et al.*, 2003). Entretanto, no presente estudo, não observamos alterações nos níveis de corticosterona séricos entre os grupos.

Os efeitos dos glicocorticóides se dão através da interação com seu receptor (GR) (Pazirandeh *et al.*, 2004). Notavelmente, a concentração de GR é o principal fator determinante da sensibilidade celular a estes hormônios (Pazirandeh *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2004; Talabér *et al.*, 2009).

Sabemos que o gene deste receptor é epigeneticamente afetado por influências no ambiente pós-natal (Tamashiro & Moran, 2010). Neste estudo, constatamos a ausência de alterações no conteúdo nuclear de GR, sugerindo uma atividade similar dos GC entre os grupos. Deste modo, excluímos a possibilidade do envolvimento deste hormônio na menor taxa de apoptose encontrada no grupo D.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que a restrição protéica materna durante a lactação afeta o microambiente tímico, induzindo um aumento da expressão do gene *ob* e um aumento na expressão de ObRb nos timócitos. Vimos também, que os timócitos isolados do grupo D apresentam uma redução da taxa de apoptose espontânea. Este evento parece estar relacionado ao aumento da expressão de Bcl-2 e à redução da expressão de Bax, além da inibição da ativação de caspase-3. Dados da literatura mostram que a inibição da apoptose de timócitos pode trazer consequências divergentes sobre a resposta imune celular pois, a apoptose é um processo fisiológico de morte celular programada essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostasia do sistema imune, participando ativamente dos processos de tolerância central e periférica (Siegel & Fleisher, 1999; Opferman & Korsmeyer, 2003). Neste sentido, está bem estabelecido que alterações

na função ou expressão de moléculas da maquinaria apoptótica podem resultar em condições patológicas que estão associadas ao desenvolvimento de doenças autoimunes, câncer, imunodeficiências e doenças neurodegenerativas (Solary *et al.*, 1996; Afford & Randhawa, 2000; Kawakami & Eguchi, 2002; Opferman, 2008). Por outro lado, também já foi observado que a leptina protege da atrofia tímica induzida por endotoxemia (Gruver *et al.*, 2009), por infecções virais, bacterianas e fúngicas (Savino, 2006).

## 7 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que a restrição protéica materna durante a lactação induz, na prole jovem de ratos Wistar, um aumento na produção de leptina pelo microambiente tímico e um aumento na sensibilidade das células tímicas às ações deste hormônio. Estes eventos combinados resultam na proteção dos timócitos da apoptose sem alterar a resposta proliferativa ou a maturação destas células. A base para essas alterações está intimamente relacionada ao aumento da ativação de NFkB e a mudanças na expressão de proteínas-chave envolvidas na cascata de sinalização da apoptose (Bax, Bcl-2 e Caspase 3) (Fig. 26).

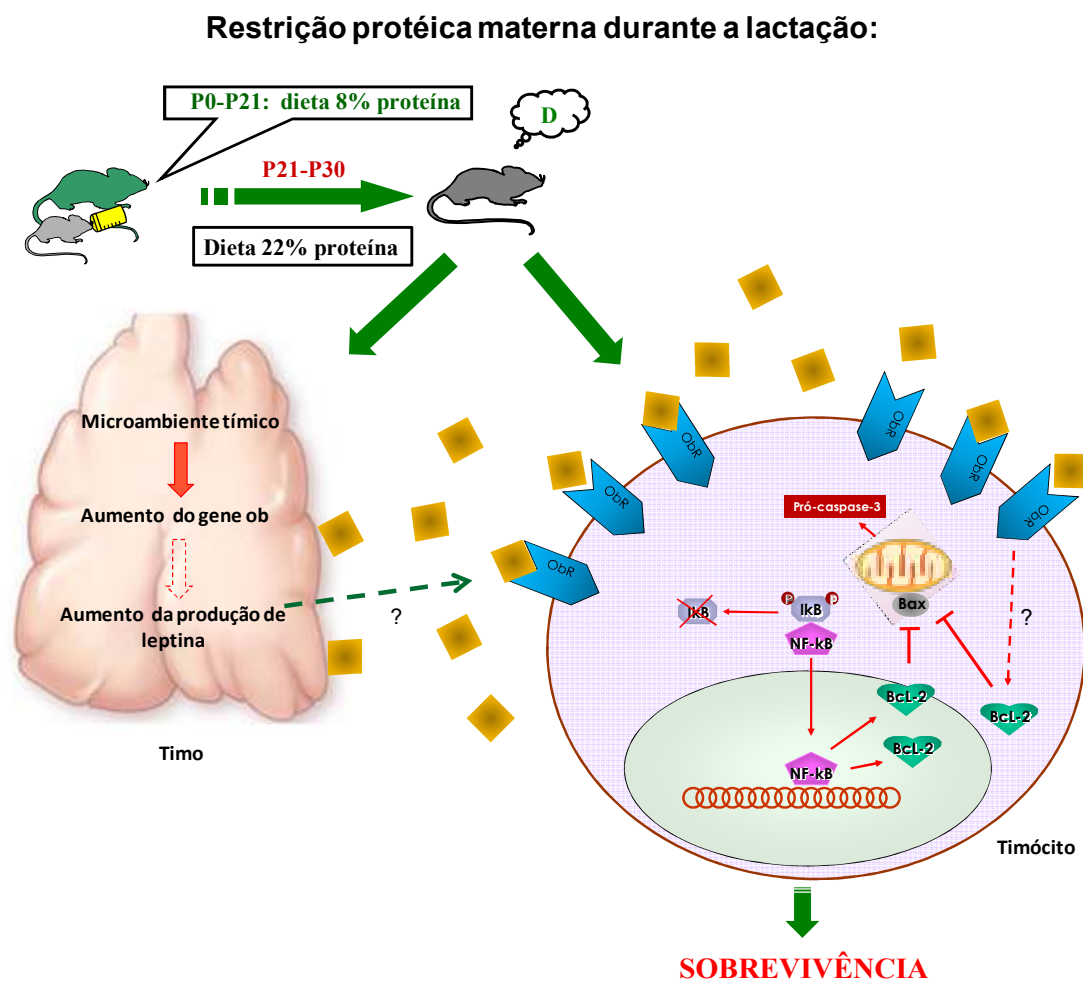


Figura 26 - Efeito da restrição protéica materna (8 % de proteína) sobre o timo da prole jovem.

## REFERÊNCIAS

- Aaby P, Marx C, Trautner S, Rudaa D, Hasselbach H, Jensen H, Lisse I. Thymus size at birth is associated with infant mortality: a community study from Guinea Bissau. *Acta Paediatr.* 2002; 91:698–703.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia Celular e molecular*. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 544 p.
- Abe M, Akbar F, Matsuura B, Horiike N, Onji M. Defective antigen-presenting capacity of murine dendritic cells during starvation. *Nutrition.* 2003;19:265-9.
- Adcock IM, Caramori G. Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol.* 2001; 79(4):376-84.
- Adeyemi EO, Bastaki SA, Chandranath IS, Hasan MY., Fahim M, Adem A. Mechanisms of action of leptin in preventing gastric ulcer. *World J.Gastroenterol.* 2005; 11:4154–4160.
- Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol.* 2000; 53(2):55-63.
- Agote M, Goya L, Ramos S, Alvarez C, Gavete ML, Pascual-Leone AM, Escrivá F. Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281(5):E1101-9.
- Almawi WY, Melemedjian OK, Jaoude MM. On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis. *J Leukoc Biol.* 2004;76(1):7-14
- Andrews RC, Walker BR. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin. Sci.* 1999; 96: 513-23.
- Aquino Esperanza JA, Aguirre MV, Aispuru GR, Lettieri CN, Juaristi JA, Alvarez MA, Brandan NC. In vivo 5-fluorouracil-induced apoptosis on murine thymocytes: involvement of FAS, Bax and Caspase3. *Cell Biol Toxicol.* 2008; (5):411-22.
- Bajari TM, Nimpf J, Schneider WJ. Role of leptin in reproduction. *Curr Opin Lipidol.* 2004; 15:315–319.
- Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers Jr MG. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 2000; 275:14563–14572
- Barja-Fidalgo C, Garcia-Souza EP, Silva SV, Rodrigues AL, Anjos-Vallota EA, Sannomyia P, DeFreitas MS, Moura AS. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res.* 2003; 52(11):470-476.
- Barker DJP. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. *Nutrition.* 1997; 13: 807-811.



Barker DJP. Programming the baby. In: BARKER, D.J.P. Mothers, Babies and Health in Later Life. London: Churchill Livingstone, 1998. p. 13-39.

Barnard A, Layton D, Hince M, Sakkal S, Bernard C, Chidgey A, Boyd R. Impact of the neuroendocrine system on thymus and bone marrow function. *Neuroimmunomodulation*. 2008;15: 7-18

Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci*. 1998; 94(6):557-72.

Barnes PJ. Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2005; 25(3):451-68. Review.

Barone KS, O'Brien PC, Stevenson JR. Characterization and mechanisms of thymic atrophy in protein-malnourished mice: role of corticosterone. *Cell Immunol*. 1993;148, 226–233

Batista Filho M, Rissin A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad Saúde Pública*. 2003;19(Sup.1):S181-S91.

Batty GD, Alves JG, Correia J, Lawlor DA. Examining life-course influences on chronic disease: the importance of birth cohort studies from low- and middle- income countries. An overview. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40(9):1277-86.

Biron CA. More things in heaven and earth: defining innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*. 2010;11(12):1080-2.

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.

Black R. Micronutrient deficiency: an underlying cause of morbidity and mortality. *Bull World Health Organ*. 2003; 81:79.

Boehm T. Thymus development and function. *Curr Opin Immunol*. 2008; (2):178-84.

Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, Heidendal GA, Reutelingsperger CP. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J. Nucl. Med*. 2005; 46(12), p. 2035-2050.

Borwick SC, Rae MT, Brooks J, McNeilly AS, Racey PA, Rhind SM. Undernutrition of ewe lambs in utero and in early post-natal life does not affect hypothalamic-pituitary function in adulthood. *Anim Reprod Sci*. 2003; May 15;77(1-2):61-70.

Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 8):1567-74.

Bouret SG, Draper SJ & Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*. 2004; 24: 2797–2805.

Bradford M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle –dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72, 48-54.

Brady HJ, Salomons GS, Bobeldijk RC, Berns AJ. T cells from baxalpha transgenic mice show accelerated apoptosis in response to stimuli but do not show restored DNA damage-induced cell death in the absence of p53. *EMBO J.* 1996;15(6):1221-30.

Brasil. Ministério da Saúde. Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher (PNDS 2006). 2008, Brasília

Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev.* 1979; 59: 719–809.

Brown JE, Dunmore SJ. Leptin decreases apoptosis and alters BCL-2 : Bax ratio in clonal rodent pancreatic beta-cells. *Diabetes Metab Res Rev.* 2007; 23(6):497-502.

Brunetto MA, Gomes MOS, Jeremias JT, Oliveira LD, Carciofi AC. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. *Acta Scien Veterinariae.* 2007; 35(2):5230-2.

Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr.* 2007; 97(6):1036-46.

Calder PC, Jackson AA. Undernutrition, infection and immune function. *Nutr Res Rev.* 2000;13(1):3-29.

Caldefie-Chezet F, Poulin A, Vasson MP. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radic Res.* 2003; 37:809 –814

Carvalho JB, Ribeiro EB, Folli F, Velloso LA, Saad MJ. Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *Biol Chem.* 2003; 384:151–159

Casabiell X, PiYeiro V, TomZ MA, Pein2 R, DiZguez C, Casanueva FF. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocr Metab.* 1997; 82: 4270–4273

Chan SL, Yu VC. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004; 31(3):119-28. Review.

Chan JL, Blüher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes.* 2002; 51(7):2105-12.

Chandra RK. Rosette-Forming T-Lymphocytes and Cell-Mediated-Immunity in Malnutrition. *British Medical Journal.* 1974; 3:608-9.

Chandra RK. Serum Complement and Immunoconglutinin in Malnutrition. *Archives of Disease in Childhood*. 1975; 50:225-7

Chandra RK. Protein-energy malnutrition and immunological responses. *J Nutr*. 1992;122, Suppl. 3, 597–600.

Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr*; 2002; 56-3: S73-6.

Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death *Annu Rev Immunol*. 1998; 16:395-419.

Chen C, Chang YC, Liu CL, Liu TP, Chang KJ, Guo IC. Leptin induces proliferation and anti-apoptosis in human hepatocarcinoma cells by up-regulating cyclin D1 and down-regulating Bax via a Janus kinase 2-linked pathway. *Endocr Relat Cancer*. 2007; 14(2):513-29.

Chen LC, Chowohury A, Huffman SL . Anthropometric assessment of energy-protein malnutrition and subsequent risk of mortality among pre-school aged children. *American Journal of Clinical Nutrition*.1980; 33:1.836-1.845

Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, Kennedy BP, Tremblay ML. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell*. 2002; 2(4):497-503.

Ciofani M & Zúñiga-Pflücker JC (2007) The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23, 463–493.

Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ. Possible roles of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat. Med*. 1996; 2: 55.

Considine R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannessian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med*. 1996; 334: 292–295.

Conzen SD, Janeway CA. Defective antigen presentation in chronically protein-deprived mice. *Immunology*. 1988; 63(4):683-9.

Cortés-Barberena E, González-Márquez H, Gómez-Olivares JL, Ortiz-Muñiz R. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. *Clin Exp Immunol*. 2008; 152: 585-92.

Coutinho JG, Gentil PC, Toral N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. *Cad Saúde Pública*. 2008; 24 (Supl 2):S332-40

Cunningham-Rundles S, McNeeley DF, Moon A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 1119-28.

Davidowa H, Plagemann A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. *Neuroreport*. 2001; 12: 3201-4.

Dardenne M, Savino W, Gastinel LN, Nabarra B, Bach JF. Thymic dysfunction in the mutant diabetic (db/db) mouse. *J. Immunol*. 1983; 130:1195–1199.

Delghingaro-Augusto V, Ferreira F, Bordin S, do Amaral ME, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM.. A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic cells. *J. Nutr*. 2004; 134(2):321-7.

De Moura EG, Lisboa PC, Custódio CM, Nunes MT, de Picoli Souza K, Passos MC. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem*. 2007; 18(2):134-9.

De Rosa, V., Procaccini, C., Cali, G., Pirozzi, G., Fontana, S., Zappacosta, S., La Cava, A., Matarese, G. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity*. 2007; 26, 241–255

Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000; 100(2):197-207.

Dunn SL, Bjornholm M, Bates SH, Chen Z, Seifert M, Myers MG Jr. Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. *Mol Endocrinol*. 2005; 19, 925-38.

Eggert M, Schuls M, Neeck G. Molecular mechanisms of glucocorticoids action in rheumatic autoimmune diseases. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol*. 2001; 77: 185-91.

Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C, Fantuzzi G. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(5):2367-72.

Faggioni, R., Fantuzzi, G., Gabay, C., Moser, A., Dinarello, C.A., Feingold, K.R., Grunfeld, C. Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am. J. Physiol*. 1999; 276, R136–R142.

Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Oliveira E, Toste FP, Bonomo IT, Trvenzoli IH, Garcia RM, Lisboa PC. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr*. 2007; 98(5): 922-928.

Fantuzzi G, Sennello JA, Batra A, Fedke I, Lehr AH, Zeitz M, Siegmund B. Defining the role of T cell-derived leptin in the modulation of hepatic or intestinal inflammation in mice. *Clin. Exp. Immunol*. 2005; 142, 31–38.

Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/ metabolic

dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 1093–1103.

Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, Lank E, Bottomley B, Lopez-Fernandez J, Ferraz-Amaro I, Dattani MT, Ercan O, Myhre AG, Retterstol L, Stanhope R, Edge JA, McKenzie S, Lessan N, Ghodsi M, De Rosa V, Perna F, Fontana S, Barroso I, Undlien DE, O'Rahilly S. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356, 237–247.

Faulk P. The immunological system in health and malnutrition. *Proc Nutr Soc.* 1976; 35: 253-61.

