



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Paula Affonso Ferreira Trotta

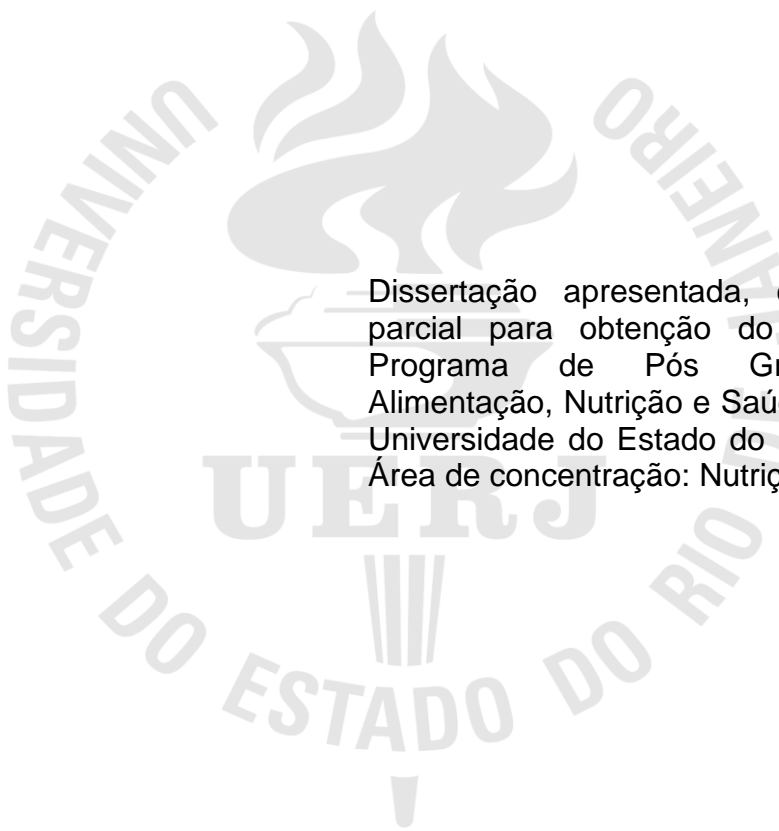
A Inibição do pico da secreção de leptina aos 30 dias reverte as alterações metabólicas em ratos programados pela leptina na lactação

Rio de Janeiro

2010

Paula Affonso Ferreira Trotta

A Inibição do pico da secreção de leptina aos 30 dias reverte as alterações metabólicas em ratos programados pela leptina na lactação



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de, ao Programa de Pós Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Nutrição.

Orientadora: Magna Cottini da Fonseca Passos

Co-orientador: Egberto Gaspar de Moura

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

T858 Trotta, Paula Affonso Ferreira.
A inibição do pico da secreção de leptina aos 30 dias reverte as alterações metabólicas em ratos programados pela leptina na lactação / Paula Affonso Ferreira Trotta - 2010.
73 f.

Orientadora : Magna Cottini da Fonseca Passos.
Co-orientador : Egberto Gaspar de Moura.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição.

1. Leptina - Metabolismo - Teses. 2. Lactação – Teses. 3. Hormônios – Teses. I. Passos, Magna Cottini da Fonseca. II. Moura, Egberto Gaspar de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. III. Título.

CDU 613.24

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

Assinatura

Data

Paula Affonso Ferreira Trotta

A Inibição do pico da secreção de leptina aos 30 dias reverte as alterações metabólicas em ratos programados pela leptina na lactação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós Graduação em Alimentação, Nutrição e saúde da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Nutrição.

Aprovada em 19 de março de 2010

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Magna Cottini da Fonseca Passos
Instituto de Nutrição – UERJ

Prof^a. Dr^a. Carmen Cabanelas Pazos de Moura
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ

Prof^a. Dr^a. Thereza Christina B. F. Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

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

Prof^a. Dr^a. Karen de Jesus Oliveira e Sanches
Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense – UFF

Rio de Janeiro

2010

DEDICATÓRIA

À família nossa base

Aos amigos nossa companhia

À Deus aquele que nos fortalece

AGRADECIMENTOS

À Professora Magna Cottini não só pelos ensinamentos, atenção, paciência e compreensão por todo o período em que estive sob sua orientação, durante o curso de mestrado e durante toda a minha iniciação científica, mas também pela oportunidade de conhecer e trabalhar com uma grande profissional.

Ao Professor Egberto Gaspar de Moura, pelas idéias sempre boas e originais, pela atenção, ajuda e dedicação à pesquisa.

À Professora Patrícia pelo apoio e ajuda durante todo o desenvolvimento do meu trabalho.

À Professora Elaine, às minhas “veteranas” de LFE Mari, Isis e Aline Troina, por sempre estarem ao alcance das minhas inúmeras dúvidas e dispostas a solucioná-las.

À Professora Carmen e aos alunos do Laboratório de Endocrinologia Molecular, pela colaboração nos experimentos e nas análises de SIRT1.

Às amigas Aninha, Nate, Jú, Jéssica, Cíntia e Aline Rios por toda a força nos momentos difíceis, pela ajuda e disposição nos experimentos, pelo companheirismo e por toda a amizade durante estes anos.

Aos alunos de IC Mylena, Gustavo, Sheiná, Guilherme e Ellen, indispensáveis ao desenvolvimento do meu trabalho.

Aos funcionários e técnicos Lauciene e Ulisses, pela colaboração. E ao bioterista Carlos Alberto, pelo cuidado com os animais e organização do biotério.

À minha mãe, Djanira e ao meu irmão Thiago por todo suporte, amor e paciência, sem eles eu nunca teria conseguido chegar até aqui.

Ao Artur, pelo amor, amizade, compreensão e principalmente por estar ao meu lado.

À Deus aquele que nos ilumina e nos põe em pé, aquele que nos dá a alegria de viver e continuar a trilhar nosso caminho.

Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis, Heterônimo de Fernando Pessoa

RESUMO

TROTTA, Paula Affonso. *A Inibição do pico da secreção de leptina aos 30 dias reverte as alterações metabólicas em ratos programados pela leptina na lactação*. 2010. 73f. Dissertação (Mestrado em Nutrição, Alimentação e Saúde) _ Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A hiperleptinemia na lactação programa para maior leptina sérica em ratos aos 30 e aos 180 dias de vida, maior massa corporal e alterações metabólicas relacionadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a inibição da leptina sérica aos 29 e 30 dias de idade sobre o fenótipo de animais programados pela leptina na lactação. A prole de ratos Wistar foi submetida a injeções subcutâneas de solução salina (grupo controle – C) ou de solução de leptina (8µg/100g PC) (grupo leptina – L) do dia 1 após o nascimento até o dia 10. Aos 29 e 30 dias de vida, ambos os grupos receberam injeções de anticorpo para leptina (3µg/100gPC, grupos CA e LA) ou solução salina (grupos LS e CS). Aumentos de massa de gordura visceral (VFM) (+53%) e gordura corporal total (TFM) (+33%), hiperleptinemia (+67%), hipertigliceridemia (+47%) e menor adiponectinemia (-44%) observados nos animais LS em comparação ao grupo CS, foram prevenidos pela imunoneutralização da leptina, já que o grupo LA apresentou resultados similares ao grupo CS, nestes parâmetros. Porém o bloqueio da leptina em ratos normais desencadeia as mesmas alterações metabólicas observadas nos animais tratados com leptina na lactação, e ainda em redução da adiponectina sérica (-74% versus CS) e aumento no índice de resistência a insulina (+37%). A SIRT1 hepática, uma histona deacetilase, está aumentada apenas no grupo LA, sugerindo que esta proteína desempenha um papel nesta prevenção envolvendo mecanismos epigenéticos. Portanto, estes dados sugerem que a semana após o desmame também é um período crítico para a programação metabólica e que tanto a redução quanto o aumento nas concentrações de leptina programam para um fenótipo metabólico desfavorável na vida adulta. Notavelmente, a inibição dos efeitos da hiperleptinemia em animais de 30 dias impede a maioria das alterações metabólicas desfavoráveis relacionadas à programação com leptina, o que representa uma estratégia promissora para a prevenção ou tratamento destas disfunções metabólicas.

Palavras-chave: Leptina. Hiperleptinemia. Programação.