Fernández-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martín-Romero C, Pérez-Pérez A, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm.* 2010:568343. Review.

Ferreira F, Barbosa HC, Stoppiglia LF, Delghingaro-Augusto V, Pereira EA, Boschero AC, Carneiro EM. Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA $\alpha$  expression. *J. Nutr.* 2004;134(1):63-7.

Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Programming by Early Nutrition: An Experimental Approach. *Early life nutrition and metabolic programming.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 2010; 1212 78–96.

Finck BN, Kelley KW, Dantzer R, Johnson RW. In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the induction of leptin by lipopolysaccharide. *Endocrinology.* 1998; 139: 2278–2283.

Fock RA, Vinolo MA, de Moura Sá Rocha V, de Sá Rocha LC, Borelli P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF- $\alpha$  in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine.* 2007; 40(2):105-14.

Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO). *The State of Food Insecurity in the World: monitoring progress towards the World Food Summit and Millennium Development Goals*, Rome, Italy 2008.

Fox CJ, Hammerman PS, Thompson CB. Fuel feeds function: Energy metabolism and the T-cell response. *Nature Rev Immunol.* 2005; 5, 844-52.

Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrère B. Regulation of leptin production in humans. *J. Nutr.* 2000; 130: 3127S–3131S.

Friedman JM. & Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998; 395: 763–770.

Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev.* 2002; 60:S1–S14; discussion S68–S84, S85–S87

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; 28: 21–26.

Gainsford T & Alexander WS. A role for leptin in hemopoiesis? *Mol. Biotechnol.* 1999; 11: 149–158.

García-Sáez AJ, Fuertes G, Suckale J, Salgado J. Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl-2 proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 677:91-105. Review.

Garcia-Souza EP, da Silva SV, Félix GB, Rodrigues AL, de Freitas MS, Moura AS, Barja-Fidalgo C. Maternal protein restriction during early lactation induces GLUT4 translocation and mTOR/Akt activation in adipocytes of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 295(3):E626-36.

Girasol A, Albuquerque GG, Mansour E, Araújo EP, Degaspero G, Denis RG, Carnevali JB, Saad MJ, Velloso LA. Fyn mediates leptin actions in the thymus of rodents. *PLoS One.* 2009; 3;4(11):e7707.

Gavete ML, Agote M, Martin MA, Alvarez C, Escrivá F. Effects of chronic undernutrition on glucose uptake and glucose transporter proteins in rat heart. *Endocrinology.* 2002; 143(11):4295-303.

Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* 2001; 4(2B):611-24. Review.

Good RA, West A, Day NK, Dong ZW, Fernandes G. Effects of Undernutrition on Host Cell and Organ Function. *Cancer Res.* 1982; 42(2 Suppl):737s-746s.

Gnanalingham MG, Mostyn A, Symonds ME, Stephenson T. Ontogeny and nutritional programming of adiposity in sheep: potential role of glucocorticoid action and uncoupling protein-2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 289(5):R1407-15.

Gray DH, Chidgey AP, Boyd R L. Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods.* 2002; 260(1-2), 15-28.

Griesemer AD, Sorenson EC, Hardy MA. The role of the thymus in tolerance. *Transplantation.* 2010; 90(5):465-74. Review.

Grunfeld, C., Zhao, C., Fuller, J., Pollock, A., Moser, A., Friedman, J., Feingold, K.R. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. A role for leptin in the anorexia of infection. *J. Clin. Invest.* 1996; 97, 2152–2157.

Gruver AL, Sempowski GD. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *Leukoc Biol.* 2008; 84(4):915-23.

Gupta S, Kass GE, Szegezdi E, Joseph B The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(6):1004-33.

Hail N Jr, Carter BZ, Konopleva M, Andreeff M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis*. 2006; 11(6):889-904.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995; 269: 543–546.

Hales CN & Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992; 35(7):595-601.

Hamann A & Matthaei S. Regulation of energy balance by leptin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1996; 104(4):293-300.

Hanson LA, Hahn-Zoric M, Wiedermann U, Lundin S, Dahlman-Höglund A, Saalman R, Erling V, Dahlgren U, Telemo E. Early dietary influence on later immunocompetence. *Nutr Rev*. 1996; 54(2 Pt 2):S23-30.

Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells. *Gastroenterology*. 2001; 121, 79–90.

Hayday AC & Pennington DJ. Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* 2007; 8: 137-44

Harris RB. Leptin – much more than a satiety signal. *Annual Review of Nutrition*. 2000; 20 45–75.

Hegyi, K., Fülöp, K., Kovács, K., Tóth, S., Falus, A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int*. 2004; 28, 159-69.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407(6805):770-6.

Hick RW, Gruver AL, Ventevogel MS, Haynes BF, Sempowski GD. Leptin selectively augments thymopoiesis in leptin deficiency and lipopolysaccharide-induced thymic atrophy. *J. Immunol*. 2006;177: 169–176.

Hileman SM, Tornøe J, Flier JS, Bjorbaek C. Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology*. 2000; 141(6):1955-61.

Ho E & Zempleni J. Overview to symposium "Nutrients and epigenetic regulation of gene expression. *J Nutr*. 2009; Dec;139(12):2387-8.

Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(10):772-82.

Hosea HJ, Rector ES, Taylor CG. Dietary depletion can replenish reduced T cell subset numbers and lymphoid organ weight in zinc-deficient and energy-restricted rats. *Br J Nutr*. 2004; 91(5):741-7.

Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei 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, 1051–1059

Huang Q, Timofeeva E, Richard D. Regulation of corticotropin-releasing factor and its types 1 and 2 receptors by leptin in rats subjected to treadmill running-induced stress. *J Endocrinol.* 2006; 191:179–188

Jambon B, Ziegler O, Maire B, Hutin MF, Parent G, Fall M, Burnel D, Duheille J. Thymulin and zinc contents of the thymus glands of malnourished children. *Am J Clin Nutr.* 1988; 48, 335–342.

Janik JE, Curti BD, Considine RV, Rager HC, Powers GC, Alvord WG, Smith JW 2nd, Gause BL, Kopp WC. Leukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82: 3084–3086

Jiang L, Li Z, Rui L. Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways. *J Biol Chem.* 2008; 283(42):28066-73.

Kane LP, Lin J, Weiss A. It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation. *Trends Immunol.* 2002; 23, 413-420.

Katona P, Katona-Apte J. The interaction between nutrition and infection. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(10):1582-8.

Kawakami A, Eguchi K. Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. *Med Electron Microsc.* 2002; 35(1):1-8.

Keusch GT, Cruz JR, Torun B, Urrutia JJ, Smith H, Goldstein AL. Immature Circulating Lymphocytes in Severely Malnourished Guatemalan Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 1987; 6:265-70.

Kim SY, Lim JH, Choi SW, Kim M, Kim ST, Kim MS, Cho YS, Chun E, Lee KY. Preferential effects of leptin on CD4 T cells in central and peripheral immune system are critically linked to the expression of leptin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 394(3):562-8.

Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers Jr MG. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem.* 2002; 277:41547–41555

Krechowec SO, Vickers M, Gertler A, Breier BH. Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity *J Endocrinol.* 2006; May;189(2):355-63.

Kulapongs P, Edelman R, Suskind R, Olson RE. Defective local leukocyte mobilization in children with kwashiorkor. *Am J Clin Nutr.* 1977; 30(3):367-70.



Kuvibidila S, Dardenne M, Savino W, Lepault F. Influence of iron deficiency anemia on selected thymus functions in mice: thymulin biological activity, T-cell subsets, and thymocyte proliferation. *Am J Clin Nutr.* 1990; 51, 228–232.

La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 371–379.

La Cava, A., Alviggi, C., Matarese, G. Unrevealing the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J Mol Med.* 2004; 82, 4-11.

Lam QL, Wang S, Ko OK, Kincade PW, Lu L. Leptin signaling maintains B-cell homeostasis via induction of Bcl-2 and Cyclin D1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(31):13812-7

Lam QL, Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 2007; 4, 1–13.

Lamont AG, Gordon M, Ferguson A. T lymphocyte function in protein deprived mice. *Clin Exp Immunol.* 1988; 72(1):113-7.

Langley-Evans SC, Carrington LJ. Diet and the developing immune system. *Lupus.* 2006;. 15(11):746-52. Review

Langley-Evans SC & McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract.* 2010;19(2):87-98.

Le Clair C, Abbi T, Sandhu H, Tappia PS (2009) Impact of maternal undernutrition on diabetes and cardiovascular disease risk in adult offspring. *Can J Physiol Pharmacol.* Mar; 87(3):161-79. Review.

Lee MJ, Wang Y, Ricci MR, Sullivan S, Russell CD, Fried SK. Acute and chronic regulation of leptin synthesis, storage, and secretion by insulin and dexamethasone in human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007; 292: E858–E864.

Leibowitz B, Yu J. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther.* 2010; 9(6):417-22.

Lisboa PC, Passos MC, Dutra SC, Bonomo IT, Denolato AT, Reis AM, Moura EG. Leptin and prolactin, but not corticosterone, modulate body weight and thyroid function in protein-malnourished lactating rats. *Horm Metab Res.* 2006; 38(5):295-9.  
Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* 1996; 87(3):565-76.

Loffreda S., S. Q. Yang, H. Z. Lin, C. L. Karp, M. L. Brengman, D. J. Wang, A. S. Klein, G. B. Bulkley, C. Bao, P. W. Noble. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* 1998; 12: 57–65.

Lomonosova E, Chinnadurai G. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene.* 2008; 27 Suppl 1:S2-19. Review.

Lopes Da Costa C, Sampaio de Freitas M, Moura AS. Insulin secretion and GLUT-2 expression in undernourished neonate rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005; 15(4): 236–241.

López M, Seoane LM, Tovar S, García MC, Nogueiras R, Diéguez C, Señaris RM. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia*. 2005; Jan;48(1):140-8.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998; 394: 897–901.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*. 1991; 156: 38-50.

Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr*. 1998; 128(2 Suppl):401S-406S.

Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child. Nutr*. 2004; 71: 288-290.

Luqman S, Pezzuto JM. NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res*. 2010; 24(7):949-63

Lyra JS, Madi K, Maeda CT, Savino W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J Pathol*. 1993; 171, 231–236

Madej T, Boguski MS, Bryant SH. Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Lett*. 1995; 373, 13-8.

Mansour E, Pereira FG, Araújo EP, Amaral ME, Morari J, Ferraroni NR, Ferreira DS, Lorand-Metze I, Velloso LA. Leptin inhibits apoptosis in thymus through a janus kinase-2-independent, insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *Endocrinology*. 2006; 147: 5470–5479

Marcos A, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur J Clin Nutr*; 2003; 57 (Suppl 1):S66-9.

Martins MR, Vieira AK, de Souza EP, Moura AS. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *J Endocrinol*. 2008; Sep;198(3):591-8

Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V, Lord GM, Howard JK. Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmuneencephalomyelitis. *J Immunol*. 2001; 166: 5909–5916.

Matarese G, La Cava A. The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol*. 2004; 25, 193-200.

Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J. Immunol.* 2005; 174: 3137–3142. Review

Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol.* 2005; 174:6820–6828

McDade TW, Beck MA, Kuzawa CW, Adair LS. Prenatal undernutrition and postnatal growth are associated with adolescent thymic function. *J Nutr.* 2001; 131:1225–31.

McMahon CD, Elsasser TH, Gunter DR, Sanders LG, Steele BP, Sartin JL. Estradiol/progesterone implants increase food intake, reduce hyperglycemia and increase insulin resistance in endotoxic steers. *J. Endocrinol.* 1998;159(3):469-78

Mito N, Yoshino H, Hosoda T, Sato K. Analysis of the effect of leptin on immune function in vivo using diet-induced obese mice. *J Endocrinol.* 2004;180, 167–173.

Mitsumori K, Takegawa K, Shimo T, Onodera H, Yasuhara K, Takahashi M. Morphometric and immunohistochemical studies on atrophic changes in lymphohematopoietic organs of rats treated with piperonyl butoxide or subjected to dietary restriction. *ArchToxicol.* 1996; 70, 809–814.

Mittal A & Woodward B. Thymic epithelial cells of severely undernourished mice: accumulation of cholesteryl esters and absence of cytoplasmic vacuoles. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1985; 178, 385–391

Mittal A, Woodward B, Chandra RK. Involution of thymic epithelium and low serum thymulin bioactivity in weanling mice subjected to severe food intake restriction or severe protein deficiency. *Exp Mol Pathol.* 1988; 48(2):226–235

Mondini L, Monteiro CA. The stage of nutrition transition in different Brazilian regions. *Arch.Latinoam.Nutr.* 1997; 47, 17-21.

Monk M. Epigenetic programming of differential gene expression in development and evolution. *Dev Genet.* 1995; 17(3):188-97.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ *et al.* Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 1997; 387: 903–908.

Montez JM, Soukas A, Asilmaz E, Fayzikhodjaeva G, Fantuzzi G, Friedman JM. Acute leptin deficiency, leptin resistance, and the physiologic response to leptin withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:2537–2542

Moore SE, Cole TJ, Collinson AC, Poskitt EM, McGregor IA, Prentice AM. Prenatal or early postnatal events predict infectious deaths in young adulthood in rural Africa. *Int J Epidemiol.* 1999; 28:1088 –95.

Mora S, Pessin JE. An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab.Res. Rev.* 2002; 18: 345–356.

Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002; Jun;26(4):471-83.

Moura AS, Carpinelli AR, Barbosa FB, Gravena C, Mathias PC. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1996; 92(1):73-84.

Moura AS, Caldeira Filho JS, de Freitas Mathias PC, de Sá CC. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1997; 96(2):179-92.

Mugerwa JW. The lymphoreticular system in Kwashiorkor. *J Pathol.* 1971; 105(2):105-9.

Muller M, Kersten. Nutrigenomics: goals and strategies. *Nat Rev genet.* 2003; 4(4): 315-22.

Müller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. 2005; *CMAJ.* 173: 279-86.

Munzberg,H, Myers MG Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.* 2005; 8: 566–570.

Myers MG Jr (2004) Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology *Recent Prog Horm Res.* 59:287-304.

Nájera O, González C, Toledo G, López L, Ortiz R. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; May;11(3):577-80.

Nájera O, González C, Toledo G et al. Early activation of T, B and NK lymphocytes in infected malnourished and infected well nourished children. *J Nutr Immunol.* 2001; 5:85–97.

Najib S, Sanchez-Margalet V. Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway. *Cell. Immunol.* 2002; 220: 143–149.

Nassar MF, Younis NT, Tohamy AG, Dalam DM, El Badawy MA. T-lymphocyte subsets and thymic size in malnourished infants in Egypt: a hospital-based study. *East Mediterr Health J.* 2007;13(5):1031-42.

Neto EH, Coelho AL, Sampaio AL, Henriques MG, Marcinkiewicz C, De Freitas MS, Barja-Fidalgo C. Activation of human T lymphocytes via integrin signaling induced by RGD-disintegrins. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1773(2):176-84.

Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P. The Joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutr.* 2004; 7(1A):245-50.

Niswender KD, Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol.* 2003; 24, 1-10.

Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol.* 2008; 99:59-94. Review.

Nyirenda MJ, Welberg LA, Seckl JR. Programming hyperglycaemia in the rat through prenatal exposure to glucocorticoids-fetal effect of maternal influence? *J Endocrinol.* 2001; 170(3):653-660.

Ortiz R, Cortés L, Cortés E, Medina H. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. *Clin Exp Immunol.* 2009;155(1):96-106.

Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993; 27;74(4):609-19.

Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol.* 2003; 4(5):410-5.

Opferman JT. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ.* 2008;15(2):234-42.

Ozanne SE, Hales CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc.* 1999; 58(3)615-619.

Ozanne SE & Hales CN. Pre- and early postnatal nongenetic determinants of type 2 diabetes. *Expert. reviews in molecular medicine.* 2002; 2: 1-14.

Palacio A, Lopez M, Perez-Bravo F, Monkeberg F, Schlesinger L. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; Jul;87(7):3040-6.

Pallaro AN, Roux ME, Slobodianik NH. Nutrition disorders and immunologic parameters: study of the thymus in growing rats. *Nutrition.* 2001; 17(9):724-8.

Palmer G, Aurrand-Lions M, Contassot E, Talabot-Ayer D, Ducrest-Gay D, Vesin C, Chobaz-Péclat V, Busso N, Gabay C.. Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice. *J. Immunol.* 2006;177(5):2899-2907.

Parent G, Chevalier P, Zalles L, Sevilla R, Bustos M, Dhenin JM, Jambon B. In vitro lymphocyte-differentiating effects of thymulin (Zn-FTS) on lymphocyte subpopulations of severely malnourished children. *Am J Clin Nutr.* 1994; 60:274-8.

Passos MC, da Fonte Ramos C, Dutra SC, Mouço T, de Moura EG.. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res.* 2002; 34(1): 40-3.

Patel MS, Srinivasan M. Metabolic programming: causes and consequences. *J Biol Chem.* 2002; 277(3):1629-32.

Patra AK, Na SY, Bommhardt U. Active protein kinase B regulates TCR responsiveness by modulating cytoplasmic-nuclear localization of NFAT and NF-kappa B proteins. *J Immunol.* 2004; 172(8):4812-20.

Pazirandeh A, Jondal M, Okret S. Glucocorticoids delay age-associated thymic involution through directly affecting the thymocytes. *Endocrinology.* 2004; 145:2392–2401

Pazirandeh A, Xue Y, Prestegaard T, Jondal M, Okret S. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T-cell lineage on thymocyte and T-cell homeostasis. *FASEB J* 2002; 16:727–729

Peña M, Bacallao J. Malnutrition and poverty. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22:241-53.

Pennington SN, Pennington JS, Ellington LD, Carver FM, Shibley Jr IA, Jeansonne N, Lynch SA, Roberson LA, Miles DS, Wormington EP, Means LW. The effect of maternal malnutrition during pregnancy in the rat on the offspring's weight, glucose uptake, glucose transporter protein levels and behaviors. *Nutr. Research.* 2001; 21:755-769.

Petrie HT, Zúñiga-Pflücker JC. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. *Annu Rev Immunol.* 2007; 25, 649–679.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1644(2-3):83-94. Review.

Petry CJ, Ozanne SE, Hales CN. Programming of intermediary metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; Dec 20;185(1-2):81-91. Review.

Plagemann A. Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity. *Physiology e Behavior.* 2005; 86: 661-668.

Poetschke HL, Klug DB, Perkins SN, Wang TT, Richie ER, Hursting SD. Effects of calorie restriction on thymocyte growth, death and maturation. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 1959–1964.

Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(7):527-35. Review.

Prentice AM. The thymus: a barometer of malnutrition. *Br J Nutr.* 1999; 81, 345–347.

Proulx K, Clavel S, Naul tG, Richard D, Walker CD. High neonatal leptin exposure enhances brain GR expression and feedback efficacy on the adrenocortical axis of developing rats. *Endocrinology.* 2001; 142:4607–4616

Redmond HP, Gallagher HJ, Shou J, Daly JM. Antigen presentation in protein-energy malnutrition. *Cell Immunol.* 1995; 163(1):80-7.

Reichardt P, Dornbach B, Gunzer M. APC, T cells, and the immune synapse. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2010; 340:229-49. Review.

Revillard JP & Cozon G. Experimental models and mechanisms of immune deficiencies of nutritional origin. *Food Addit Contam*. 1990; 7 Suppl 1:S82-6.

Reynolds JV, Redmond HP, Ueno N, Steigman C, Ziegler MM, Daly JM, Johnston RB Jr. Impairment of macrophage activation and granuloma formation by protein deprivation in mice. *Cell Immunol*. 1992; 139:493-504.

Rice AL, Sacco L, Hyder A, Black RE. Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. *Bull World Health Organ*. 2000; 78: 1207-21

Rodríguez L, González C, Flores L, Jiménez-Zamudio L, Graniel J, Ortiz R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005; 12: 502-7.

Roitt, IM, Male DK, Brostoff J. *Imunologia*. São Paulo: Manole; 2003. 481 p.

Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy*. 2006; 36(11):1357-66. Review.

Sakai T, Mitsuya K, Kogiso M, Ono K, Komatsu T, Yamamoto S. Protein deficiency impairs DNA vaccine-induced antigen-specific T cell but not B cell response in C57BL/6 mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2006; 52(5):376-82

Sakamoto M, Fujisawa Y, Nishioka K. Physiologic role of the complement system in host defense, disease, and malnutrition. *Nutrition*. 1998; 14: 391-8.

Saldanha-Gama RF, Moraes JA, Mariano-Oliveira A, Coelho AL, Walsh EM, Marcinkiewicz C, Barja-Fidalgo C.  $\alpha(9)\beta(1)$  integrin engagement inhibits neutrophil spontaneous apoptosis: involvement of Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(7):848-57

Sampaio de Freitas M, Garcia de Souza EP, Vargas da Silva S, da Rocha Kaezer A, da Silva Vieira R, Sanchez Moura A & Barja-Fidalgo C. Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1639(1), 8-16.

Sanna V, Di Giacomo A, La Cava A, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S, Matarese G.. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J. Clin. Invest*. 2003; 111, 241–250

Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J. Exp. Med*. 1997; 185: 171–175.

- Savino W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56 (Suppl 3), S46–S49.
- Savino W, Dardenne M. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev.* 2000; 21, 412 – 443.
- Savino W, Dardenne M. Nutritional imbalances and infections affect the thymus: consequences on T-cell-mediated immune responses. *Proc Nutr Soc.* 2010; 69(4):636-43.
- Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* 2006; 2(6):e62.
- Savino W, Dardenne M, Velloso LA, Dayse Silva-Barbosa S. The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr.* 2007; 98 Suppl 1: S11–16.
- Savino W, Mendes-Da-Cruz DA, Smaniotto S, Silva-Monteiro E, Villa-Verde DM. Molecular mechanisms governing thymocyte migration: combined role of chemokines and extracellular matrix. *J Leukoc Biol.* 2004; 75, 951–961. Review
- Sawaya AL., Martins P., Hoffman D., Roberts SB. The link between childhood undernutrition and risk of chronic diseases in adulthood: a case study of Brazil. *Nutr.Rev.* 2003; 61, 168-175
- Scarpace PJ, Matheny M. Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. *Am J Physiol.* 1998; 275:E259–E264
- Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 2004; 11:S45–S55
- Scroferneker ML, Pohlmann PR. *Imunologia Básica e Aplicada*, Sagra Luzzatto, Seckl JR (1998) Physiologic programming of the fetus. *Clin. Perinatol.* 1998; 25(4):939-62, vii.
- Sellmeyer E, Bhattay E, Truswell AS, Meyers OL, Hansen JD. Lymphocyte transformation in malnourished children. *Arch Dis Child.* 1972; 47(253):429-35.
- Sennello JA, Fayad R, Pini M, Gove ME, Fantuzzi G. Transplantation of wild-type white adipose tissue normalizes metabolic, immune and inflammatory alterations in leptin-deficient ob/ob mice. *Cytokine.* 2006; 36(5-6):261-6.
- Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell.* 1991; 29;67(5):879-88
- Shills ME, Olson JA, Shike M, Ross. *Modern Nutrition in Health and Disease. Journal of Nutrition.* 1998; 25, 150-159.



Siegmund B, Sennello JA, Jones-Carson J, Gamboni-Robertson F, Lehr, HA, Batra A, Fedke I, Zeitz M, Fantuzzi G. Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut*. 2004; 53, 965–969.

Siegel RM, Fleisher TA. The role of Fas and related death receptors in autoimmune and other disease states. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103(5 Pt 1):729-38.

Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardeña G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 1998; 281(5383):1683-6.

Silva SV, Garcia-Souza EP, Moura AS, Barja-Fidalgo C. Maternal protein restriction during early lactation induces changes on neutrophil activation and TNF-alpha production of adult offspring. *Inflammation*. 2010; 33(2):65-75.

Singer A, Adoro S, Park JH. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice, *Nat Rev Immunol*. 2008; 8(10):788-801.

Sirisinha S, Edelman R, Suskind R, Charupatana C, Olson RE. Complement and C3-proactivator levels in children with protein-calorie malnutrition and effect of dietary treatment. *Lancet*. 1973; 12; 1(7811):1016-20.

Smart J. Undernutrition learning and memory: review of experimental studies. EM: Proceedings of XII international congress of nutrition. John Libbey, London, UK. 1986:74-78.

Solary E, Dubrez L, Eymin B. The role of apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Eur Respir J*. 1996; 9(6):1293-305.

Song IH, Gold R, Straub RH, Burmester GR, Buttgereit F. New Glucocorticoids on the horizon: repress, don't active! *J Rheumatol*. 2005; 32: 1199-207.

Soriano ME, Scorrano L. The interplay between BCL-2 family proteins and mitochondrial morphology in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 687:97-114.

Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:139-76..

Strasser A, Harris AW, von Boehmer H, Cory S. Positive and negative selection of T cells in T-cell receptor transgenic mice expressing a bcl-2 transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91:1376.

Strobel, A., T. Issad, L. Camoin, M. Ozata, and A. D. Strosberg. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat. Genet*. 1998; 18: 213–215.

Sugden MC, Holness MJ. Modulation of in vivo insulin action by dietary protein during pregnancy. *Am J Physiol*. 1995; Apr;268(4 Pt 1):E722-9.

Symonds ME, Budge H, Stephenson T, McMillen C. Fetal endocrinology and development – manipulation and adaptation to long-term nutritional and environmental challenges. *Reproduction*. 2001; 121: 853–862, 2001

Takahama, Y, Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol*, 2006; 6(2), 127-135.

Takeda S, Elefteriou F, Karsenty G. Common endocrine control of body weight, reproduction, and bone mass. *Annu Rev Nutr*. 2003; 23:403–411

Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Pálinkás L, Szabó M, Berta G, Sétáló G Jr, Németh P, Berki T. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunol*. 2009; 21(11):1269-76.

Tamashiro KL, Moran TH. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. *Physiol Behav*. 2010; 100(5):560-6.

Tartaglia L A. The leptin receptor. *J. Biol. Chem*. 1997; 272: 6093–6096.

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: 1263–1271.

Tchervenkov JI, Latter DA, Psychogios J, Christou NV. The influence of long-term protein deprivation on in vivo phagocytic cell delivery to inflammatory lesions. *Surgery*. 1988; 103(4): 463-469, 1988.

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.

Thorvaldsen JL, Bartolomei MS. Molecular biology. Mothers setting boundaries. *Science*. 2000; 288 (5474): 2145-6.

Trotter-Mayo, Roberts MR. Leptin acts in the periphery to protect thymocytes from glucocorticoid-mediated apoptosis in the absence of weight loss. *Endocrinology*. 2008; 149(10):5209-18

Unger RH. Lipotoxic diseases *Annu Rev Med*. 2002; 53:319-36. Review.

Uotani S, Bjorbaek C, Tornøe J, Flier JS. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes*. 1999; Feb;48(2):279-86.

- Valéro R, Baron ML, Guérin S, Béliard S, Lelouard H, Kahn-Perles B, Vialettes B, Nguyen C, Imbert J, Naquet P. A defective NF-kappa B/RelB pathway in autoimmune-prone New Zealand black mice is associated with inefficient expansion of thymocyte and dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 1;169(1):185-92.
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science.* 1996; 274(5288):787-9.
- Van den Brandt J, Lühder F, McPherson KG, de Graaf KL, Tischner D, Wiehr S, Herrmann T, Weissert R, Gold R, Reichardt HM. Enhanced glucocorticoid receptor signaling in T cells impacts thymocyte apoptosis and adaptive immune responses. *Am J Pathol.* 2007; 170(3):1041-53.
- Vecchione C, Maffei A, Colella S, Aretini A, Poulet R, Frati G, Gentile MT, Fratta L, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes.* 2002; 51:168–173
- Velloso LA, Savino W, Mansour E. Leptin action in the thymus. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1153:29-34. Review.
- 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.
- Voll RE, Jimi E, Phillips RJ, Barber DF, Rincon M, Hayday AC, Flavell RA, Ghosh S NF-kB activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity.* 2000; 13:677–689.
- Walker, C. D., Salzmann, C., Long, H., Otis, M., Roberge, C., Gallo-Payet, N. Direct inhibitory effects of leptin on the neonatal adrenal and potential consequences for brain glucocorticoid feedback. *Endocr Res.* 2004; 30, 837-44.
- Wang D, Müller N, McPherson KG, Reichardt HM. Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol.* 2006; 176(3):1695-702.
- Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J.* 2010; 427(3):333-47.
- Watanabe M, Hitomi M, van der Wee K, Rothenberg F, Fisher SA, Zucker R, Svoboda KK, Goldsmith EC, Heiskanen KM, Nieminen AL. The Pros and Cons of Apoptosis Assays for Use in the Study of Cells, Tissues, and Organs. *Microsc. Microanal.* 2002;v. 8, p. 375–391
- Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 1999; 69(2):179-97.

Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, Huxley R, Cook DG, Anazawa S *et al.* Birth Weight and Risk of Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *JAMA*. 2008; Dec. 24; 300(24):2886-97.

Williams O, Brady HJ. The role of molecules that mediate apoptosis in T-cell selection. *Trends Immunol*. 2001; 22(2):107-11. Review.

Witt CM, Robey EA. Thymopoiesis in 4 dimensions. *Semin Immunol*. 2005; 17: 95-102

World Health Organization. Management of severe malnutrition: A manual for physicians and other senior health workers. England. 1999.

Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV.. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science*. 1997; 278(5339):866-9.

Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. *J Nutr*. 2004; Sep;134(9):2169-72.

Yajima M, Hoshiba J, Terahara M, Yajima T. Reduced thymic size and numbers of splenic CD4+ and CD8+ cells in artificially reared mouse pups. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007; 71(10):2420-7.

Yang H, Youm YH, Dixit VD. Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J Immunol*. 2009; Sep 1;183(5):3040-52.

Youm YH, Yang H, Sun Y, Smith RG, Manley NR, Vandanmagsar B, Dixit VD. Deficient ghrelin receptor mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *J. Biol. Chem*. 2009; 284:7068–7077

Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Lett*. 2003; 546:45–50  
Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, Weetman AP, Strasburger CJ, Ross RJ. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol*. 2001; 15;167(8):4593-9

Zarkesh-Esfahani H, Pockley AG, Wu Z, Hellewell PG, Weetman AP, Ross RJ. Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha. *J. Immunol*. 2004; 172: 1809–1814.

Zeisel SH. Epigenetic mechanisms for nutrition determinants of later health outcomes. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89(5):1488S-1493S.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372, 425-32.

Zhang J, Zhang D, Hua Z. FADD and its phosphorylation. *IUBMB Life*. 2004; 56(7): 395-401.

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; 387, 206-9.

Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 300: 247-252.

**APÊNDICE** - Maternal protein deprivation during lactation increases leptin activity and inhibits apoptosis of thymic cells from young offspring

Running title: Role of leptin on thymocytes from PD rats

Carolina Salama\*; Simone Vargas da Silva\*; Mariana Renovato-Martins; Edward Helal-Neto; Marta Citelli and Christina Barja-Fidalgo

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de setembro 87 fds, Vila Izabel, Rio de Janeiro, 20551-030, RJ, Brazil

\* These authors contributed equally to this study

Corresponding author and request for reprints to:

Dr. Christina Barja-Fidalgo

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro

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

Phone: +55(21)2868 8298 - Fax: +55(21)2868 8629

e-mail: barja-fidalgo@uerj.br

Keywords: Maternal protein deprivation, leptin, thymocytes, apoptosis

This work was supported by grants from CAPES, CNPq and FAPERJ (Brazil)

Disclosure summary: all authors have nothing to declare.