ABSTRACT

Hyperleptinemia during lactation programs for higher serum leptin in 30 and 180 days old rats, higher body mass and related metabolic changes. Our aim was to evaluate the inhibition of serum leptin at 29 and 30 days old on the metabolic phenotype of rats programmed with leptin during lactation. Pups from Wistar rats were saline-injected (C) or leptin-injected (L – 8µg/100g BW) from 1 to 10 postnatal days. At 29 and 30 days old the animals from both groups were injected with anti-leptin antibody (3µg/100gPC – LA and CA) or saline (LS and CS). The higher visceral (VFM) (+53%) and total fat mass (TFM) (+33%), hyperleptinemia (+67%) hypertriglyceridemia (+47%) and lower adiponectinemia (-44%) observed in LS group compared to CS were prevented by immunoneutralization of leptin, since LA group had those parameters values similar to CS group. However, the immunoblockade of leptin in normal animals led to the same metabolic changes seen in leptin-treated animals, in addition to a lower serum adiponectin (-74% versus CS) and higher insulin resistance index (+37%). Hepatic SIRT1, a histone/protein deacetylase, was higher (+41%) only in LA group, suggesting a role for SIRT1 and possible epigenetic mechanisms in prevention of leptin programming. Therefore, our data suggest that one week after weaning is also a critical period for metabolic imprinting and that either lack or excess of leptin programs for unfavorable metabolic phenotype at adulthood. Remarkably, inhibitions of hyperleptinemia effects in 30 day-old rats abolish most of the leptin-programmed unfavorable metabolic phenotype, which represents a promising strategy for prevention or treatment of these metabolic dysfunctions.

Keywords: Leptin. Hyperleptinemia. Programming.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
ENDEF	Estudo Nacional de Despesa Familiar
ER	Energy Restriction (Restrição Energética)
FOXO-1	Forkhead box-containing protein type O 1
FOXO-3	Forkhead box-containing protein type O 3
Grupo C	Grupo controle
Grupo CA	Grupo Controle Anticorpo
Grupo CS	Grupo Controle Salina
Grupo L	Grupo Leptina
Grupo LS	Grupo Leptina Salina
Grupos LA	Grupo Leptina Anticorpo
HTs	Hormônios da Tireóide
IL-6	Interleucina 6
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido)
OBRa	Isoforma curta do receptor OB
ObR-Ab	Anticorpo para o receptor OB
OBRb	Isoforma longa do receptor OB
OBRs	Receptor OB
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Peso Corporal
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (Coativador 1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxisomos)
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPAR γ	Peroxisome proliferator activated receptor γ (Receptor ativado por proliferadores de peroxisomos)
PR	Protein Restriction (Restrição Protéica)
RIE	Radioimunoensaio
SIR	Silent Information Regulator (regulador da informação)

	silenciosa)
SIRT1	Sirtuína 1
SIRT2	Sirtuína 2
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3 (Proteína supressora de sinalização de citocina 3)
TAB	Tecido Adiposo Branco
TAV	Tecido Adiposo Visceral
TFM	Total Fat Mass (Massa de Gordura Total)
TNF α	Tumor necrosis factor α (Fator de Necrose Tumoral α)
TSH	Hormônio Estimulante da Tireóide
UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2 (Proteína desacopladora mitocondrial 2)
VFM	Visceral Fat Mass (Massa de Gordura Visceral)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1	Obesidade	14
1.2	Programação metabólica	16
1.3	Resistência a leptina	18
1.4	Inibição da leptina	21
1.5	Sirtuína 1	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Conteúdo Corporal Total de Gordura	29
3.2.	Tecido Adiposo Visceral (TAV)	29
3.3	Análises séricas	30
3.4	Expressão de SIRT 1 no fígado - Análise de Western blot	30
3.5	Análise estatística	31
4	RESULTADOS (São apresentados no artigo em anexo)	32
5	DISCUSSÃO	32
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO - Artigo científico	48

INTRODUÇÃO

Estudos relacionados ao desenvolvimento e seus efeitos sobre o surgimento de doenças na idade adulta são mundialmente reconhecidos e existem cada vez mais resultados, de diversos autores, mostrando como alterações nutricionais, hormonais e ambientais no início da vida repercutem no desenvolvimento e no surgimento de doenças na vida adulta (Moura et al., 2008, Moura & Passos, 2005), já que o crescimento alterado, excessivo ou prejudicado, durante períodos de plasticidade, mesmo após o nascimento, pode levar a programação permanente dos sistemas fisiológicos (Cotrell & Ozanne, 2008).

A obesidade e as doenças metabólicas têm se tornado um problema de saúde pública na sociedade moderna e são comumente atribuídas ao estilo de vida e fatores dietéticos, ou seja, maior sedentarismo e ingestão de alimentos hipercalóricos. Entretanto, os mecanismos pelos quais os fatores ambientais modulam os sistemas fisiológicos que regulam o controle de peso e a etiologia das doenças metabólicas, as quais se manifestam na vida adulta, podem ter suas origens antes do nascimento. O suporte para a hipótese da “origem fetal” foi baseado em estudos epidemiológicos nos quais o peso ao nascer foi relacionado a desordens metabólicas e hipertensão na idade adulta (Barker, 1988; Barker & Osmond, 1988). Assim, os fetos tendem a adaptar seu metabolismo e estrutura aos eventos à que são expostos durante a vida intra-uterina e isto pode ser a origem dos inúmeros distúrbios apresentados durante a vida, entre eles, além da obesidade, estão as doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes tipo II (Osmond & Barker, 2000).

Restrições calóricas durante a gravidez ou no início da vida, também estão relacionadas com a programação. Em 1976, Ravelli e seu grupo testaram a hipótese de que restrições alimentares em períodos críticos do desenvolvimento influenciariam a massa corporal na vida adulta, sobre um estudo de coorte em homens jovens, cujas mães foram expostas a fome holandesa durante a gestação e lactação (*“Dutch famine” – 1944/45*). Os resultados desta análise demonstraram que a restrição alimentar no final da

gravidez e nos primeiros meses de vida da criança, resulta em sobrepeso na vida adulta, afetando a diferenciação dos adipócitos, porém durante os primeiros meses de gravidez, a restrição alimentar alterou o desenvolvimento dos centros hipotalâmicos que regulam a ingestão e o crescimento, resultando em obesidade severa.

Por outro lado fatores socioeconômicos, níveis de escolaridade e a raça podem estar relacionados ao desenvolvimento da obesidade. O ambiente e os fatores sócios econômicos podem explicar mudanças no curso da obesidade, já que características individuais e a habitação prévia em ambientes carentes estão associadas ao desenvolvimento e a manutenção da obesidade (Sichieri & de Moura, 2009).

A leptina é uma proteína produzida pelo gene da obesidade (*ob*), secretada principalmente pelo adipócito, desempenha um papel importante na homeostase do peso corporal (Zhang et al., 1994; Halaas et al., 1995), reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético, através da ação sobre neurônios no núcleo arqueado do hipotálamo, aumentando a expressão de neuropeptídeos de ação anorexigênica e diminuindo a expressão de neuropeptídeos orexigênicos, retransmitindo esta informação a outras áreas do hipotálamo envolvidas na regulação da ingestão e do gasto energético (Lee et al., 2002; Bouret et al., 2004; Zhang & Scarpace, 2006).

As sirtuínas são histonas deacetilases que alteram a expressão de genes de acordo com o estado energético da célula, através da ação sobre NAD^+ (Feige & Auwerx, 2008). A descoberta do membro da família das sirtuína, SIRT1, está relacionada, em mamíferos e em outras espécies, ao aumento da longevidade em resposta a restrição calórica e pode ser resultante de sua ação na regulação do metabolismo (Guarente et al., 2006). A SIRT1 desempenha funções importantes como estimulação da lipólise, oxidação de lipídeos, atividade mitocondrial e gliconeogênese (Lagouge et al., 2006; Picard et al., 2004; Rodgers et al., 2005; Rodgers and Puigserver, 2007).

Em estudo realizado por Passos et al (2000), ratos cujas mães sofreram restrição calórica durante a lactação, tiveram aumento na sua massa corporal em relação ao grupo controle, já animais cujas mães sofreram restrição protéica apresentaram menor massa corporal, estes resultados foram

relacionados à diferença na composição lipídica e protéica do leite. Tanto a mãe quanto o filhote desnutrido apresentaram hiperleptinemia ao final da lactação (Lisboa et al., 2006; Teixeira et al., 2002). O nosso grupo demonstrou pela primeira vez na literatura (de Oliveira Cravo et al., 2002) que a hiperleptinemia, nos 10 primeiros dias de lactação, está associada ao aumento da leptina sérica aos 150 dias de idade e, paradoxalmente, a um aumento na ingestão alimentar e na massa corporal. Teixeira et al (2003), Toste et al (2006a) e Passos et al (2009) mostraram que o tratamento da prole com leptina, na lactação, programa para maior insulinemia e leptinemia, resistência à insulina, hiperglicemia e resistência a leptina já aos 30 dias de vida, através da redução dos níveis de OBRb e aumento nos níveis de SOCS3, perdurando estas alterações aos 150 dias de vida. Trevenzoli et al (2007) mostraram que o mesmo tratamento leva ao aumento na pressão arterial e aumento no conteúdo e secreção de catecolaminas pela medula adrenal em ratos adultos.