## ABSTRACT

We investigated herein the consequences of maternal malnutrition in rat dams, in terms of thymocyte responses and the putative role of leptin and glucocorticoid circuits. The young progeny of dams submitted to protein deprivation (PD) during lactation showed at 30 days of age lower body and thymus weights, without significant alterations in total thymocyte number and CD4/CD8-defined T cell subsets, as well as in proliferative response. Similar circulating levels of corticosterone and nuclear glucocorticoid receptor contents were detected in thymic cells of PD and control groups. In contrast, despite the rats from PD group did not present alterations in leptin circulating levels, the expression of leptin receptor ObRb was enhanced in their thymocytes. This change was accompanied by an increase in leptin signaling response of thymocytes from PD rats, with an increase in JAK2 and STAT3 phosphorylation after leptin stimulation. Moreover, thymocytes from PD rats presented a decreased rate of spontaneous apoptosis when compared to controls. Accordingly, higher expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, and lower of pro-apoptotic protein Bax, with no change of pro-apoptotic Bad, and higher pro-caspase 3 content were detected in PD thymocytes. Moreover, thymocytes from PD group exhibited a constitutive higher nuclear content of p65 NF- $\kappa$ B associated to a lower I $\kappa$ B content in the cytoplasm. Finally, although there was no change in db gene expression in PD thymocytes, a higher mRNA expression for the ob gene was observed in the thymic microenvironment from PD animals. Taken together, the results show that maternal protein deprivation during lactation affects thymic homeostasis, enhancing leptin activity, which in turn protects thymocytes from apoptosis in the young progeny, with possible consequences upon the immune response of these animals in adult life.

## INTRODUCTION

Epidemiological and experimental studies have demonstrated that maternal nutritional imbalance and metabolic disturbances during critical time windows of development may have a persistent effect on the offspring's health [1]. Several authors demonstrated that nutritional deficit during early life alters physiological elements such as: hormone receptors [2; 3], signaling molecules [4 - 8] and regulatory enzymes [6; 8; 9]. We have reported in rats, that adult offsprings from dams submitted to protein deprivation during early lactation exhibit an imbalance in insulin and glucocorticoid secretion, which affects the proper development of acute inflammatory responses. This was ascertained by lower leukocyte migration into inflammatory sites, decreased edema formation, and lower expression of the adhesion molecule ICAM-1 [10; 11].

Maternal malnutrition during early lactation affects the expression and activation of key proteins of the insulin signaling cascade, leading to a permanent up-regulation of PI3-K, AKT and increase in GLUT-4 translocation in skeletal muscle and adipocytes from adult offspring [6; 8].

Besides interfering with insulin-mediated responses, maternal protein restriction during lactation interferes with leptin secretion in the offsprings. These animals presented higher serum leptin contents and increased leptin receptor expression in the pituitary gland (12; 13).

Leptin is a hormone/cytokine produced mainly by adipocytes in direct proportion to whole-body fat mass (14). However, it has been shown that leptin is also produced by the pituitary gland, skeletal muscle, placenta, stomach, thymus and epithelial cells of mammary gland 15 - 22]. Leptin regulates the energy availability in peripheral adipose tissue through specific hypothalamic signals and affects body weight, food intake, body temperature and metabolic rate (14).

Accumulating evidence also supports a role for leptin in the regulation of adaptive immunity, at least in part, by the direct action of leptin on T cells (23; 24). Accordingly, db/db mice exhibit a precocious thymic atrophy with significant decrease in the secretion of the thymic hormone thymulin, by the thymic epithelium (25; 26). Moreover, ob/ob and db/db mice exhibit increased susceptibility to infection and decreased Th1-type responses. Likewise, the reduction in plasma leptin levels observed for humans and rodents subjected to caloric restriction correlates with



clinically significant T cell deficiency, impaired adaptive immune function, and markedly increased susceptibility to infection (27; 28; 29).

Leptin is also able to significantly inhibit thymic apoptosis in young rats, and this effect seems to be dependent on the expression of the long form of the ObR, but not on the activation of the receptor associated tyrosine-kinase JAK-2 (30).

In order to examine the effect of maternal protein malnutrition during lactation on the mounting of adaptive immunity of young offspring, we have studied the influence of maternal protein restriction during lactation on thymocytes of young progeny (30 days of age), as well as the role of the leptin on the encountered alterations.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and diet protocol*

Wistar rats obtained from animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) were housed in a controlled room ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) at 60% humidity and were maintained in an artificial dark-light cycle (light from 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). All procedures were approved and performed in accordance with guidelines established by our Institutional Ethics Committee and are in accordance with the National Institute of Health Animal Care Guidelines.

Three-month-old virgin female rats were mated, and pregnant dams, housed in individual cages, were fed *ad libitum* during gestation with a normal isocaloric diet containing 22% protein. Following delivery, each lactating dam was paired with 6 male pups and separated into two groups. The first group of dams received a protein-restricted diet (PRD), containing 8% protein during all lactation, whereas the second group was pair-fed with a normal diet containing 22% protein (NPD). Both diets were isocaloric and contained the same amount of vitamins and mineral salts (31). Supplementary Table 1 shows the compositions of the diets.

At the end of lactation (21 days post natally), offsprings from each group were housed in separate cages and subdivided in two groups, namely **Controls (C)**: offsprings from mothers that had received the NPD) and **Protein-Deprived (PD)**: offsprings from mothers that received the PRD during the lactation). Both groups

were then fed with a normal diet *ad libitum* until they were 30 days old. For all the experiments, young rats (between 28 and 32 days old) formed the C and PD matched-groups. In order to avoid litter effects, the adult animals used in all experiments were taken randomly from at least three different litters. The body weight of all animals was evaluated on the day of the experiments.

### **Reagents**

Leptin was acquired from Calbiochem (La Jolla, CA). RPMI, Trizol reagent and reagents for cell culture were purchased from Invitrogen Corp (Carsbad, CA). Ficcol Hypaque, PVDF membranes (Hybond – P) and rainbow markers were purchased from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, UK) and streptavidin from Caltag Laboratories.

Antibodies with specificity to the ObR (sc 8391), Jak-2 (sc 294), pJak-2 (sc 21870), STAT-3 (sc 8019), pSTAT-3 (sc 8059), I $\kappa$ B (sc 371), NF- $\kappa$ B (sc 372), Bad (sc 7869), Bcl-2 (sc 783), Bax (sc 6236), Caspase-3 (sc 7148), GR (sc 8992), histone (sc 8654) and actin (sc 8432) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Phycoeritrin (PE)-conjugated mouse anti-CD4, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled anti-CD8 monoclonal antibodies were from Biolegend (San Diego, CA).

Sense and antisense oligonucleotides specific for the Ob and ObRb were produced by Prodimol Biotechnology (Belo Horizonte, MG). All other reagents and chemicals were obtained from Sigma Aldrich.

### **Isolation of Thymocytes and thymic microenvironment**

Isolated thymocytes were obtained from **C** and **PD** rats. Briefly, after 12h fast, rats were sacrificed in the CO<sub>2</sub> chamber; thymuses were obtained, weighted and gently dissociated in incomplete RPMI through steel net. After dissociation, the thymic microenvironment retained on the steel net was used for PCR analysis and the cell suspension was layered over Ficcol Hypaque and centrifuged. Thymocytes thus isolated were resuspended in RPMI containing penicillin, streptomycin and 10% fetal calf serum and incubated to 37°C for 1-2 hours to adherence of macrophages. Under all experimental conditions, >97% of cells were viable as assessed by trypan blue dye exclusion. Total counting of thymocytes was made in Neubauer chambers.

### ***Immunoblotting***

To obtain the total cell extracts, isolated thymocytes ( $5 \times 10^6$  cells/mL) were lysed and proteins were extracted in 50 mM Hepes, 1 mM  $MgCl_2$ , 10 mM EDTA (pH=6.4), 1% Triton X-100, 2 mM Sodium Orthovanadate, 1  $\mu$ g/mL DNase, 0.5  $\mu$ g/mL RNase containing the following protease inhibitors: 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, 1  $\mu$ g/mL aprotinin and 1  $\mu$ g/mL soybean trypsin inhibitor (Sigma – St. Louis, MO).

Nuclear extracts were obtained as described earlier [32]. Briefly, isolated thymocytes ( $5 \times 10^6$  cells/mL) were lysed in ice-cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 1  $\mu$ g/mL aprotinin and 1  $\mu$ g/mL leupeptin), and after a 15-min incubation on ice, Nonidet P-40 was added to a final concentration of 0.5% (v/v). Nuclei were collected by centrifugation (1,800 g, 5 min at 4°C). The nuclear pellet was suspended in ice-cold buffer C (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/mL pepstatin, 1  $\mu$ g/mL aprotinin, 1  $\mu$ g/mL leupeptin, and 20% (v/v) glycerol) and incubated for 30 min. Nuclear proteins were collected in the supernatant after centrifugation (13,000 g; 10 min at 4°C).

Total protein content of cell extracts and nuclear extracts were determined by Bradford's method (33). Samples were resolved to SDS-PAGE and proteins were transferred to PVDF membranes. Rainbow markers were run in parallel to estimate molecular weights. Membranes were blocked with Tween- PBS (0.1% Tween-20) containing 5% bovine serum albumin and incubated with a specific primary antibodies: anti-ObR (1:1000); anti-I $\kappa$ B (1:1000); anti-NF- $\kappa$ B (1:1000); anti-Bad (1:500); anti-Bcl2 (1:500); anti-Bax (1:500); anti-caspase3 (1:1000); anti-Jak2 (1:1000); anti-pJak2 (1:1000); anti-STAT3 (1:1000); anti-pSTAT3 (1:1000); anti-GR (1:1000). After extensive washing in Tween-PBS, PVDF sheets were incubated with the appropriate secondary biotin-conjugated antibody (1:10000) (Santa Cruz Biotechnology) for 1 h and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (1:10000). Immunoreactive proteins were visualized using the ECL system. Membranes were stripped with stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS and 100 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) and re-probed similarly with anti-actin or anti-histone antibody (1:1000). Films were scanned and semiquantitatively analyzed. . The cellular extracts and nuclear extracts were normalized to actin and histone levels

respectively. The bands were quantified by densitometry, using ImageJ 1.34s Software (NIH, USA).

### ***Leptin and Corticosterone measurements***

Animals were anesthetized with Ketamine (50 mg/Kg) and xylazine (20 mg/Kg). Blood was collected by cardiac puncture and serum levels of leptin and corticosterone were measured using appropriate ELISA kits (Peprotech - Rocky Hill, NJ and Cayman–Ann Arbor, MI; respectively), as precluded by the manufacturers.

### ***Thymocyte phenotyping and evaluation of apoptosis***

Thymocyte suspensions ( $1.0 \times 10^6$ /mL) in binding buffer were incubated for 20 min in the dark, at room temperature, with 100  $\mu$ L of the following panel of antibodies PE-CD4/FITC-CD8. Thereafter, cells were washed with binding buffer. A two color analysis was made using a FACSCalibur flow cytometry (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) and analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson Biosciences). The isotypes controls PE-IgG and FITC-IgG were used as negative controls.

Thymocytes isolated as described above, were also tested for apoptosis using the annexin V technique (34). Cell suspensions were washed with binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 1.8 mM CaCl) and incubated for 20 min with 100  $\mu$ L of Annexin V-FITC. After incubation, cells were stained with propidium iodide (PI - 100  $\mu$ g/mL) for necrosis exclusion. PI and annexin V binding were assessed by flow cytometry. A total of 10,000 cells were acquired. Unlabeled cells suspended in binding buffer were used as negative controls and for the determination of gates to be used in the apoptosis assays. Apoptotic cells were measured in the annexin V-positive propidium iodide-negative quadrant and divided by the total number of cells in the gated region.

### ***Thymocyte proliferation***

Thymocyte proliferation was evaluated by [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation (Fernandes et al., 2008). Briefly, isolated thymocytes from **C** and **PD** rats ( $1.0 \times 10^6$

cells/mL) were incubated onto 96-well plate in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum, 100 µg/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin, and stimulated for 24 hours with Concanavalin A (2 µg/mL) or Leptin (10 ng/mL) or Leptin + ConA, at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Proliferation was determined by liquid scintillation counting after the addition of 1 µCi/well [<sup>3</sup>H]-thymidine in the last 6 hours of incubation.

### **qRT-PCR**

Total RNA was extracted from isolated thymocytes ( $1.0 \times 10^7$  cells) or thymic microenvironment using TRIzol reagent according to the instructions of the manufacturer and quantified by spectrophotometry. After DNase treatment (RQ1 RNase-Free DNase; Promega, São Paulo, SP, Brazil), total RNA (2.0 µg) was reverse transcribed using moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase and oligo (dT) 15 primer. Quantitative real time PCR was performed in a Rotor gene Q using a SYBR-green fluorescence quantification system (Qiagen) to quantify amplicons. The standard PCR conditions were 95° for 5 minutes, then 35 cycles at 95°C (5 s) and 60°C (10 s) followed by the standard denaturation curve. Primers based on the sequence of *Rattus norvegicus* Ob (Gene bank accession n°: NM\_013076.3) were used to amplify a 81 bp Ob cDNA: sense: 5'-TCCTGTGGCTTTGGTCCTAT-3' and antisense: 5'-TGATGAGGGTTTTGGTGTC-3'; *Rattus norvegicus* ObR (Gene bank accession n°: AF\_287268) were used to amplify a 132 bp ObR cDNA: sense: 5'-CTGCTGGAGTCCCAAACAAT-3' and antisense: 5'-CATTCCCAAAGCAACAGTGG-3'; GAPDH primers were used to validate the cDNA (Gene bank accession n°: DQ\_403053) in each reaction: sense: 5'-TCAACGGGAAACCCATCACCATCT-3' and antisense: 3'-ACGACATACTCAGCACCAGCATCA-3'.

### **Statistical analysis**

The data were expressed as means  $\pm$  standard error and analyzed by the two-tailed unpaired Student's t test or analysis of variance (ANOVA). When appropriate, individual comparisons were subsequently tested with Bonferoni's t test for unpaired values, Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . The data were

analyzed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, USA).

## RESULTS

### ***Body weight, thymus weight and total number of thymocyte***

We have first investigated whether maternal protein deprivation (8% protein diet) during lactation affects the thymus and body weights of the young offspring (PD group). Table 1 shows that the body weight of young rats from the PD group is lower (~ 37%) compared to controls. Maternal protein deprivation during lactation also affected the thymus weight of offsprings, with a significant reduction (~ 27%) compared to controls. By contrast, no differences were detected in the body/thymus weights ratio or in the total number of thymocytes.

In agreement, we also observed that the number of thymocytes per mg tissue was similar in both groups, suggesting that maternal protein restriction model utilized does not cause severe damage in the offspring thymus.

### ***Serum leptin levels at 21<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days old***

Accumulating evidence supports a role for leptin in the regulation of adaptative immunity, at least in part, by the direct action on thymocytes (27; 35). Therefore, we measured circulating levels of this hormone/cytokine in PD group. Serum leptin levels were evaluated in the rats from PD- and C- groups. Confirming previous data (12) the leptin levels in 21-day-old animals were significantly higher (~ 100%) in rats from PD-group (Fig.1A). However, in 30-day-old rats there are no difference in the serum leptin levels between the groups (Fig. 1B).

### ***Leptin signaling pathways in thymocytes isolated from PD rats***

Since the most leptin actions are delivered through the activation of Ob receptor (ObR), we next evaluated the intracellular transduction pathways mediated by this protein on thymocytes isolated from PD- and C- rats. As despicted in Fig. 2 A,

the mRNA level of ObRb (long isoform) was similar in PD and control groups as assessed by quantitative real-time PCR. In addition, the expression of ObR was evaluated by western-blotting. As shown in Fig. 2B thymic cells isolated from PD rats showed an enhanced level expression of this receptor when compared to control. These results suggest a potential response to leptin signaling in thymocytes from PD group. We also evaluated the activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway in these cells. In basal condition, no significant difference was observed in the contents of pJAK2 and pSTAT3 (Fig. 2C and 2E) in thymocytes isolated from either PD or control groups. As expected, treatment of thymic cells with leptin for 1 hour enhanced the phosphorylation of JAK2 (C+Lep: ~1.5 vs PD+Lep: ~ 2.0-fold) and STAT3 (C+Lep: ~ 2.0 vs PD+Lep: ~ 3.2-fold) respectively in both groups, however, these increases were greater in PD group (Fig. 2D and 2F, respectively).