Assim, dando continuidade a estes estudos levantamos a hipótese de o bloqueio da leptina aos 29 e 30 dias de idade poderia reverter as alterações metabólicas em ratos adultos programados pela leptina na lactação. Também levantamos a questão de se este mesmo bloqueio poderia afetar os animais normais.

Para responder estas questões realizamos o presente estudo onde administramos nos animais, com 29 e 30 dias de idade, o anticorpo da leptina que ao ligar-se a leptina circulante bloqueia a ligação desta ao seu receptor. Avaliamos então se a inibição da leptina previne as alterações de composição corporal, concentração sérica de leptina, insulina, glicose e triglicerídeos. Além disso, para termos alguma noção do mecanismo envolvido foi avaliado o conteúdo protéico de SIRT1 no fígado.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Obesidade

A obesidade está se tornando o principal problema de saúde do século 21; sua prevalência vem crescendo entre as populações (Rana et al., 2007). Atualmente caracterizada como uma doença crônica epidêmica atinge crianças, adolescentes e adultos de países com diferentes níveis de desenvolvimento, inclusive superando a desnutrição e doenças infecciosas. Segundo estimativa realizada pela OMS em 2003, mais de um bilhão de adultos são classificados como em sobrepeso e pelo menos 300 milhões como obesos (segundo os critérios do próprio órgão) e até 2015, estima-se que aproximadamente dois bilhões e 300 mil indivíduos apresentarão sobrepeso e mais de 700 milhões, obesidade (WHO, 2003). Sendo assim, a obesidade é apontada como a chave para o desenvolvimento das doenças crônicas, dentre elas destacando-se diabetes mellitus tipo II, doenças cardiovasculares, hipertensão e diversos tipos de câncer.

No Brasil, inquéritos nacionais realizados entre 1975 e 2003 (ENDEF 1999, POF 1987-1988, POF 1995-1996 e POF 2002-2003) confirmam o declínio progressivo da prevalência da desnutrição infantil. A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003 evidenciou uma reduzida prevalência de 3% a 3,5% de desnutrição infantil e de 4,6% de desnutrição em crianças menores de cinco anos de idade. Os resultados foram considerados indicativos de presença residual de desnutrição e relativo controle do problema, principalmente nas áreas urbanas e rurais de aproximadamente metade do País (Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste). No entanto, foram evidenciadas prevalências intermediárias, entre 5% e 7%, indicativas da persistência do problema na Região Nordeste e nas áreas urbanas da Região Norte, sendo na área rural da Região Norte, estudada pela primeira vez no País, a maior prevalência de desnutrição infantil encontrada (11%).

Duas das possíveis causas para o aumento de prevalência da obesidade são: maior disponibilidade de alimento para a população e o aumento do sedentarismo (Grundy, 1998). Mudanças ambientais – físicas, sócio-culturais, econômicas e políticas – desempenham papéis cruciais na epidemia da obesidade. Em contraste, fatores genéticos, idade e efeitos hormonais, influenciariam a susceptibilidade de cada indivíduo ao ganho ou perda de peso dentro de cada ambiente. Parece então, que o ambiente atual é tão obesogênico que poucos indivíduos são capazes de evitar o aumento de peso (Cateron & Gill, 2002).

Uma gama de desordens metabólicas incluindo dislipidemias, resistência à insulina e hipertensão, indicadores da síndrome metabólica e fatores de risco para doenças cardiovasculares, tem sido altamente relacionados com a obesidade (Crowley et al., 2002). Esta estreita relação chama atenção para o papel primordial da adiposidade na patogênese dessas doenças. Um dos conceitos mais revolucionários é o de que o tecido adiposo não é simplesmente um reservatório de gordura como fonte de energia acumulada, mas um órgão extremamente ativo do ponto de vista metabólico (Ahima & Flier, 2000). Além de suas propriedades metabólicas, o tecido adiposo vem recebendo atenção especial devido a sua ação endócrina. Através da secreção de moléculas como a leptina, fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), interleucina 6 (IL-6), adiponectina e resistina, o tecido adiposo é capaz de influenciar a homeostase glicêmica, energética e a sensibilidade à insulina (Steppan et al., 2004).

Uma vez demonstradas as conseqüências da obesidade para a saúde, estudos têm sido realizados com o objetivo de identificar os principais fatores que contribuem para o seu desenvolvimento. Mutações recessivas nos genes de camundongos obesos (*ob*) (que os tornam incapazes de produzir leptina) e diabéticos (*db*) (capazes de produzir leptina, porém não apresentam expressão do receptor para o hormônio) resultam em uma síndrome semelhante a obesidade mórbida humana. Tanto os camundongos *ob/ob*, quanto os *db/db*, apresentam fenótipos idênticos, peso três vezes maior e conteúdo de gordura corporal cinco vezes maior que os animais normais (Friedman & Haalas, 1998, Zhang et al., 1994).

1.2 Programação Metabólica

A teoria da programação se refere a um fenômeno epigenético pelo qual alterações no padrão nutricional, hormonal ou ambiental durante um período crítico da vida influenciam o desenvolvimento do organismo (Moura et al., 2008). Os mecanismos pelos quais estas alterações são capazes de afetar os sistemas fisiológicos que controlam o apetite, regulação do peso corporal e a etiologia das desordens metabólicas, ainda não estão totalmente elucidados, porém algumas evidências sugerem que estas desordens manifestadas na vida adulta podem ter suas raízes até antes do nascimento (Breier et al., 2001).

As pesquisas sobre como os padrões de crescimento dos indivíduos no início da vida, atuam sobre a saúde, incluindo obesidade e doenças cardiovasculares, tem aumentado rapidamente nos últimos 15 anos (Chomtho, 2008). A nutrição adequada durante estes períodos cruciais de desenvolvimento é essencial para o crescimento sadio, podendo agir como um fator de impressão (*imprinting*), programando futuras respostas fisiológicas. Estudos epidemiológicos mostraram que a restrição alimentar durante a gestação resultou em maior prevalência de sobrepeso em homens adultos (Ravelli et al., 1976).

Alterações na nutrição materna podem refletir em alterações hormonais, endócrinas e metabólicas na prole adulta. A desnutrição materna em ratos, também está relacionada à diminuição da resposta a inflamação, alteração na secreção de insulina e glicocorticóides, o que predispõe estes animais a um maior risco de desenvolverem doenças crônicas (Silva et al., 2009; Garcia-Souza et al., 2008; Barja-Fidalgo et al., 2003; Sampaio de Freitas et al., 2003). Já Rodrigues et al (2007 e 2009), mostraram que a redução da ninhada, ao provocar supernutrição, também leva ao desenvolvimento de obesidade, aumento da captação de glicose pelos adipócitos, além de hipotireoidismo e alterações da ação da leptina no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide.

Passos et al (2000) demonstraram que a restrição protéica na lactação programa baixo peso corporal, porém não altera a ingestão alimentar da prole adulta. Posteriormente, Fagundes et al (2007) explica que este fato se deve a redução quantitativa do tecido adiposo branco, provavelmente causado por um aumento na lipólise ou alterações na lipogênese, ambos os efeitos podem estar relacionados tanto ao aumento das catecolaminas totais, quanto à hipoinsulinemia apresentada por estes animais. Além disso, estes animais são programados para menor colesterolemia e trigliceridemia (Fagundes et al., 2009). A desnutrição materna durante a lactação estaria associada a mudanças na concentração sérica de leptina dos filhotes (Teixeira et al., 2002), ao aumento dos receptores para leptina na hipófise (Vicente et al., 2004) programando modificações na massa corporal e função tireóidea destes animais (Passos et al., 2000; 2002; Teixeira et al., 2003).

A leptina parece ser o fator de *imprinting* dentro do modelo de desnutrição materna. Assim apesar de alguns efeitos nutricionais serem consequência direta de alterações na disponibilidade de substrato, muitos parecem ser mediados por efeitos hormonais.

Toste et al (2006 b) demonstraram, em ratos que receberam injeções diárias de leptina durante os 10 primeiros dias da lactação, que a programação está associada com aumento da leptina sérica e T3 sérico diminuído aos 30 dias de idade, com aumento de SOCS3 (Passos et al., 2009). Já aos 150 dias, estes animais continuaram a apresentar hiperleptinemia, concentrações séricas aumentadas de HTs, TSH reduzido e sobrepeso, além de menor expressão do receptor hipotalâmico de leptina (OBRb), evidenciando um quadro de resistência central a leptina (Toste et al., 2006 a, b). Dutra et al (2007) demonstraram que a exposição ao frio (12 horas a 8°C) é capaz de reverter a resistência a leptina, através do restabelecimento dos níveis de OBRb hipotalâmicos em ratos de 30 dias tratados com leptina na lactação.

Trevenzoli et al (2007) estudaram os efeitos da programação por injeção de leptina na lactação e sua associação com o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e constaram que o tratamento com leptina altera a função da medula adrenal, aumentando a síntese e

secreção de catecolaminas, e que este super estímulo do eixo simpatoadrenal poderia levar ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta.

Dados publicados por Lins et al (2005), Passos et al (2007) e Pereira-Toste et al (2009), mostraram que a via de administração influencia os efeitos da programação com leptina. O tratamento materno com leptina tem um efeito oposto ao do tratamento diretamente na prole. Os animais provenientes de mães que receberam leptina na lactação apresentam maior massa corporal, porém este aumento está relacionado a maiores conteúdo de gordura visceral e corporal total, diferente do que se observa nos animais tratados com leptina na lactação. Nestes últimos, o aumento de massa corporal parece se dever ao maior conteúdo de proteína corporal, já que os níveis de gordura, tanto visceral quanto total, foram normais. Assim, o tratamento materno parece provocar efeitos mais deletérios que o tratamento diretamente na prole. Por outro lado, o comportamento destes animais é também programado, porém de forma diferente se injeção de leptina é feita diretamente nos filhotes, onde a prole adulta é mais ansiosa e tem maior curiosidade, ou se a injeção é feita na mãe, onde a prole adulta é menos ansiosa e tem melhor memória/aprendizado, nesta última situação até com aspectos benéficos (Fraga-Marques et al., 2009; 2010).

1.3 Resistência a leptina

A leptina exerce influência na ingestão alimentar, gasto energético, massa corporal e função neuroendócrina através da ação em alvos neuronais no hipotálamo (Devaskar et al., 1997, Lee et al., 2002, Valassi et al., 2007). Produzida principalmente pelo tecido adiposo branco (TAB) e liberada na circulação sistêmica, a concentração de leptina plasmática é proporcional à massa total de TAB (Peters et al., 2007), sendo assim a leptina desempenha um importante papel na relação entre o estado nutricional e regulação neuroendócrina da homeostase energética. A ausência total de leptina, tanto em camundongos quanto em seres humanos, causa hiperfagia persistente e gasto energético diminuído, resultando em obesidade severa (Friedman &

Halaas, 1998, O'Rahilly et al., 2008), porém apenas uma pequena porcentagem dos humanos obesos, que são hiperleptinêmicos, possui algum tipo de deficiência genética, sendo a resistência a leptina o principal fator envolvido no desenvolvimento da doença (Considine et al., 1996).

Além disso, a leptina regula direta ou indiretamente grupos de neurônios específicos no hipotálamo e em outras regiões do cérebro. Algumas dessas regiões são ricas em OBRs, mostrando o efeito direto do hormônio na regulação neuronal e em outras o receptor é pouco expresso, mesmo que nestes casos a resposta a leptina seja acentuada, evidenciando uma regulação indireta (Hakansson & Meister, 1998; Elmquist et al., 1999). Funções como regulação da reprodução, função tireóidea, hormônio do crescimento, eixo adrenal (Ahima et al., 2000), eixo gonadal e sistema imunológico (O'Rahilly et al., 2007) têm sido relacionadas à leptina, independente de seu papel no balanço energético. A reposição hormonal com leptina na restrição alimentar restaura cada uma dessas funções (Ahima et al., 1996).

A leptina está presente na corrente sanguínea e chega aos alvos hipotalâmicos através da transposição da barreira hematoencefálica e isto ocorre pela interação da leptina com o receptor OB_{Ra} – isoforma curta do receptor OBR. Indivíduos obesos mesmo apresentando altos níveis de leptina sérica, não respondem ao seu efeito anorexigênico. Burguera & Couce (2001), explicam que os receptores OB_{Ra} localizados na barreira hematoencefálica são saturáveis e esta saturação ocorre perto dos níveis séricos de leptina fisiológicos, o que implica dizer que as altas concentrações de leptina, observadas em indivíduos obesos aumenta a competição pelos receptores e não produz efeito biológico, o que seria uma explicação para a perda da responsividade a leptina característica da obesidade.

A concentração de leptina aumenta proporcionalmente com a adiposidade, porém estudos mostram que este aumento não é eficaz no controle da progressão da obesidade. Halaas et al (1997) estudaram o efeito do tratamento com leptina em diferentes linhagens de camundongos obesos e constataram que a perda de peso nestes animais é reduzida em relação aos resultados apresentados pelos controles tratados. Já Widdowson et al (1997) expuseram ratos adultos à dieta hiperlipídica para posteriormente testar o

efeito de injeções intracerebroventriculares de leptina nas concentrações 0,5, 2,0 e 10,0 mg sobre a ingestão, 1, 4 e 24 h após as injeções e constataram que houve redução do consumo apenas 1 h após as injeções, demonstrando que os animais mesmo obesos não respondem satisfatoriamente ao efeito anorexigênico da leptina.

Passos et al (2004) mostraram que tanto a prole de ratas que sofreram restrição protéica quanto a de ratas que sofreram restrição calórica apresentaram resistência a leptina, porém a prole de mães que sofreram restrição protéica apresentou menor massa corporal e a prole de mães que sofreram restrição calórica apresentou obesidade. Para comprovar esta resistência, os ratos adultos, programados pela hiperleptinemia neonatal, foram submetidos ao teste de resistência a leptina. Este teste consistiu em injeções retro peritoneais de leptina na dose de 0,5 mg/Kg PC, com os animais em jejum, e avaliação do consumo alimentar 2, 4 e 6 h após as injeções, e foi observado que estes animais não apresentavam diminuição no consumo (2 e 4 h) em relação ao grupo controle. Acredita-se que isto se deva principalmente ao fato da leptina funcionar como um fator essencial sobre o desenvolvimento hipotalâmico das projeções neuronais (Bouret et al., 2004; Pinto et al., 2004).

Toste et al (2006a), injetando leptina prole nos primeiros 10 dias de lactação e Lins et al (2005) injetando leptina nas mães nos três últimos dias de lactação, também comprovaram esta resistência e Toste et al (2006a) ao avaliar a expressão dos receptores de leptina hipolâmicos encontrou-a diminuída nestes animais, mostrando que a hiperleptinemia neonatal é capaz de programar resistência a leptina.

A desnutrição materna na lactação está associada à diminuição de prolactina sérica nas mães (Lisboa et al., 2006). Ratos provenientes de mães tratadas com bromocriptina, que é um inibidor dopaminérgico da prolactina, durante os três últimos dias da lactação apresentam concentrações de leptina aumentadas, com maior secreção deste hormônio pelo leite (Bonomo et al., 2005). A hipoprolactinemia nos últimos dias da lactação provoca desnutrição, e está relacionada ao aumento na massa corporal, aumento na gordura visceral e corporal total e conseqüente hiperleptinemia na vida adulta, com resistência a leptina, avaliada pelo teste do efeito anorexígeno da leptina

(Bonomo et al., 2007). Além disso, estes animais apresentam hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia com hipoadiponectinemia e resistência à insulina (Moura et al., 2009).

1.4 Inibição da leptina

Reagentes que neutralizam a ação da leptina podem fornecer uma ferramenta de pesquisa para o estudo da relação leptina-desenvolvimento de processos metabólicos. Esta neutralização pode ocorrer através de antagonistas da leptina que se ligam aos receptores de leptina, mas não os ativam e anticorpos diretamente contra a leptina, que agem inibindo a ligação da leptina ao seu receptor. Estes reagentes capazes de bloquear a ação da leptina são novas alternativas para a pesquisa ajudando a elucidar o papel deste hormônio na fisiologia e fisiopatologia dos mamíferos, além de um possível uso como fármaco (Gertler, 2006).

Solomon et al (2006) produziram peptídeos nomeados de muteínas da leptina através da mutação do fragmento 39-42 do aminoácido ácido alanina e demonstraram que estas muteínas (L39A/D40A/F41A) são capazes de ligarem-se aos receptores, com afinidade semelhante ao hormônio normal, não apresentando ação agonista e inibindo a ação da leptina, agindo como potentes antagonistas.

Os dados sobre o uso dos antagonistas da leptina *in vitro* ou *in vivo* são limitados. Rajapurohitam et al (2006) demonstraram que os efeitos hipertróficos da leptina sobre a área celular dos cardiomiócitos ventriculares de ratos, são prevenidos pela muteína da leptina. O mesmo antagonista administrado por sete dias no hipotálamo lateral também previne o aumento da ingestão de dietas hiperlipídicas em ratos com cinco meses de idade (Zhang, 2006). O grupo também relatou que a administração aguda central do antagonista da leptina bloqueia a via de sinalização do receptor de leptina hipotalâmico. Attig et al (2008), submeteram ratos durante a lactação ao tratamento com o antagonista da leptina e demonstraram que estes animais aos três meses apresentam resistência a leptina e maior susceptibilidade ao

desenvolvimento de obesidade quando expostos a dieta hiperlipídica e aos oito meses de idade estes animais apresentaram aumento na adiposidade e hiperleptinemia.