#### ***Thymocytes membrane surface markers:***

To investigate the hypothesis that maternal protein deprivation affects the maturation of thymocytes from young offspring, we evaluated the expression of membrane surface markers in these cells isolated from C- and PD- groups. We observed a similar percentage of CD4: CD8 T cells population between the groups and the leptin incubation for 24 hours did not alter this profile (Fig. 3).

#### ***Spontaneous apoptosis of thymocytes isolated from PD rats:***

Several studies had demonstrated that leptin exerts a potent anti-apoptotic effect on thymic cells by up-regulating prosurvival signaling (30; 36; 37). Here, we evaluated the early apoptotic events by measuring the exposure of phosphatidylserine on plasma membranes by flow cytometric analysis, using annexin V-FITC/PI. Thymocytes isolated from PD- and C- group were incubated for 24 hours in the presence or absence of 10 nM leptin. As shown in fig. 4A, in basal conditions, there was a lower Annexin V-FITC staining in the PD cells when compared to controls (~58%). In addition, the incubation with leptin (24 h) clearly protected the thymocytes from apoptosis in both groups.

***Cell viability of thymocytes isolated from PD rats:***

To confirm the above data, we tested the viability of the cells by trypan blue dye exclusion. After 24-h incubation, no difference in the cell viability was observed between thymocytes isolated from C- and PD- rats (in the presence or absence of leptin – 10 nM) (Fig. 4B). We used dexamethasone as a positive control.

***Proliferative response of thymocytes isolated from PD rats:***

Because the higher rate of thymic cells survival could be related to an increased rate of proliferation in these cells, we assessed the proliferative response by thymidine-H3 incorporation into DNA in PD- and C- thymocytes incubated for 24 h with or without 10 nM leptin. In baseline conditions, we observed no difference between the groups. Furthermore, leptin did not alter the proliferative response in thymocytes from any groups. As expected, stimulation with Con A (a proliferation inducer) for 24 hours, markedly increased the proliferation in both groups (about 3-fold). The simultaneous incubation with leptin did not interfere in the proliferative capacity induced by Con A in any groups (Fig. 5).

***Pro and antiapoptotic protein expression in thymocytes isolated from PD rats:***

We also evaluated the expression of anti apoptotic (Bcl-2) and pro apoptotic (Bad and Bax) and pro-caspase 3 proteins in thymocytes isolated from C- and PD-group after 24 h of leptin incubation. As noted in fig. 6A, in basal conditions, thymocytes isolated from PD rats presented higher levels of Bcl-2 as compared to controls (~100%). In these conditions, the expression of Bax was diminished (~ 57%) and we observed no significant difference in the Bad expression between the groups. Furthermore, we also detected an up-regulation of pro-caspase 3 (~ 93%), suggesting that caspase 3 is predominantly in inactive form.

***NF- $\kappa$ B pathway activation in thymocytes isolated from PD rats:***

NF- $\kappa$ B is a transcription factor present in the majority of cells. It had been described a direct involvement of the NF- $\kappa$ B pathway in cell survival signals



expression, including its ability to induce Bcl-2 (38). We next investigated the effects of maternal protein restriction during lactation on the activation of NF- $\kappa$ B in thymocytes from young offspring. To address this, the nuclear content of p65 NF- $\kappa$ B subunit in PD thymocytes was determined by Western blotting. As shown in the fig. 7, thymocytes from PD group (after 24 h of incubation), in contrast to control cells, exhibited a constitutive high nuclear content of NF- $\kappa$ B p65 subunit (about 50% of increase). Accordingly, at the same time point, thymocytes from PD rats presented lower I $\kappa$ B levels (42%) in the cytoplasm when compared to controls. The leptin incubation (24 h) had no effect either C or PD groups.

#### ***Corticosterone serum levels and glucocorticoid receptor expression in thymocytes isolated from PD rats:***

It had been described that in some malnutritional states, the imbalance between the production of leptin (which normally is decreased) and glucocorticoids hormones (which normally are increased) is at least partially responsible for thymocyte depletion and consequent atrophy of the organ (39). The serum corticosterone levels were evaluated in rats from C- and PD- groups. Any difference in the corticosterone levels was observed between the groups (Fig. 8A). We next asked whether GR translocation to the nucleus would be altered in thymocytes from PD group. We demonstrated by western blotting that either in basal state or after 24 hours of incubation, thymocytes from PD and C groups presented similar levels of GR nuclear expression, (Fig. 8B). As expected, leptin incubation (24 h) had no effect in GR translocation in any groups.

#### ***Maternal protein deprivation increases leptin gene expression in the thymic microenvironment of pups***

The thymic microenvironment plays an essential role in thymocyte development. Lam and Lu (2007) described that other cells, including lymphocytes can produce leptin, which may act in an autocrine/paracrine way in thymic microenvironment to modulate cellular responses. Given that circulating leptin levels at 30<sup>th</sup> day are similar in PD and C groups, we next asked whether thymocytes and/or the thymic microenvironment are able to produce this hormone. In figure 9, we

showed that thymic microenvironment isolated from PD group presented a higher mRNA level of db gene when compared to control group. We also evaluated the mRNA expression of ObR in the thymic microenvironment of these animals. We observed similar levels in the mRNA expression of leptin receptor in both groups (Fig. 9).

## DISCUSSION

In agreement with malnutrition experimental models (6; 8; 10; 12; 41; 42), we demonstrated that maternal protein deprivation during lactation promotes a significant reduction in the body weight (~ 37%) in young offspring (PD-group). It is frequently associated to an increased susceptibility to developing metabolic disorders during adulthood (43; 44).

Lymphoid atrophy has long been recognized as a prominent feature of malnutrition in animals and humans (45 - 49). Particularly, the thymus may be profoundly affected with respect to size, weight, cellular composition, and structure (28; 50; 51). Our findings showed that the thymuses from PD-rats are significantly reduced. Apparently, this is consequence of the animals' growth reduction, because the thymus weight loss is proportional to the body weight loss and we didn't observe alterations in the thymocyte number per mg tissue.

Contrary expectations, the maternal protein restriction model utilized does not seem to cause severe damages in the offspring thymus, suggesting that some factors could be involved in protecting it.

Malnutrition and/or nutritional stress during critical development periods are accompanied by significant metabolic and endocrine changes (6; 8; 10) that could potentially contribute to the alterations on immune response (10; 11). In this study, we point to leptin as a possible candidate, since a tight connection between thymic function in malnutrition and leptin activity in this tissue has been demonstrated, reinforcing the role for this hormone/cytokine in the connection between metabolic and immune function (28; 29; 52). Indeed, both animals and humans with defect in the leptin functions present important features of immunodeficiency, which include anomalous activity of the thymus and thymic atrophy (29). In this report, we observed that young animals' offspring from dams submitted a maternal protein

deprivation during early lactation present an increase of leptin secretion at 21 days of age, however at 30 days of age, we observed no difference in the serum leptin levels between PD- and C-groups. These results are compatible with previous observations (12).

In previous studies was demonstrated that dams from PD group presents hyperleptinemia on the last day of lactation (21 days of lactation) (53) suggesting that this hormone could be transferred to pups through the milk (54).

It has also suggested that dietary influences during development may affect the leptin sensitivity (55; 56). Rats overfed during early postnatal life showed a leptin – resistant state mediated by down-regulation of ObRb (57; 58). We showed that, although the similar mRNA for ObRb, thymocytes isolated from PD-group presented higher ObR protein expression when compared to controls. Additionally, we also evaluated the JAK2 and STAT3 activation. We observed that, after leptin stimulation, either pJAK2 or pSTAT3 expression are higher than control group. Therefore, it's possible to speculate that thymocytes from PD rats could have enhanced leptin sensitivity.

Thymocytes subpopulations at different stages of maturation are found in thymus and can be distinguished by their expression of cell-surface molecules, the most important of which are the CD4 and CD8 (59; 60). Thymocyte depletion appears as an outcome of both acute and chronic experimental protein malnutrition and the main phenotypic feature of this depletion is the loss of immature CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells (39). We not observe any alteration in the thymocyte subpopulation. This pattern of thymocyte subsets is in accordance with previous studies which have shown that the majority of cells in the thymus (80% to 90%) are CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and the remainders are composed of mature single-positive cells (CD4<sup>+</sup> SP or CD8<sup>+</sup> SP) and the double negative population (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), representing the most immature population which arises from stem cells (61; 62).

It has been postulated that leptin can significantly affect the differentiation of immature T cells inducing a more mature phenotype (35; 63; 64) However, our results demonstrated that leptin administration did not alter the thymocytes subsets either in control group or in PD animals. This could be explained by the absent of thymic microenvironment cells during in vitro experiments, which plays an essential role in thymocyte development (65; 66) In fact, a recent study showed that leptin alone may be insufficient for inducing differentiation of DP to either CD4 or CD8 SP

thymocytes, on the other hand, when leptin was incubated with thymic stromal cells, thymocytes DP were differentiated mainly into CD4 SP thymocytes (67).

It has been accepted that malnutrition – related thymic involution results from enhanced thymic cell death along with decreased T-cell proliferation and alterations in the thymic microenvironment (39; 68; 69). Nevertheless, the maternal protein restriction during lactation implicated a protective effect on the thymocytes, inducing a lower spontaneously apoptosis rate without altering the proliferative response. These results could be explained by increasing leptin activity.

Other studies demonstrated that leptin controls the survival of some lymphocytes population, predisposing or restraining the development of many diseases (70). This leptin function on the immune repertoire has been proposed to contribute to the defective immune response of nutrient-deprived individuals (71). In particular, leptin acts directly to inhibit the thymocytes apoptosis (28; 30; 72). Our data are in accordance with these findings, since after leptin incubation, thymocytes were clearly protected from apoptosis.

Given similarities in the JAK2 and STAT3 activation between C- and PD-groups, we supposed that this leptin classical pathway does not be involved in the inhibitory effect of leptin on the PD animals. Our findings are consistent with previous reports (30; 73) that showed in rodents, the capacity of leptin to inhibit the thymocytes apoptosis by dependent way of ObRb though, independent of JAK2 activation.

It's known that upon inhibition of the docking protein, IRS-1, or the enzyme, PI3-kinase, most of the apoptosis – leptin effects are suppressed (30). Therefore, we hypothesized the possibility that PI3K and IRS-1 could be mediate the leptin protective effect in thymocytes from PD-rats however; this possibility was excluded by detecting no difference in neither AKT or IRS-1 activation in basal or leptin stimulated conditions (data not shown). Further investigations have to be done to understand the mechanism involved in this effect.

Other hypothesis is that the apoptosis inhibition observed in thymocytes from PD- animals could be related to changes in pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins balance. It has been addressed the role of Bcl-2 family members in the T-cell development and different types of thymocytes programmed cell death (74 - 76). Bcl-2 overexpression protects thymocytes from multiple apoptotic stimuli (77) and it is expressed at high levels in mature thymocytes and peripheral T cells (76). The

molecular function of Bcl-2 is the inhibition of pro-apoptotic Bcl-2 family members, such as Bax (78). Moreover, Bax transgenic thymocytes showed an accelerated apoptosis in response to dexamethasone (79) and an *in vitro* study has showed an involvement of Bax and Caspase 3 in the 5-fluorouracil – induced apoptosis on murine thymocytes (80). Our results confirmed the above hypothesis, demonstrating that maternal protein deprivation during lactation induces Bcl-2 and reduces Bax expression in addition to inhibits caspase3 activation in thymocytes, inducing an anti-apoptotic phenotype.

In several cell types, NF- $\kappa$ B - dependent transcriptional activation regulates the transcription of antiapoptotic molecules that control the balance between survival and death signals (81 - 83) All thymocytes subsets present some constitutive NF- $\kappa$ B expression and notably, *ex vivo* NF- $\kappa$ B inhibition in isolated DN thymocytes triggers apoptosis (84), suggesting that NF- $\kappa$ B provides a survival signal. In our study, we showed a link between the decreased spontaneous apoptosis rate observed in PD thymocytes and the increased NF- $\kappa$ B activation, since this cells exhibited a constitutive higher nuclear content of p65 NF- $\kappa$ B subunit associated to a lower I $\kappa$ B content in the cytoplasm, compared to control. In previous study, we also demonstrated that NF- $\kappa$ B system is up-regulated in neutrophils isolated from adult offspring rats from dams submitted to severe (0% protein) protein deprivation during early lactation (11).

Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis is a feature of nutritional deprivation. The effects of glucocorticoids on the thymus are complex and their importance on the thymocytes survival is increasingly recognized (85 - 88). It's been known that glucocorticoids are very potent inducers of thymocytes apoptosis (89 - 92), acting through interaction with their receptor (GR) (93). Notably, the GR concentration is a major factor determining cellular sensitivity toward GCs (94 - 96). We have previously shown that adult rats submitted to severe maternal protein deprivation (0% protein) during the first days of lactation have high levels of circulating glucocorticoids (10). However, in the present study, the serum corticosterone levels were unchanged in young rats from PD group. Additionally, analyses from GR nuclear contents suggested that there aren't alterations in the GC activity in thymocytes from PD group.

In addition to the changes of lymphoid compartment, the thymic microenvironment is also affect in several malnutritional states (39; 97; 98). It has

recently been appreciated that primary lymphoid tissues, such as thymus, contains deposits of adipose tissue capable of producing leptin, which may act in an autocrine/paracrine way in the microenvironment to modulate cellular responses (99; 100). In our model, we observed a higher expression of mRNA for ob gene in the thymic microenvironment from PD animals.

Taken together, our results demonstrated that maternal protein deprivation during lactation induces an increased production of leptin by thymic microenvironment in young offspring, which act in a paracrine way in thymocytes protecting these cells from apoptosis without altering either proliferative response or subsets population.

The basis for these alterations is directly related to alterations in the expression of key proteins apoptosis-involving.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Dr. W. Savino (FIOCRUZ, Brazil) and Dr. H. Paula-Neto (University of Calgary, Canada) for the discussions of the manuscript. We also thank Mr. G.R. da Silva, Mrs. R. Tureta, Mr. J. dos Santos and Mr N. Rodrigues for their technical assistance. This work was supported by CAPES, CNPq and FAPERJ (Brazil).

**References:**

1. Gallou-Kabani C. and Junien C. 2005. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes*. 54(7):1899-906.
2. Delghingaro-Augusto V, Ferreira F, Bordin S, do Amaral ME, Toyama MH, Boschero AC, Carneiro EM. 2004. A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic cells. *J. Nutr.* 134(2):321-7.
3. Gnanalingham MG, Mostyn A, Symonds ME, Stephenson T. 2005. Ontogeny and nutritional programming of adiposity in sheep: potential role of glucocorticoid action and uncoupling protein-2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 289(5):R1407-15.
4. Agote M, Goya L, Ramos S, Alvarez C, Gavete ML, Pascual-Leone AM, Escrivá F. 2001. Glucose uptake and glucose transporter proteins in skeletal muscle from undernourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 281(5):E1101-9.
5. Gavete ML, Agote M, Martin MA, Alvarez C, Escrivá F. 2002. Effects of chronic undernutrition on glucose uptake and glucose transporter proteins in rat heart. *Endocrinology*. 143(11):4295-303.
6. Sampaio de Freitas M, Garcia de Souza EP, Silva SV, KaezerAR, Vieira RS, Moura AS, Barja-Fidalgo C. 2003. Up-regulation of phosphatidylinositol 3-kinase and glucose transporter 4 in muscle of rats subjected to maternal undernutrition. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1639(1): 8–16.
7. Lopes Da Costa C, Sampaio de Freitas M, Moura AS. 2005. Insulin secretion and GLUT-2 expression in undernourished neonate rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 15(4): 236–241.
8. Garcia-Souza EP, da Silva SV, Félix GB, Rodrigues AL, de Freitas MS, Moura AS, Barja-Fidalgo C. 2008. Maternal protein restriction during early lactation induces GLUT4 translocation and mTOR/Akt activation in adipocytes of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295(3):E626-36.
9. Ferreira F, Barbosa HC, Stoppiglia LF, Delghingaro-Augusto V, Pereira EA, Boschero AC, Carneiro EM. 2004. Decreased insulin secretion in islets from rats fed a low protein diet is associated with a reduced PKA $\alpha$  expression. *J. Nutr.* 134(1):63-7.
10. Barja-Fidalgo C, Souza EP, Silva SV, Rodrigues AL, Anjos-Valotta EA, Sannomyia P, De Freitas MS, Moura AS. 2003. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res*. 52(11):470-6.
11. Silva SV, Garcia-Souza EP, Moura AS, Barja-Fidalgo C. 2010. Maternal protein restriction during early lactation induces changes on neutrophil activation and TNF- $\alpha$  production of adult offspring. *Inflammation*. 33(2):65-75.