Além das funções neuroendócrinas conhecidas, Karmazyn et al (2007) relataram que pacientes com insuficiência cardíaca congestiva apresentam altas concentrações séricas de leptina e que a leptina teria ação hipertrófica sobre os cardiomiócitos. A partir desta informação o grupo demonstrou que o bloqueio aos receptores da leptina – utilizando um anticorpo específico (ObR-Ab) – foi capaz de melhorar a função cardíaca de ratos submetidos ao infarto (Purdham et al., 2008). O excesso de peso acompanhado de desordens metabólicas pode contribuir para o desenvolvimento de um estado pró-trombótico, alterando o balanço entre fatores trombóticos e trombolíticos na circulação. Camundongos *ob/ob* apresentaram defeitos na agregação plaquetária e resposta trombótica diminuída ao dano arterial, demonstrando que a leptina estimula a agregação plaquetária e o desenvolvimento de trombos. A partir destas informações, Konstantinides et al (2004) estudaram o efeito do tratamento com o anticorpo da leptina em ratos hiperleptinêmicos que sofreram indução de injúria arterial e trombose venosa. Os autores demonstraram que o anticorpo, ao impedir a ligação da leptina endógena ao seu receptor, é capaz de reduzir o tamanho do trombo, prevenindo a trombose venosa, estes achados mostram que a inibição do efeito protrombótico associado à leptina pode vir a ser uma estratégia terapêutica para a redução do risco de cardiovascular associado ao excesso de peso.

Scarpace et al (2006) produziram animais resistentes a leptina pela superexpressão hipotalâmica da leptina, através de manipulação genética. Quando os animais controles adultos (153 dias) recebiam o antagonista da leptina por 14 dias, observou-se aumento da massa corporal, adiposidade e ingestão. Porém, nos animais resistentes, houve diminuição da ingestão, adiposidade e massa corporal. Assim, o uso do antagonista em animais normais é similar a programação por leptina, enquanto que no animal resistente, o antagonista reprograma as alterações observadas. O mesmo grupo (Matheny et al., 2009), ao invés de superexpressar leptina, fez a superexpressão do antagonista. Observou o mesmo efeito sobre ingestão e adiposidade, da superexpressão com leptina, mas ao contrário observou

menor atividade destes animais na roda giratória, contrário ao animal que superexpressa leptina que apresenta maior atividade.

O pico da secreção de leptina ocorre por volta da segunda semana de vida, porém a leptina ainda não age influenciando o metabolismo energético e sim sobre o desenvolvimento hipotalâmico. Attig et al (2008) desenvolveram um modelo experimental, onde fêmeas recém nascidas receberam injeções subcutâneas de muteína no início da lactação e observaram que o bloqueio da leptina no início da vida programa para maior susceptibilidade a obesidade induzida por dieta, maior adiposidade, hiperleptinemia e resistência a leptina, estes dados reforçam a relevância do pico pós-natal da leptina sobre o estabelecimento fisiológico da regulação metabólica.

1.5 Sirtuína 1

A família de proteínas chamada SIR (“Silent Information Regulator”) foi inicialmente isolada de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), através da descoberta da SIRT2 em estudos realizados por Picard et al (2004). O grupo identificou que estas proteínas desempenhavam funções como: regulação do tempo de vida, reparo de danos no DNA, resistência celular ao estresse e regulação metabólica, atribuindo estes efeitos ao fato de bioquimicamente estas proteínas funcionarem como histonas deacetilases dependentes de NAD⁺, atuando sobre vários substratos importantes, dentre eles destacando-se o p53 (relacionado a apoptose celular), fatores de transcrição como FOXO-3, relacionado à resposta celular ao estresse e FOXO-1, relacionado à carcinogênese, PPAR γ , relacionado ao metabolismo lipídico, PGC-1 α , relacionado à gliconeogênese, entre outros cujas ações estão relacionadas ao desenvolvimento de doenças ligadas ao envelhecimento.

Atualmente existem sete homólogos da SIRT2 (Sirtuínas1-7) descritos em mamíferos, todos desempenham suas funções através da desacetilação dependente de NAD⁺. Dentre estes homólogos, a SIRT1 tem sido extensamente estudada. Sua ação relaciona-se principalmente ao reparo de danos no DNA, estresse oxidativo, além de atuar sobre tecidos

metabolicamente ativos como pâncreas, tecido adiposo e fígado (Liang et al., 2009; Finkel et al, 2009).

Em relação ao reparo de danos ao DNA, a SIRT1 regula positivamente a estabilidade genômica, deacetilando fatores envolvidos neste fenômeno. Wang et al., (2008) desenvolveram um modelo animal onde embriões *SIRT1*^{-/-} apresentaram aberrações cromossômicas e prejuízos no reparo do DNA, comprovando que a SIRT1 desempenha um importante papel na manutenção da integridade genômica.

O desenvolvimento de distúrbios metabólicos está associado principalmente às mudanças corporais surgidas com o avanço da idade, como a composição corporal que é alterada pelo desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético, resultando em aumento no acúmulo de gordura visceral e resistência à insulina. Já em relação à manutenção dos níveis séricos normais de glicose, a SIRT1 atua através da estimulação do PGC-1 α , que promove a gliconeogênese e a oxidação de ácidos graxos no fígado e esta ação se dá principalmente em períodos de jejum. Em resposta a esta alteração nutricional, a concentração de piruvato induz a SIRT1 no fígado e uma vez induzida a SIRT1 deacetila o PGC-1 α , e assim induz genes envolvidos na gliconeogênese e na secreção de glicose hepática (Rodgers et al., 2005). Porém no jejum, SIRT1 e PGC-1 α tem efeitos contrários sobre a glicólise. Segundo Rodgers (2005), durante o jejum os níveis de piruvato estão diminuídos, logo a expressão de SIRT1 está aumentada, estimulando a ação gliconeogênica e inibindo a ação glicolítica do PGC-1 α . Durante a realimentação, os níveis de SIRT1 retornam a normalidade, mostrando que a SIRT1 atua no sentido de uma melhor adaptação a possíveis alterações nutricionais. A SIRT1 também age sobre o metabolismo da glicose, através da regulação positiva da secreção de insulina, reprimindo o gene da UCP2, enzima mitocondrial que participa da respiração celular.

A ação da SIRT1 no metabolismo lipídico resulta da repressão de genes expressos pelo PPAR- γ (fator de transcrição responsável pela indução da diferenciação de adipócitos) incluindo genes responsáveis pelo acúmulo de gordura. Picard et al 2004, relataram que em animais Knock out para a SIRT1, a mobilização de gordura no tecido adiposo branco foi comprometida.

A repressão do PPAR- γ pela SIRT1 também é evidente em adipócitos 3T3-L1, onde aumentos nas concentrações de SIRT1 reduzem a adipogênese. Outro resultado publicado pelo mesmo grupo ressalta que em adipócitos diferenciados durante o jejum, o aumento na concentração de SIRT1 promove a liberação de ácidos graxos livres. Logo aumentos na atividade da SIRT1, parecem diminuir o tamanho do adipócito e o conteúdo de gordura acumulado, o que leva a um melhor controle metabólico (Pedersen et al., 2008).

Ahn et al (2008) demonstram que o tratamento com resveratrol diminui a concentração de triglicérides séricos, colesterol total, assim como a lipogênese de ratos submetidos à dieta aterogênica (rica em gordura saturada) e este efeito se deve ao fato do resveratrol ser um potente ativador da expressão de SIRT1. Pelo fato de a SIRT1 estar ligada ao aumento dos níveis de oxidação lipídica, lipólise e sua influência positiva no combate as desordens metabólicas, explorar farmacologicamente a SIRT1 poderia ser um alvo terapêutico no combate às alterações relacionadas à obesidade (Feige et al., 2008). Rodgers & Puigserver (2007) em um modelo experimental utilizando camundongos “*knockdown*” para SIRT1 mostraram que esta inibição provoca redução na expressão de genes envolvidos na degradação e secreção de colesterol hepático, o que leva a acumulação deste no fígado, já a superexpressão de SIRT1 aumenta a degradação e o efluxo do colesterol hepático, diminuindo seu acúmulo, o que por outro lado aumenta os níveis de colesterol sérico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do anticorpo da leptina sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos em ratos adultos tratados com leptina no período neonatal.

2.1 Objetivos Específicos

Em ratos adultos (200 dias) tratados com leptina durante a lactação e com anticorpo da leptina aos 29 e 30 dias de idade:

- Avaliar massa e composição corporal.
- Determinar as concentrações séricas de leptina, insulina, adiponectina, glicose e triglicerídeos séricos.
- Determinar a expressão hepática de Sirtuína 1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nosso modelo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética Para Uso Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da UERJ (CEA/187/2009) e realizado no Laboratório de Fisiologia Endócrina do Departamento de Ciências Fisiológicas do IBRAG da UERJ.