12. Teixeira CV, Passos M, Ramos C, Dutra S, Moura E. 2002. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem*. 13(8):493-8.
13. Vicente LL, de Moura EG, Lisboa PC, Monte Alto Costa A, Amadeu T, Mandarim-de-Lacerda CA, Passos MC. 2004. Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. *Nutrition*. 20(10):924-8.
14. Friedman JM. 2002. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev*. 60(10 Pt 2):S1-14; discussion S68-84, 85-7.
15. Señarís R, Garcia-Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF. 1997. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology*. 138(10):4501-4.
16. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature*. 394(6695):790-3.
17. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*. 393(6686):684-8.
18. Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. 1998. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab*. 83(5):1810-3.
19. Jin L, Burguera BG, Couce ME, Scheithauer BW, Lamsan J, Eberhardt NL, Kulig E, Lloyd RV. 1999. Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab*. 84(8):2903-11.
20. Sempowski GD, Hale LP, Sundry JS, Massey JM, Koup RA, Douek DC, Patel DD, Haynes BF. 2000. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and are associated with thymic atrophy. *J Immunol*. 164: 2180-2187.
21. Pond CM. 2000. Adipose tissue: quartermaster to the lymph node garrisons. *Biologist*. 47: 147-150.
22. Pond CM. 2000. Adipose tissue, the anatomists' Cinderella, goes to the ball at last, and meets some influential partners. *Postgrad. Med. J*. 76: 671-673.
23. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 394:897-901.
24. Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. 2000. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol*. 199:15-24.



25. Dardenne M, Savino W, Gastinel LN, Nabarra B, Bach JF. Thymic dysfunction in the mutant diabetic (db/db) mouse. *J Immunol.* 1983 130(3):1195-9.
26. Debray-Sachs M, Dardenne M, Sai P, Savino W, Quiniou MC, Boillot D, Gepts W, Assan R. Anti-islet immunity and thymic dysfunction in the mutant diabetic C57BL/KsJ db/db mouse. *Diabetes.* 1983 32(11):1048-54.
27. Howard JKG, Lord M, Matarese M, Vendetti S, Ghattei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom RS. 1999. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* 104: 1051-1059.
28. Savino W, Dardenne M, Velloso LA, Dayse Silva-Barbosa S. 2007. The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr.* 98 Suppl 1:S11-6.
29. Velloso LA, Savino W, Mansour E. 2009. Leptin action in the thymus. *Ann N Y Acad Sci.* 1153:29-34.
30. Mansour E, Pereira FG, Araújo EP, Amaral ME, Morari J, Ferraroni NR, Ferreira DS, Lorand-Metze I, Velloso LA. 2006. Leptin inhibits apoptosis in thymus through a janus kinase-2-independent, insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *Endocrinology.* 147(11):5470-9.
31. Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 123, 1939-1951.
32. Coelho AL, De Freitas MS, Mariano-Oliveira A, Oliveira-Carvalho AL, Zingali RB, Barja-Fidalgo C. 2001. Interaction of disintegrins with human neutrophils induces cytoskeleton reorganization, focal adhesion kinase activation, and extracellular-regulated kinase-2 nuclear translocation, interfering with the chemotactic function. *FASEB J.* 15(9):1643-5.
33. Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle –dye binding. *Anal Biochem.* 72, 48-54
34. Saldanha-Gama RF, Moraes JA, Mariano-Oliveira A, Coelho AL, Walsh EM, Marcinkiewicz C, Barja-Fidalgo C. 2010. alpha(9)beta(1) integrin engagement inhibits neutrophil spontaneous apoptosis: involvement of Bcl-2 family members. *Biochim Biophys Acta.* 1803(7):848-57.
35. Hick RW, Gruver AL, Ventevogel MS, Haynes BF, Sempowski GD. 2006. Leptin selectively augments thymopoiesis in leptin deficiency and lipopolysaccharide-induced thymic atrophy. *J. Immunol.* 177: 169–176.
36. Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, Masuzaki H, Tanaka M, Ozaki S, Nakao K, Mimori T. 2002. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 128: 21-26.

37. Najib S & Sanchez-Margalet V. 2002. Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway. *Cell. Immunol.* 220: 143–149.
38. Luqman S & Pezzuto JM. 2010. NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytother Res.* 24(7):949-63
39. Savino W. 2002. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr.* 56(Suppl 3):S46–S49
40. Lam QL & Lu L. 2007. Role of leptin in immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 4, 1–13.
41. Moura AS, Caldeira Filho JS, de Freitas Mathias PC, de Sá CC. 1997. Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 96(2):179-92.
42. Moura AS, Franco de Sá CC, Cruz HG, Costa CL 2002 Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. *Braz J Med Biol Res.* 35(5):617-22.
43. Hales CN. 1997. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance in adulthood: the "thrifty phenotype" hypothesis revisited. *Acta Paediatr Suppl.* 422:73-7. Review.
44. Fernandez-Twinn DS & Ozanne SE. 2010. Programming by Early Nutrition: An Experimental Approach. Early life nutrition and metabolic programming. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1212 78–96.
45. Good RA, West A, Day NK, Dong ZW, Fernandes G. 1982. Effects of Undernutrition on Host Cell and Organ Function. *Cancer Res.* 42(2 Suppl):737s-746s
46. Shankar AH & Prasad AS. 1998. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr.* 68: 447S–463S.
47. Prentice AM. 1999. The thymus: a barometer of malnutrition. *Br J Nutr.* 81:345
48. Yajima M, Hoshiba J, Terahara M, Yajima T. 2007. Reduced thymic size and numbers of splenic CD4+ and CD8+ cells in artificially reared mouse pups. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(10):2420-7.
49. Ortiz R, Cortés L, Cortés E, Medina H. 2008. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. *Clinical and Experimental Immunology.* 155: 96–106
50. Kuvibidila S, Dardenne M, Savino W, Lepault F. 1990. Influence of iron-deficiency anemia on selected thymus functions in mice: thymulin biological activity, T-cell subsets, and thymocyte proliferation. *Am J Clin Nutr.* 51: 228–232.
51. Pallaro AN, Roux ME, Slobodianik NH. 2001. Nutrition disorders and immunologic parameters: study of the thymus in growing rats. *Nutrition.* 17: 724–728.
52. Flier JS 1998 Lowered leptin slims immune response. *Nat Med.* 4: 1124–1125.

53. Lisboa PC, Passos MC, Dutra SC, Bonomo IT, Denolato AT, Reis AM, Moura EG. 2006. Leptin and prolactin, but not corticosterone, modulate body weight and thyroid function in protein-malnourished lactating rats. *Horm Metab Res.* 38(5):295-9.
54. Casabiell X, PiYeiro V, TomZ MA, Pein2 R, DiZguez C, Casanueva FF .1997. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potencial role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocr Metab.* 82: 4270–4273
55. Unger RH. 2002. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med.*;53:319-36. Review.
56. Krechowec SO, Vickers M, Gertler A, Breier BH. 2006. Prenatal influences on leptin sensitivity and susceptibility to diet-induced obesity. *J Endocrinol.* 189(2):355-63.
57. Myers MG Jr. 2004. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res.* 59:287-304.
58. López M, Seoane LM, Tovar S, García MC, Nogueiras R, Diéguez C, Señarís RM. 2005. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia.* 48(1):140-8.
59. Robey E & Fowlkes BJ. 1994. Selective events in T cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 12:675-705
60. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ. 1995. Positive selection of thymocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 13:93-126
61. Punt JA, Havran W, Abe R, Sarin A, Singer A. 1997. T cell receptor (TCR)-induced death of immature CD4+CD8+ thymocytes by two distinct mechanisms differing in their requirement for CD28 costimulation: implications for negative selection in the thymus. *J Exp Med.* 186(11):1911-22
62. Gruver AL, Sempowski GD. 2008. Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *J. Leukoc Biol.* 2008 84(4):915-23. Epub 2008 May 21. Review.
63. Palmer G, Aurrand-Lions M, Contassot E, Talabot-Ayer D, Ducrest-Gay D, Vesin C, Chobaz-Péclat V, Busso N, Gabay C. 2006. Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice. *J Immunol.* 177(5):2899-907.
64. Singer A, Adoro S, Park JH. 2008. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol.* 8(10):788-801.
65. Nitta T, Murata S, Ueno T, Tanaka K, Takahama Y. 2008. Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation. *Adv Immunol.*99:59-94. Review.
66. Boehm T. 2008. Thymus development and function. *Curr Opin Immunol.* 20(2):178-84.

67. Kim SY, Lim JH, Choi SW, Kim M, Kim ST, Kim MS, Cho YS, Chun E, Lee KY. 2010. Preferential effects of leptin on CD4 T cells in central and peripheral immune system are critically linked to the expression of leptin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 394(3):562-8. Epub 2010 Mar 17.
68. Lyra JS, Madi K, Maeda CT, Savino W. 1993. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J Pathol.* 171: 231–236
69. Poetschke HL, Klug DB, Perkins SN, Wang TT, Richie ER, Hursting SD. 2000. Effects of calorie restriction on thymocyte growth death and maturation. *Carcinogenesis.* 21: 1959–1964.
70. Matarese G, Di Giacomo A, Sanna V, Lord GM, Howard JK. 2001, Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmuneencephalomyelitis. *J Immunol.* 166: 5909–5916.
71. La Cava A & Matarese G. 2004. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 4: 371–379.
72. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. 2005. Leptin in immunology. *J Immunol.* Mar 15;174(6):3137-42. Review.
73. Jiang L, Li Z, Rui L. 2008. Leptin stimulates both JAK2-dependent and JAK2-independent signaling pathways. *J Biol Chem.* 283(42):28066-73.
74. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. 1991. Bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell.* 67:879
75. Strasser A, Harris AW, von Boehmer H, Cory S. 1994. Positive and negative selection of T cells in T-cell receptor transgenic mice expressing a bcl-2 transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1376.
76. Williams O & Brady HJ. 2001. The role of molecules that mediate apoptosis in T-cell selection. *Trends Immunol.* 22(2):107-11. Review.
77. Chao DT & Korsmeyer SJ. 1998. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol.* 16:395-419.
78. Bouillet P & Strasser A. 2002. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci.* 115(Pt 8):1567-74..
79. Brady HJ, Salomons GS, Bobeldijk RC, Berns AJ. 1996. T cells from baxalpha transgenic mice show accelerated apoptosis in response to stimuli but do not show restored DNA damage-induced cell death in the absence of p53. *EMBO J.* 15(6):1221-30.
80. Aquino Esperanza JA, Aguirre MV, Aispuru GR, Lettieri CN, Juaristi JA, Alvarez MA, Brandan NC. 2008. In vivo 5-fluorouracil-[corrected]induced apoptosis on murine thymocytes: involvement of FAS, Bax and Caspase3. *Cell Biol Toxicol.* 24(5):411-22.

81. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M. 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*. 87(3):565-76.
82. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. 1996. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*. 274:787.
83. Valéro R, Baron ML, Guérin S, Béliard S, Lelouard H, Kahn-Perles B, Vialettes B, Nguyen C, Imbert J, Naquet P. 2002. A defective NF-kappa B/RelB pathway in autoimmune-prone New Zealand black mice is associated with inefficient expansion of thymocyte and dendritic cells. *J Immunol*. 169(1):185-92.
84. Voll RE, Jimi E, Phillips RJ, Barber DF, Rincon M, Hayday AC, Flavell RA, Ghosh S. 2000. NF-kB activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity*. 13:677-689.
85. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM. 2006. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci*. 63(1):60-72. Review
86. Bruscoli S, Di Virgilio R, Donato V, Velardi E, Baldoni M, Marchetti C, Migliorati G, Riccardi C. 2006. Genomic and non-genomic effects of different glucocorticoids on mouse thymocyte apoptosis. *Eur J Pharmacol*. 529(1-3):63-70. Epub 2005 Dec 1.
87. van den Brandt J, Lühder F, McPherson KG, de Graaf KL, Tischner D, Wiehr S, Herrmann T, Weissert R, Gold R, Reichardt HM. 2007. Enhanced glucocorticoid receptor signaling in T cells impacts thymocyte apoptosis and adaptive immune responses. *Am J Pathol*. 170(3):1041-53.
88. Bjelaković G, Stojanovic I, Jevtovic-Stoimenov T, Pavlović D, Kocić G, Kamenov B, Saranac L, Nikolić J, Bjelaković B, Sokolović D, Basić J. 2009. Thymus as a target tissue of glucocorticoid action: what are the consequences of glucocorticoids thymectomy? *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 20(2):99-125. Review.
89. Wyllie AH. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 284:555-556
90. Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Pálinkás L, Szabó M, Berta G, Sétáló G Jr, Németh P, Berki T. 2009. Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis. *Int Immunol*. 21(11):1269-76.
91. Smith LK, Shah RR, Cidlowski JA. 2010. Glucocorticoids Modulate MicroRNA Expression and Processing during Lymphocyte Apoptosis. *J Biol Chem*. 285(47):36698-708.
92. Wang D, Müller N, McPherson KG, Reichardt HM. 2006. Glucocorticoids engage different signal transduction pathways to induce apoptosis in thymocytes and mature T cells. *J Immunol*. 176(3):1695-702.
93. Pazirandeh A, Jondal M, Okret S. 2004. Glucocorticoids delay age-associated thymic involution through directly affecting the thymocytes. *Endocrinology* 145:2392-2401

94. Reichardt HM, Umland T, Bauer A, Kretz O, Schutz G. 2000. Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. *Mol Cell Biol.* 20:9009–9017.
95. Pazirandeh A, Xue Y, Prestegard T, Jondal M, Okret S. 2002. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T-cell lineage on thymocyte and T-cell homeostasis. *FASEB J.* 16:727–729
96. Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. 2004. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ.* 11:S45–S55
97. Mittal A & Woodward B. 1985. Thymic epithelial cells of severely undernourished mice: accumulation of cholesteryl esters and absence of cytoplasmic vacuoles. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 178, 385 – 391.
98. Savino W & Dardenne M. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr Rev.* 21, 412 – 443.
99. Yang H, Youm YH, Dixit VD 2009 Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J Immunol.* 183(5):3040-52.
100. Youm YH, Yang H, Sun Y, Smith RG, Manley NR, Vandanmagsar B, Dixit VD. 2009. Deficient ghrelin receptor mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *J. Biol. Chem.* 284:7068–7077

## LEGENDS

**Fig. 1:** The effect of maternal protein deprivation during lactation on serum leptin concentration from young offspring. Blood samples were collected from C and PD animals at 21days (A) or 30 days (B) and centrifuged. Serum was collected and leptin levels were determined by ELISA. Results are expressed as means  $\pm$  S.E of 8-12 animals/group. \*,  $P < 0.05$  compared to control group.