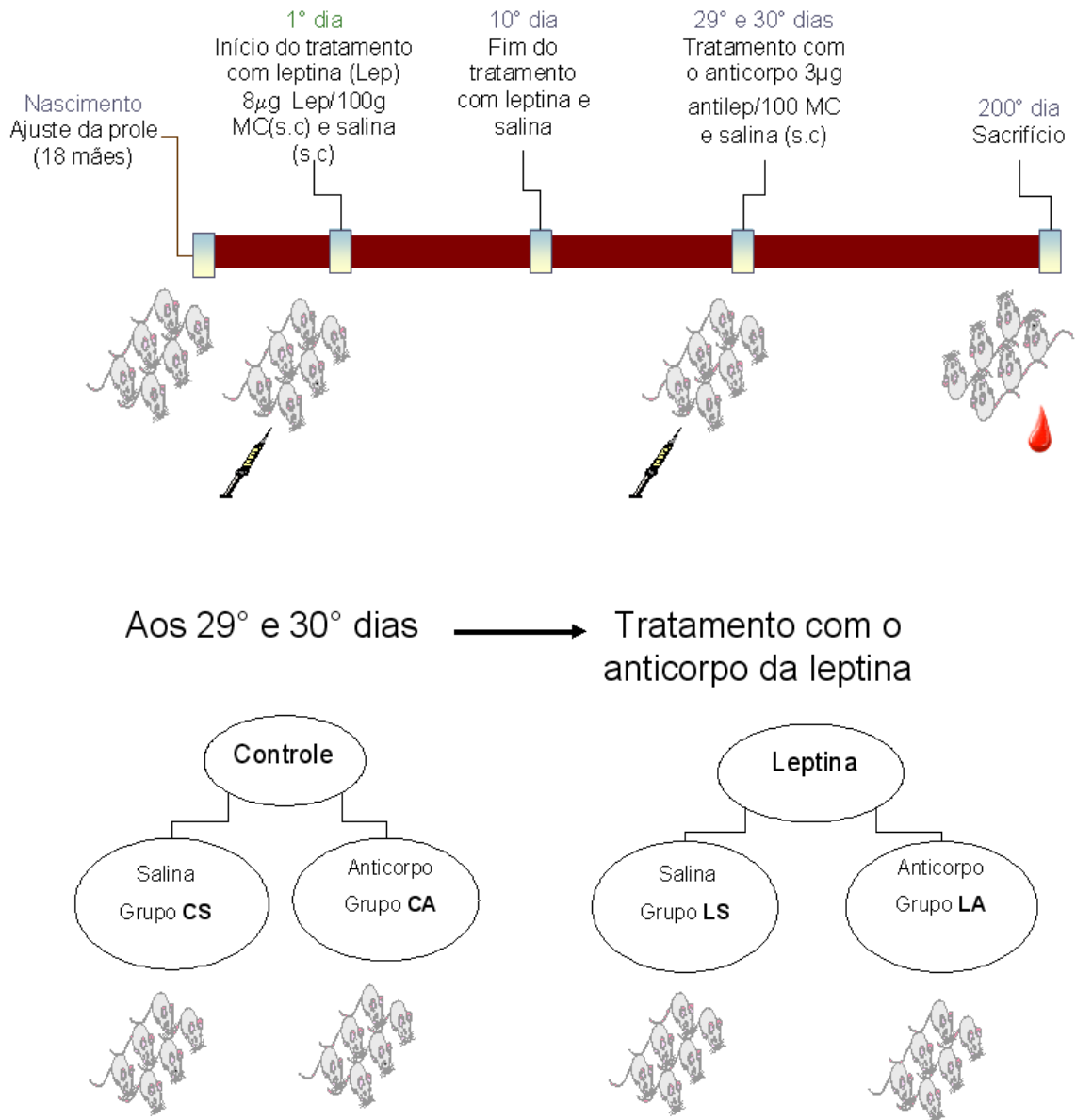
Ratas Wistar, nulíparas, adultas foram mantidas em biotério com temperatura e ciclo claro-escuro controlados. Estas ratas foram acasaladas na proporção de duas fêmeas para um macho e receberam ração comercial padrão para roedores, contendo 23% de proteína, 66% de carboidrato e 11% de gordura (Labina – Purina Nutrimentos LTDA) e água ad libitum até o nascimento da prole.

Ao nascimento, 16 ninhadas foram ajustadas para 6 filhotes machos por mãe, pois este número garante o maior potencial lactotrófico (Fishbeck & Rasmussen, 1987).

Os filhotes (ao todo 96) foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo Controle (**C**), que recebeu injeção de solução salina, dose única (NaCl 0,9 %, via subcutânea) durante os 10 primeiros dias da lactação; Grupo Leptina (**L**), que recebeu injeção de leptina, dose única, na concentração de 8 µg (recombinant mouse Leptin - PeproTech Inc, Londres, Inglaterra) por 100g de peso corporal, via s.c, durante os 10 primeiros dias da lactação.

Os filhotes foram desmamados aos 21 dias de idade e a partir do desmame, a massa corporal e o consumo de ração passaram a ser avaliados a cada quatro dias até os 200 dias de idade.

Aos 29 e 30 dias de idade os animais do grupo L e C, foram subdivididos nos seguintes grupos: **LS** e **CS** que receberam nestes dois dias injeção de solução salina (na mesma concentração e pela mesma via utilizada durante a lactação); **LA** e **CA** que receberam injeção de 3µg do anticorpo, dose única (Anti-Murine Leptin, Peprotech Inc, New Jersey, USA) por 100 gramas de peso corporal, durante os mesmos dois dias. A mesma subdivisão e tratamento aconteceram com o grupo controle. Como pode ser observado no esquema 1.



Esquema 1: Desenho experimental do estudo e subdivisão dos grupos para o tratamento com o anticorpo da leptina.

A dose de anticorpo foi baseada no estudo de Konstantinides et al., (2004) que testou a habilidade de inibição do anticorpo na interação da leptina com seu receptor. A média da concentração circulante de leptina em camundongos é de 2,0 ng/mL (ou 0,125 nM), como os camundongos possuem um total de volume sanguíneo de 2 a 3 mL, para promover uma inibição completa foi injetado 3 μ g de anticorpo, o qual resultou numa concentração final de 6,7 a 10 nM no sangue, ou seja 50-80 vezes a concentração de leptina (Konstantinides et al., 2004). Como para a realização

do presente estudo foram utilizados ratos, a dose utilizada pelo grupo de Konstantinides foi corrigida relacionando-se a dose utilizada pelo grupo (3µg) para 100 gramas de peso corporal dos animais no dia da injeção com o anticorpo.

Aos 200 dias de idade, os animais foram sacrificados por decapitação e em seguida foram coletadas amostras de sangue para dosagens de leptina, insulina, adiponectina, glicose e triglicerídeos séricos e de fígado para a análise da expressão de SIRT1. A carcaça foi obtida para análise do conteúdo lipídico. As amostras de fígado foram armazenadas em freezer à -70°C e as carcaças à -20°C. As amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro, cujas alíquotas foram estocadas a -20°C.

3.1 Conteúdo Corporal Total de Gordura

O conteúdo lipídico das carcaças foi determinado segundo adaptação do método descrito por Leshner et al (1972). Após sacrifício, o trato gastrointestinal foi removido. Em seguida as carcaças foram pesadas, amolecidas em autoclave por uma hora e homogeneizadas em água destilada na proporção 1:1. Foram separadas alíquotas contendo 3 g do homogenato para a determinação do conteúdo de gordura, por método gravimétrico descrito por Stansbie et al (1976). As diluições e os resultados foram expressos em gramas de gordura por 100 gramas de carcaça.

3.2 Tecido Adiposo Visceral (TAV)

Durante o sacrifício dos animais o tecido adiposo visceral – que corresponde a todo o conteúdo de gordura mesentérica, epididimal e retroperitoneal – foi retirado (Hansen et al., 1997) para estimativa do conteúdo de gordura central através de pesagem direta. Os resultados foram expressos em gramas por 100 gramas de carcaça.

3.3 Análises séricas

As dosagens da leptina séricas foram realizadas através de radioimunoensaio (RIE), utilizando Kit comercial (LINCO Research, Inc., Missouri, E.U.A). Este kit mede leptina murina e a sensibilidade de método é de 0,5 ng/mg e o coeficiente de variação foi 4,2%. As dosagens séricas de glicose e do perfil lipídico foram determinados por kits comerciais (Bioclin, MG, Brasil). A insulinemia foi determinada através de RIE, utilizando Kit comercial (ImmuChem™ ¹²⁵I, tubo revestido, ICN Biomedicals, Inc, E.U.A). A sensibilidade de método foi 0,1 ng/ml e o coeficiente de variação foi de 8,9%. As dosagens de adiponectina sérica foram feitas através de RIE utilizando o kit comercial (Linco Research, St Charles, MO, E.U.A) a sensibilidade do método foi de 0,5ng/ml e o coeficiente de variação foi de 7,1%. Todos os hormônios foram avaliados em um mesmo RIE. A glicose e os triglicerídeos séricos foram analisados através de kits comerciais Biosystem ® commercial (Barcelona, Espanha).