**Fig. 2:** Thymocytes isolated from PD- rats present similar ObRb mRNA and ObR expression in basal conditions and increase of JAK2 and STAT3 activation after leptin incubation. (A) Total RNA was harvested and analyzed by qRT-PCR for ObRb mRNA. The result was normalized by GAPDH. The results were expressed as expression related to control. (B, C and E) Thymocytes from C and PD animals were isolated and ObR, pJAK-2 and pSTAT-3 protein expression were assessed in total extracts by Western blotting analysis. (D and F) Thymocytes isolated from C and PD rats were incubated in the presence or absence of leptin (10 nM) for 1 hour and pJAK-2 and pSTAT3 protein expression were assessed in total extracts by Western blotting analysis. Quantification of bands is expressed in arbitrary units. Values are means  $\pm$  S.E of 6-10 animals/group. \*,  $P < 0.05$  compared to control group; <sup>a</sup>,  $p < 0.05$  compared to PD group and; <sup>b</sup>,  $P < 0.05$  compared to C+Leptin group.

**Fig. 3:** Effect of maternal protein deprivation during lactation on thymocytes maturation from young offspring. Representative flow cytometry analysis of CD4 and CD8 thymocytes subsets for C and PD animals. Numbers within the graphs represent the proportion of CD4 SP; DP, CD8 SP or DN cells in each group. The graphic represent one experiment of three realized. N=6.

**Fig. 4:** Thymocytes isolated from PD- rats present inhibition of baseline apoptosis after 24 hour of incubation. (A) Apoptosis of thymocytes was evaluated by determination of annexin V expression by flow cytometry. (B) Thymocytes from C and PD group were incubated in the presence or absence of leptin (10nM) for 24 h. After incubation, the cells were incubated with Trypan blue (1:20) and counted in Neubauer chamber. Results are expressed as means  $\pm$  S.E of 6—10 animals /group.

\*,  $P < 0.05$  compared to control group; <sup>a</sup>,  $p < 0.05$  compared to PD group and; <sup>b</sup>,  $P < 0.05$  compared to C+Leptin group.

**Fig. 5:** Maternal protein deprivation during lactation does not affect the thymocytes proliferation from young offspring. Thymocytes were cultured with the indicated stimulus for 24 hours. [ $H^3$ ] thymidine was pulsed for the last 6 hours. Results are expressed as means  $\pm$  S.E of 6 — 12 animals /group. \*,  $P < 0.05$  compared to respective basal condition.

**Fig. 6:** Thymocytes isolated from PD- rats present alterations in the pro- and anti-apoptotic protein levels. Thymocytes isolated from C and PD rats were incubated in the presence or absence of leptin (10 nM) for 24 hours, and Bcl-2, Bad, Bax, procaspase and actin protein expression were assessed in total extracts by western blotting analysis. Quantification of bands is expressed in arbitrary units. Values are means  $\pm$  S.E of 6 animals/group. \*,  $P < 0.05$  compared to control group.

**Fig.7:** Thymocytes isolated from PD- rats present NF-kB translocation to the nucleus in basal condition. Thymocytes isolated from C and PD rats were incubated in the presence or absence of leptin (10 nM) for 24 hours, and NF-kB and histone protein expression were assessed in nuclear extracts (A) and I $\kappa$ B and actin protein expression were assessed in cellular extracts (B) by Western blotting analysis. Quantification of bands is expressed in arbitrary units. Values are means  $\pm$  S.E of 6 animals/group. \*,  $P < 0.05$  compared to control group.

**Fig 8:** The effect of maternal protein deprivation during lactation on serum corticosterone concentration and GR translocation to the nucleus in young offspring. (A) Blood samples were collected from C and PD animals at 30 days of age and centrifuged. Serum was collected and corticosterone levels were determined by ELISA. (B) Thymocytes isolated from C and PD rats were incubated in the presence or absence of leptin (10 nM) for 24 hours, and GR and histone protein expression were assessed in nuclear extracts by Western blotting analysis. Quantification of bands is expressed in arbitrary units. Results are expressed as means  $\pm$  S.E of 6-10 animals/group.



**Fig.9:** Thymic microenvironment isolated from PD-rats presents a higher mRNA level of Ob gene. Total RNA was harvested and analyzed by qRT-PCR for Ob and ObRb genes mRNA. The results were normalized by GAPDH. The results were expressed as expression related to control. Values are means  $\pm$  S.E of 6 animals/group. \*,  $P < 0.05$  compared to control group.

**SUPPLEMENTARY TABLE 1:**  
**Composition of control and protein-restricted (8 %) diet**

	Control diet <sup>a</sup>	Protein-restricted diet <sup>b</sup>
<b>Ingredients (g/Kg)</b>		
Soybean + wheat	230.0	80.0
Corn starch	676.0	826.0
Soybean oil	50.0	50.0
Vitamin mix <sup>c</sup>	4.0	4.0
Mineral mix <sup>c</sup>	40.0	40.0
<b>Macronutrient composition (%)</b>		
Protein	23.0	8.0
Carbohydrate	66.0	81.0
Fat	11.0	11.0
Total energy (Kj/Kg)	17038.7	17038.7

<sup>a</sup> Standard diet for rats (Nuvilab – NUVITAL Nutrientes LTDA, Paraná, Brazil).

<sup>b</sup> The protein restricted diet was prepared in our laboratory using the control diet and replacing part of its protein with cornstarch. The amount of the latter was calculated so as to make up for the decrease in energy content due to protein restriction.

<sup>c</sup> Vitamin and mineral mix were formulated according to the American Institute of Nutrition 93-G recommendation for rodents diets (Reeves et al., 1993).

**TABLE 1: Body weight, thymus weight and total number of thymocytes in young rats from C- and PD- groups**

	C	PD
Body weight (g)	95.83 ±2.81	60.36 ±2.58*
Thymus weight (g)	0.41 ±0.01	0.30 ±0.02*
Relative thymus weight (mg/g)	0,0046 ±0,0004	0,0044 ±0,0003
Total number of thymocytes (x10 <sup>8</sup> )	4.03 ±0.33	3.42 ±0.29
Total number of thymocytes/thymus weight (x 10 <sup>5</sup> cells/mg of thymus)	0.98 ±0.08	1.08 ±0.09

Results are expressed as means ± SEM; n= 9-16. C – control; PD – protein deprivation. \* P< 0.05 compared with C group.

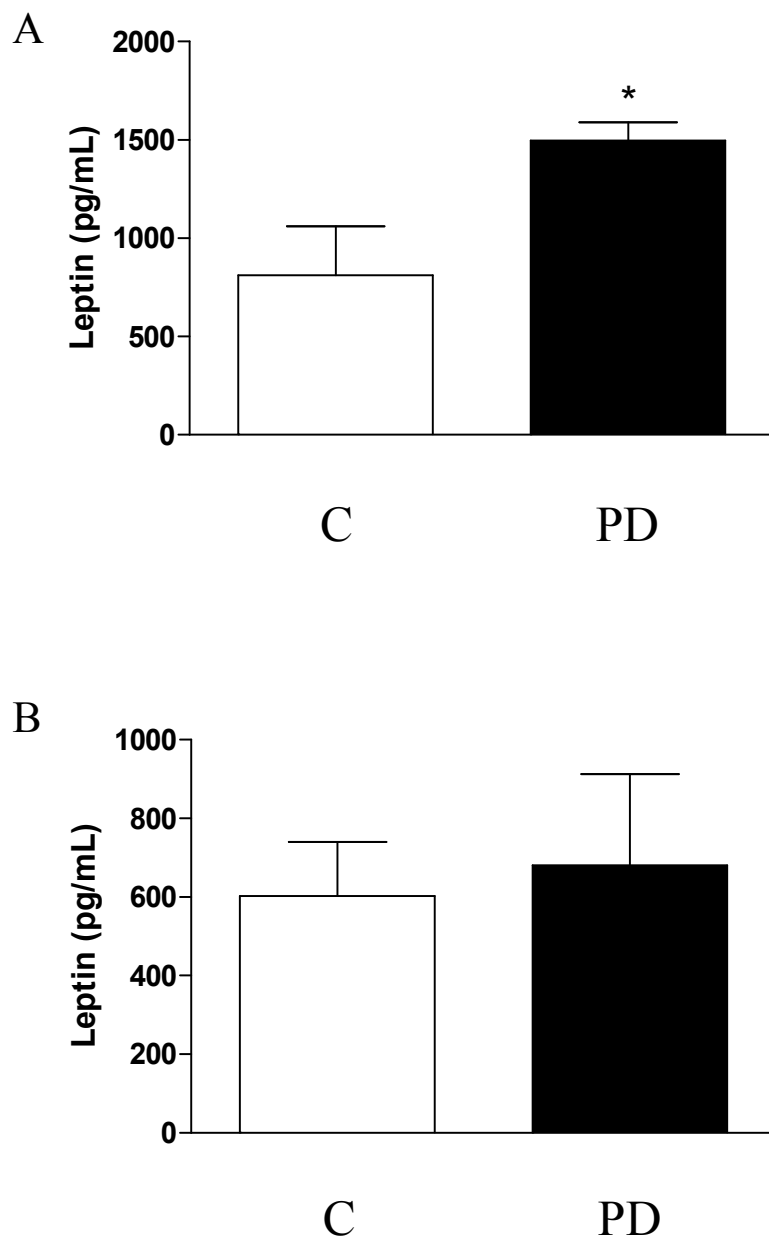


Figure 1  
Salama C *et al.*, 2010

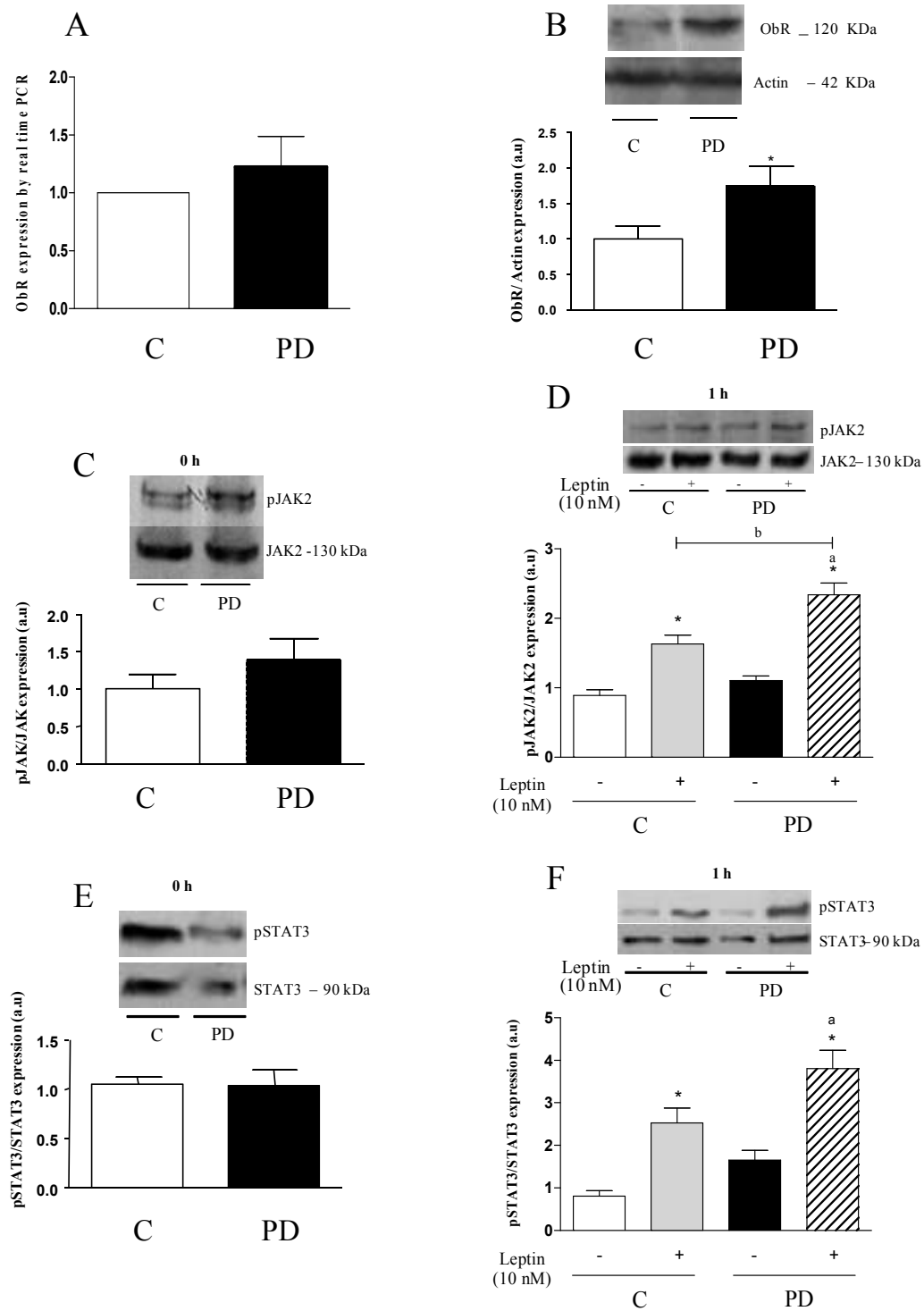


Figure 2  
Salama C *et al.*, 2010

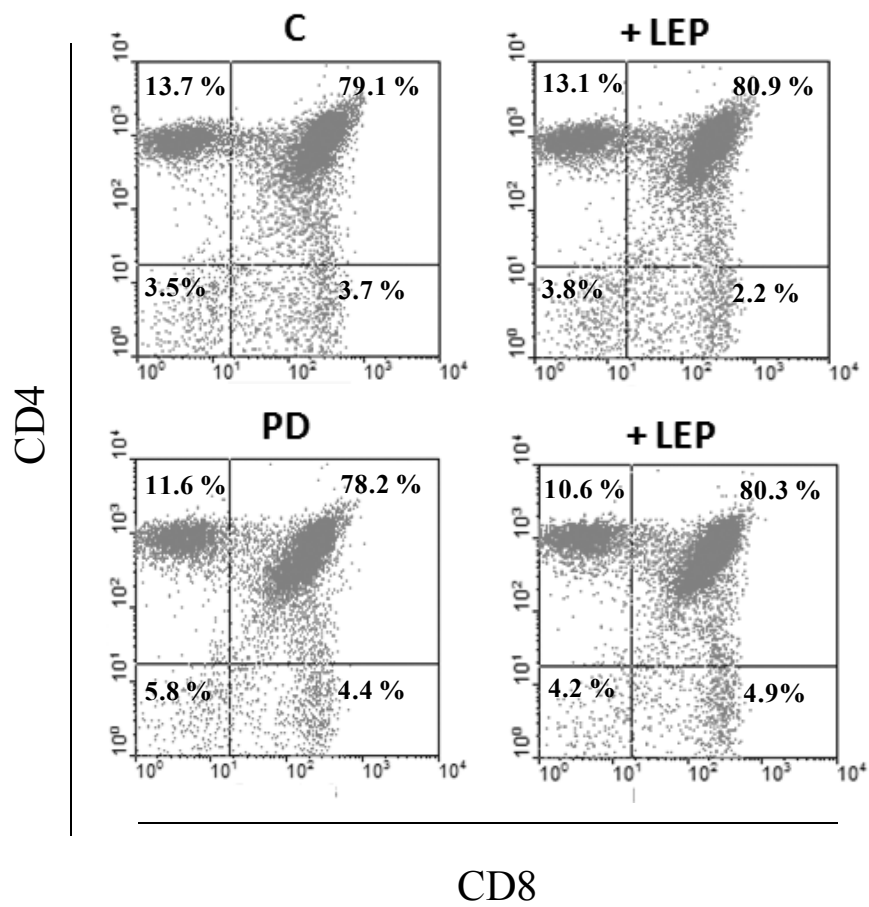


Figure 3  
Salama C *et al.*, 2010

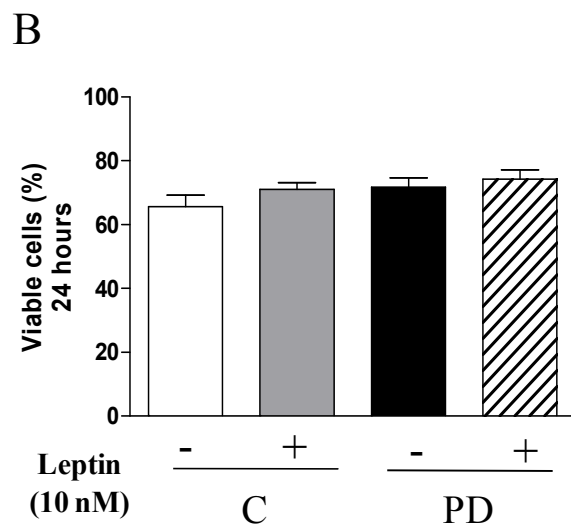
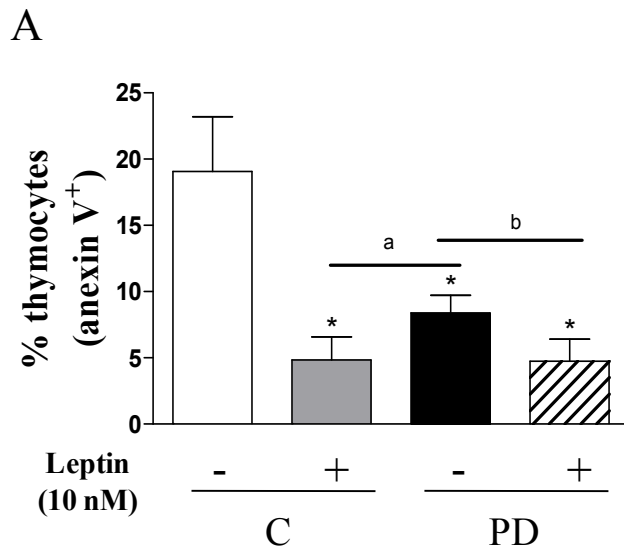


Figure 4  
Salama C *et al.*, 2010

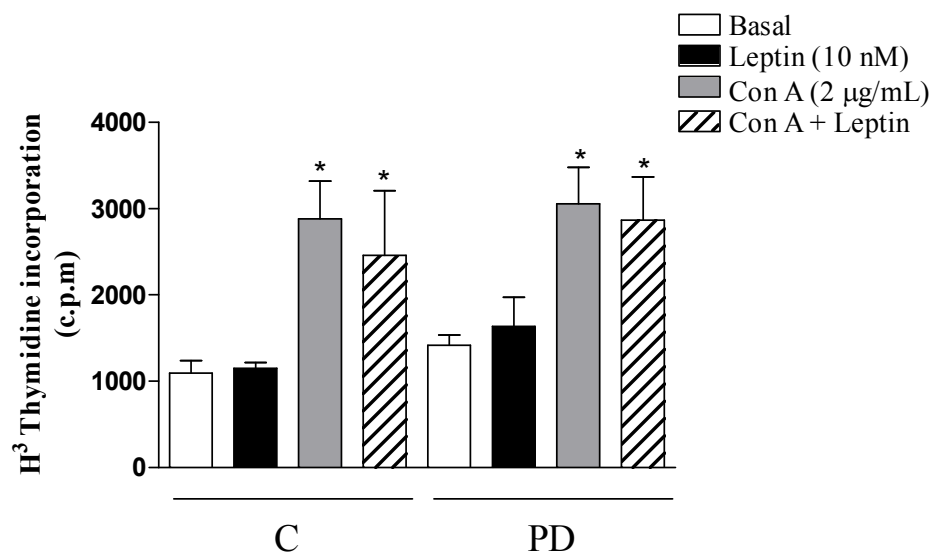


Figure 5  
Salama C *et al.*, 2010

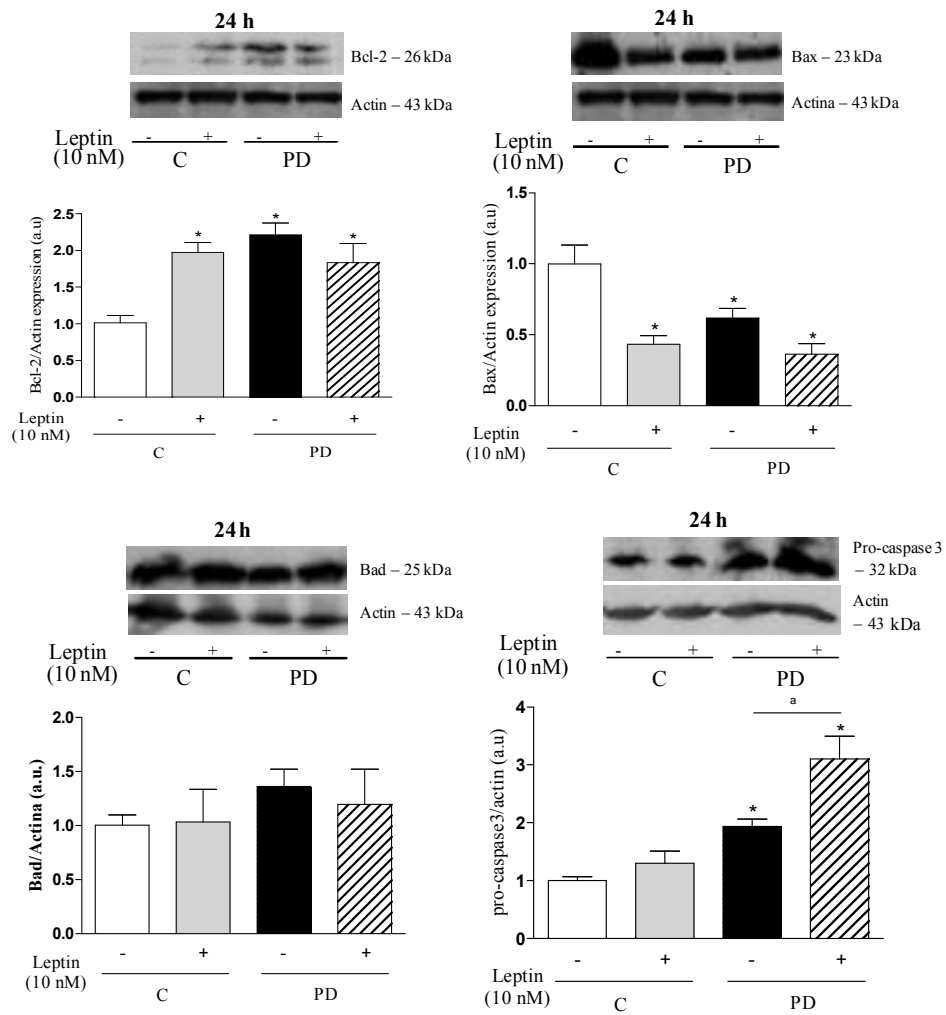


Figure 6  
 Salama C *et al.*, 2010



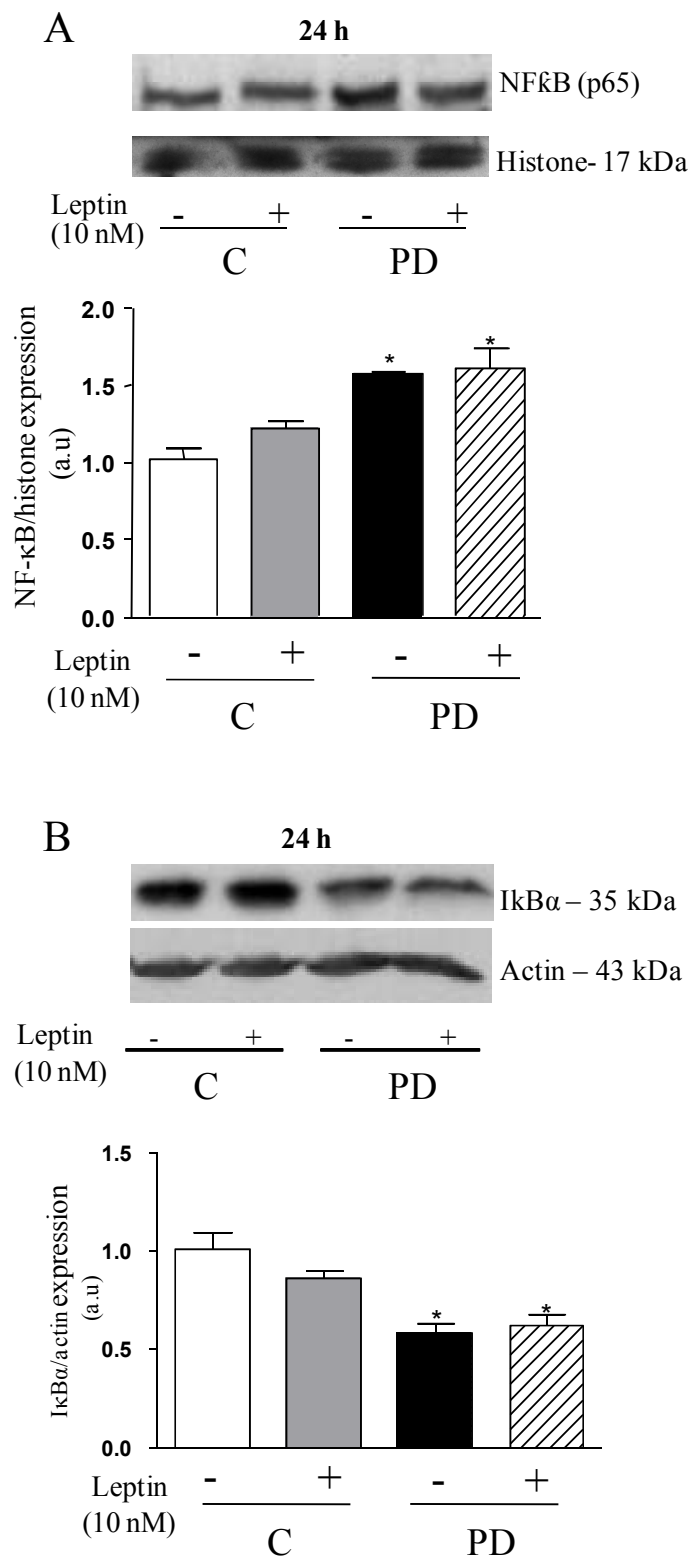


Figure 7  
Salama C *et al.*, 2010

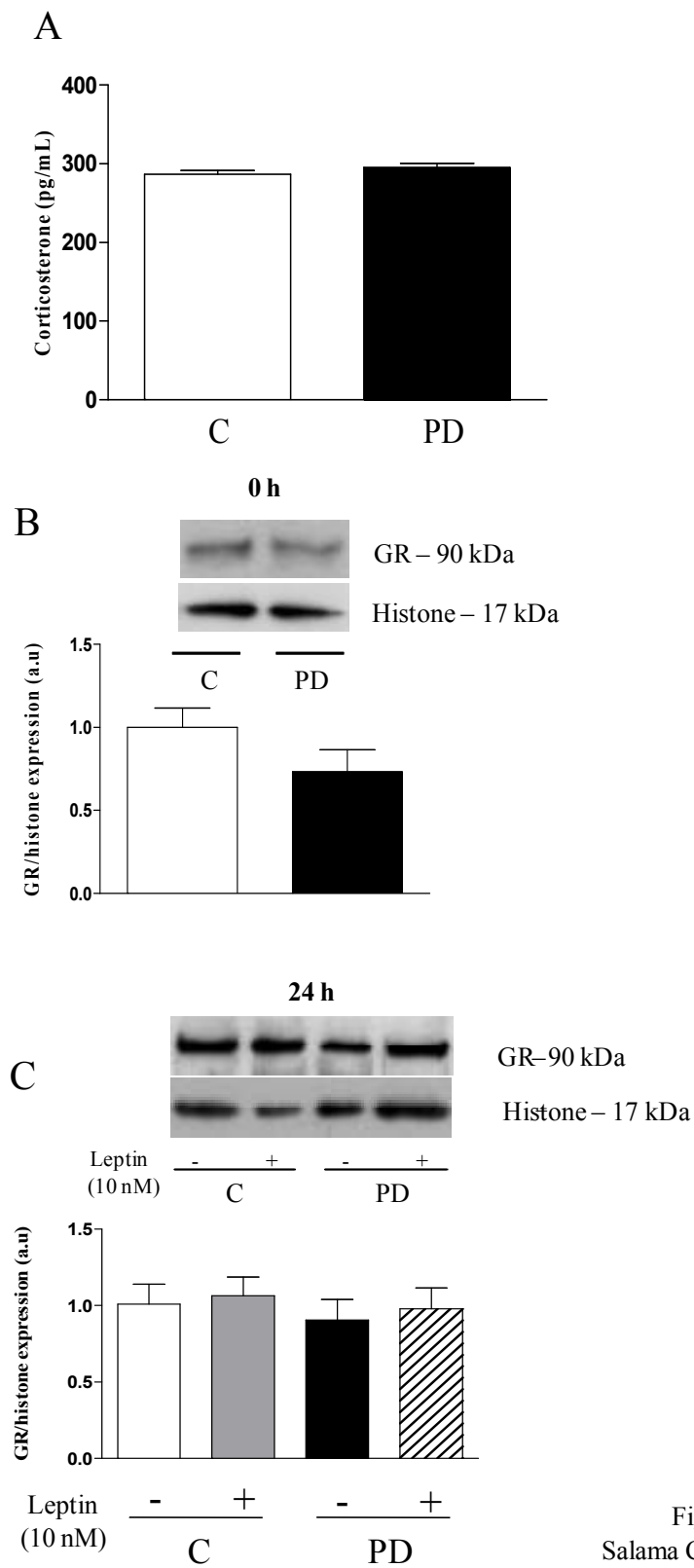


Figure 8  
Salama C *et al.*, 2010

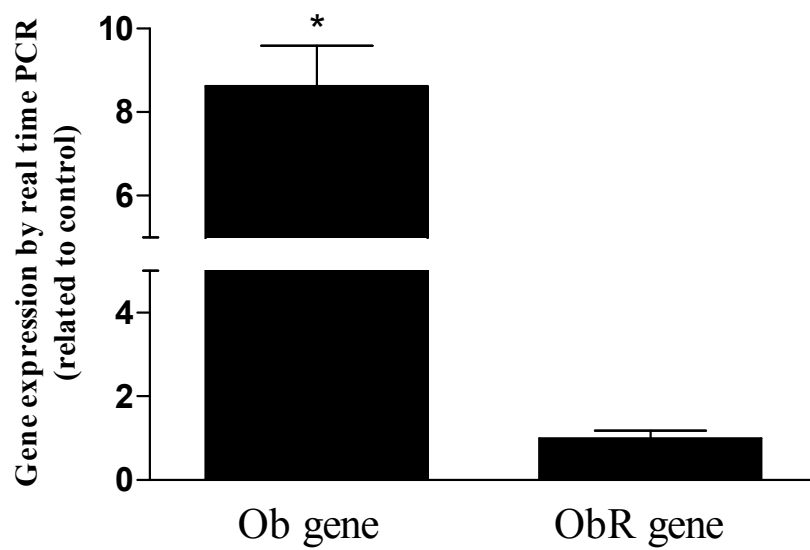


Figure 9  
Salama C *et al.*, 2010

**ANEXO – Certificado de aprovação do Comitê de ética em pesquisa**



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº CEA/047/2009 sobre "ESTUDO DAS ALTERAÇÕES DA RESPOSTA IMUNE EM ANIMAIS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTÉICA DURANTE O INÍCIO DA LACTAÇÃO", sob a responsabilidade de Thereza Chistina Barja-Fidalgo, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 09 / 09 /2009. Este certificado expira em 09 / 09 /2013.

Rio de Janeiro, 09 de Setembro de 2009.

Prof. Israel Felzenszwalb  
CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb  
Diretor  
IBRAG - UERJ  
Rua 34763-8

Profa. Patricia Cristina Lisboa  
CEA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva  
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ  
Matrícula 34763-8