3.4 Expressão de SIRT1 no fígado – Análise de Western blot

As amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão de lise (50 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA e 1 % de Triton X-100 com coquetel inibidor de protease (Roche, Indianapolis, IN, E.U.A) pH 6,4. Um total de 30 µg de proteína (por amostra) foram separadas em gel de acrilamida 12,5 % (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de celulose, a qual foi bloqueada com 5% de leite desnatado e incubada durante uma noite com anticorpo específico para SIRT1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., San Francisco, CA, E.U.A) na diluição de 1:500 e com o controle interno, anticorpo anticiclofilina B (Affinity BioReagents, Inc., Golden, CO, E.U.A) em uma diluição de 1:3000. As membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo IgG contra soro de coelho conjugado com peroxidase (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ, E.U.A) diluído a 1:6250, por 3 h a temperatura

ambiente. Após esta incubação as membranas foram lavadas e incubadas com um detector de luminescência (ECL, Amersham, Biosciences) para posterior exposição em filme autoradiográfico (Eastman Kodak). As bandas foram avaliadas por densitometria através do programa de computador Kodak 1 D3.5. (Almeida et al., 2009).

3.5 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm SEM. Para a análise dos resultados foi utilizada análise de variância univariada (One-way Anova) seguido do teste Newman-Keuls para comparação entre as médias. O nível de significância de $p < 0,05$ foi utilizado como estatisticamente significativo. Para análise da expressão hepática de SIRT1 foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's para comparação entre as médias.

4. RESULTADOS (São apresentados no artigo submetido em anexo)

5. DISCUSSÃO

O achado mais importante deste estudo foi que o bloqueio da ação da leptina aos 29 e 30 dias de vida foi capaz de reverter as desordens metabólicas em ratos programados pelo tratamento com leptina nos 10 primeiros dias da lactação, quando atingidos os 200 dias de vida. Porém, em animais normais, a inibição da leptina pelo mesmo período de tempo produziu as mesmas alterações metabólicas que a administração de leptina nos 10 primeiros dias de lactação.

Já foi demonstrado que níveis aumentados de leptina no início da vida levam ao desenvolvimento de obesidade e a uma gama de outras alterações metabólicas relacionadas à obesidade. Estas mudanças acontecem porque em ratos, o sistema nervoso central ainda é imaturo e extremamente plástico nos primeiros dias após o nascimento. As vias orexigênicas e anorexigênicas neurais são alteradas permanentemente, tanto morfológica quanto funcionalmente, pela administração de leptina neste período (Bouret et al., 2004; Pinto et al., 2004).

Como mostrado pelo nosso grupo previamente, a restrição calórica na lactação aumenta a concentração sérica de leptina na prole ao final da lactação (Teixeira et al., 2002) e isto pode ser devido à alta produção materna de leptina e sua transferência através do leite (Lisboa et al., 2006). Em outro modelo de desnutrição, o bloqueio da prolactina ao final da lactação, também observamos um aumento na transferência de leptina através do leite (Bonomo et al., 2005). Todos estes modelos de programação neonatal levaram a resistência a leptina na vida adulta (Passos et al., 2004; Bonomo et al., 2007). A leptina parece ser importante para o processo de programação. Foram desenvolvidos no nosso laboratório, dois modelos de programação neonatal pela leptina. A leptina foi administrada nas mães, tanto no final (Lins et al., 2005) quanto nos dez primeiros dias da lactação (Pereira-Toste et al., 2009).

Nas duas situações, foram observados aumento no tecido adiposo visceral, aumento na concentração de glicose sérica e aumento na concentração de leptina sérica aos 180 dias em comparação aos animais controle. Quando a leptina é injetada diretamente nos filhotes, a leptina programa para hiperleptinemia (de Oliveira Cravo et al., 2002), resistência a leptina associada a menor expressão do OBRb no hipotálamo em animais de 150 dias (Toste et al., 2006). Entretanto, a maioria destas alterações metabólicas já é observada quando os animais alcançam 30 dias de vida (Toste et al., 2006) incluindo, aumento da expressão do SOCS3 hipotalâmico, o que poderia explicar a resistência intracelular a leptina (Passos et al., 2009). No presente estudo, também foi observado aumento de gordura visceral, de gordura corporal total e de leptina sérica nos animais tratados com leptina, efeitos que foram abolidos pelo bloqueio da leptina com o anticorpo aos 30 dias. Porém a inibição da leptina nos animais normais produziu o mesmo tipo de alterações observadas no grupo LS, como aumento na massa de gordura total, na massa de gordura visceral e na leptina sérica, sugerindo que nesta idade é importante manter a concentração de leptina em níveis normais. Attig et al (2008) relataram que a administração do antagonista para leptina durante a lactação programou ratas fêmeas para a resistência a leptina, aumento na adiposidade e hiperleptinemia na vida adulta, mostrando que a inibição da leptina em um período crítico prejudica o desenvolvimento hipotalâmico, programando distúrbios metabólicos. Assim tanto o aumento quanto a diminuição dos níveis séricos de leptina em um amplo período crítico pode programar mudanças na adiposidade e na concentração de leptina.

A maior concentração sérica de triglicerídeos, porém sem alterações na taxa de colesterol, foi encontrada nos grupos CA e LS, e a inibição da leptina aos 30 dias (grupo LA) normalizou estas alterações. A concentração de triglicerídeos aumentada está associada ao desenvolvimento de diabetes mellitus ou resistência a insulina (Cannon, 2008; Depres & Marette, 1994).

Aumentos nos níveis séricos de insulina na corrente sanguínea são correlacionados ao aumento da adiposidade, já que a insulina promove lipogênese e inibe a lipólise (Saltiel & Kahn, 2001). Por outro lado, adiposidade aumentada se associa a baixos níveis de adiponectina e resistência a insulina (Ahima, 2006). A resistência a insulina é geralmente

caracterizada por hiperinsulinemia, com ou sem hiperglicemia. Hiperglicemia, sem hiperinsulinemia pode ser devido à secreção de insulina deficiente. Apenas os animais CA apresentaram alterações na homeostase glicêmica, caracterizada por hiperglicemia, pelo alto índice de resistência a insulina associado ao reduzido nível de adiponectina. Os animais LS apresentaram baixo nível de adiponectina, mas sem outras alterações na homeostase glicêmica.

O grupo LA foi o único a apresentar níveis de expressão de SIRT1 no fígado aumentados. Assim é possível que seus níveis normais de adiposidade, triglicerídeos e glicose séricas sejam devido à maior expressão de SIRT1. Em camundongos cujos níveis de SIRT1 são superexpressos ocorre redução da massa corporal e da massa de tecido adiposo em comparação ao grupo controle (Bordone et al., 2007). Os animais de grupo LA também apresentaram níveis normais de adiponectina, comparados aos baixos níveis apresentados tanto pelo grupo LS quanto pelo grupo CA. Dados na literatura também associam a superexpressão de SIRT1 em camundongos ao aumento na expressão gênica de adiponectina, através do aumento na mobilização de gordura (Qiao & Shao, 2006; Banks et al., 2008). Quando a superexpressão de SIRT1 ocorre especialmente nas ilhotas pancreáticas, estes animais mostram aumento de tolerância a glicose e aumento na secreção de insulina estimulada pela glicose (Moynihan et al., 2005). A ativação da SIRT1 com SRT1720, não só protege contra a resistência a insulina e obesidade, como também diminui as reservas de tecido adiposo e reduz os níveis de triglicerídeos séricos (Feige et al., 2008). Por outro lado, o fato da SIRT1 não aumentar no grupo CA explica, em parte, porque a insulina não aumentou em função do aumento da glicemia.

A SIRT1 desempenha importantes funções no metabolismo. Níveis aumentados de SIRT1 no jejum atuam sobre o PGC1 α diminuindo a glicólise e aumentando a gliconeogênese (Rodgers et al., 2005). A SIRT1 é expressa no tecido adiposo de roedores e inibe PPAR γ , diminuindo a lipogênese e aumentando a lipólise (Picard et al., 2004; Lomb et al., 2009). Aumentos na expressão de SIRT1 parecem promover a liberação de ácidos graxos livres e este efeito pode estar associado à baixa acumulação de lipídeos no fígado (Pedersen et al., 2008).

Assim, o bloqueio da ação da leptina uma semana após o desmame parece reverter a maioria das alterações observadas em ratos programados pela hiperleptinemia neonatal e provavelmente este efeito de normalização é mediado pelo aumento na expressão de SIRT1 no fígado o que leva a um melhor metabolismo glicídico e lipídico, uma vez que a massa de gordura é correlacionada a redução da expectativa de vida em roedores (Li Ang et al., 2009; Pedersen et al., 2005) e, a SIRT1, ao seu aumento. Dessa forma, em ratos, níveis normais de leptina no primeiro mês de vida são importantes para o desenvolvimento da adipogênese, da homeostase glicêmica e do metabolismo lipídico, enquanto que alterações nas concentrações deste hormônio podem ser deletérias para a saúde do animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahima, R.S. & Flier, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* v 11(8), p. 327-32, Oct. 2000.
2. Ahima, R.S. Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. *Obesity (Silver Spring)*. V.14 Suppl 1, p. 9S-15S, Feb. 2006
3. Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Lowell, B., Maratos-Flier, E. & Flier, J.S. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. v. 382, p.250-2, Jul.1996.
4. Ahima, R.S., Saper, C.B., Flier, J.S., Elmquist, J.K. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*. v.21 (3), p.263-307, Jul. 2000.
5. Ahn, J., Cho, I., Kim, S., Kwon, D., Ha, T. Dietary resveratrol alters lipid metabolism-related gene expression of mice on an atherogenic diet. *Journal of Hepatology*. v. 49 (6), p. 1019-28, Dec. 2008.
6. Almeida, N.A, Cordeiro, A., Machado, D.S., Souza, L.L., Ortiga-Carvalho, T.M., Campos-de-Carvalho, A.C., Wondisford, F.E., Pazos-Moura, C.C. Connexin40 messenger ribonucleic acid is positively regulated by thyroid hormone (TH) acting in cardiac atria via the TH receptor. *Endocrinology*. v. 150(1), p. 546-54, Jan. 2009.
7. Attig, L., Solomon G., Ferezou, J., Abdennebi-Najar, L., Taouis, M., Gertler, A., Djiane, J. Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *International Journal of Obesity*. v. 32(7), p. 1153-60, Jul. 2008.
8. Banks, A.S., Kon, N., Knight, C., Matsumoto, M., Gutierrez-Juarez, R., Rossetti, L., Gu, W., Accili, D. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab.* v.8(4), p.333-341, Oct. 2008.
9. Barja-Fidalgo, C., Souza, E.P., Silva, S.V, Rodrigues, A.L, Anjos-Valotta, E.A., Sannomyia, P., DeFreitas, M.S, Moura, A.S. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res*. v. 52(11), p. 470-6, Nov. 2003.

10. Barker, D.J & Osmond, C. Low birth weight and hypertension. *BMJ*. v. 9;297(6641), p.134-5. Jul. 1988.
11. Barker, D.J. Childhood causes of adult diseases. *Arch Dis Child*. v. 63(7), p. 867-9, Jul. 1988.
12. Blander, G. & Guarente, L. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*. v.73. p. 417-35. 2004.
13. Bonomo, I.T, Lisboa, P.C, Passos, M.C, Pazos-Moura, C.C, Reis, A.M, Moura, E.G. Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Horm Metab Res*. v. 37(4), p. 220-5, Apr. 2005.
14. Bonomo, I.T, Lisboa, P.C, Pereira, A.R, Passos, M.C, Moura, E.G. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol*. v. 192(2), p. 339-44, Feb. 2007.
15. Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M.C., van Veen, E., Czopik, A., Steele, A.D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., Gu, W., Guarente, L. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*. v. 6(6), p. 759-67, Dec. 2007.
16. Bouret, S.G, Draper, S.J, Simerly, R.B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science*. v.304(5667), p. 108-10, Apr 2. 2004.
17. Breier, B.H., Vickers, M.H., Ikenasio, B.A., Chan, K.Y., Wong, W.P.S. Fetal programming of appetite and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 185(1-2), p. 73-9, Dec 20. 2001.
18. Burguera, B. & Couce, M.E. Leptin access into the brain: a saturated transport mechanism in obesity. *Physiol Behav*. v. 74(4-5), p. 717-20, Nov/Dec. 2001.
19. Campfield, L.A, Smith, F.J, Guisez, Y., Devos, R., Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. v. 28;269(5223), p. 546-9, Jul. 1995.
20. Cannon, C.P. Mixed dyslipidemia, metabolic syndrome, diabetes mellitus, and cardiovascular disease: clinical implications. *Am J Cardiol*. v. 22;102(12A), p. 5L-9L, Dec. 2008.
21. Caterson, I.D. & Gill, T.P. Obesity: epidemiology and possible prevention. v.16. n.4, p. 595-610. Dec. 2002.

22. Chomtho, S., Wells, C.K.J., Williams, J. E., Lucas, A., Fewtrell, M.S. Associations between birth weight and later body composition: evidence from the 4-component model. *Am J Clin Nutr.* v.88, p.1040-8. Oct. 2008.
23. Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L. & et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* v. 334, p.292-295, Feb 1.1996.
24. Cottrell, E.C & Ozanne, S.E. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav.* v. 22, p.17-28, Apr. 2008.
25. Crowley, V.E, Yeo, G.S, O'Rahilly, S. Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nat Rev Drug Discov.* v.1(4), p. 276-86, Apr. 2002.
26. de Oliveira Cravo, C., Teixeira, C.V., Passos, M.C., Dutra, S.C., de Moura, E.G., Ramos, C. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Horm Metab Res.* v.34, n.7, p.400-5. Jul. 2002.
27. Despres, J.P. & Marette, A. Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr Opin Lipidol.* V. 5. p. 274–289. Aug. 1994.
28. Devaskar, S.U., Ollesch, C., Rajakumar, R.A., Rajakumar, P. A. Developmental Changes in ob Gene Expression and circulating Leptin Peptide Concentrations. *Biochemical and biophysical research communications.* v. 238(1), p. 44 – 47, Sep 8.1997.
29. Drummond, G.B. Reporting ethical matters in the Journal of Physiology: standards and advice. *J Physiol.* v. 15;587(Pt 4), p. 713-9, Feb. 2009
30. Dutra, S.C, Moura, E.G, Rodrigues, A.L, Lisboa, P.C, Bonomo, I., Toste, F.P, Passos, M.C. Cold exposure restores the decrease in leptin receptors (OB-Rb) caused by neonatal leptin treatment in 30-day-old rats. *J Endocrinol.* v. 195(2), p. 351-8. Nov. 2007.
31. Elmquist, J.K., Elias, C.F. & Saper, C.B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.* v. 22(2), p.221-32, Feb. 1999.
32. Fagundes, A. T. S., Moura, E. G., Passos, M. C. F., Oliveira, E., Toste, F. P., Bonomo, I. T., Trevenzoli, I. H., Garcia, R. M. G, Lisboa, P. C. Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose

- homeostasis in the adult rat offspring. *British Journal of Nutrition*. v. 98(5), p.922-8, Nov. 2007.
33. Fagundes, A.T, Moura, E.G, Passos, M.C, Santos-Silva, A.P, de Oliveira, E., Trevenzoli, I.H, Casimiro-Lopes, G., Nogueira-Neto, J.F, Lisboa, P.C. Temporal evaluation of body composition, glucose homeostasis and lipid profile of male rats programmed by maternal protein restriction during lactation. *Horm Metab Res*. v. 41(12), p.866-73, Dec. 2009.
 34. Feige, J.N & Auwerx, J. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Curr Opin Cell Biol*. v. 20(3), p. 303-9, Jul. 2008.
 35. Feige, J.N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S.M., Milne, J.C., Lambert, Philip D.P., Matak, C., Elliott, J.P., Auwerx, J. Specific SIRT1 Activation Mimics Low Energy Levels and Protects against Diet-Induced Metabolic Disorders by Enhancing Fat Oxidation. *Cell Metabolism*. v. 8(5), p. 347-58, Nov. 2008.
 36. Finkel, T., Deng, C.X, Mostoslavsky, R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*. v. 30;460(7255), p. 587-91, Jul. 2009.
 37. Fishbeck, K.L. & Rasmussen, K.M. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J. Nutr*. v. 117(11), p. 1967-75. Nov. 1987.
 38. Fraga-Marques MC, Moura EG, Claudio-Neto S, Trevenzoli IH, Toste FP, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. *Horm Behav*. v. 55(2), p. 272-9, Feb. 2009
 39. Fraga-Marques, M.C, Moura, E.G, Silva, J.O, Claudio-Neto, S., Pereira-Toste, F., Passos, M.C, Lisboa, P.C, Manhães, A.C. Effects of maternal hyperleptinaemia during lactation on short-term memory/learning, anxiety-like and novelty-seeking behavioral traits of adult male rats. *Behav Brain Res*. v. 206(1), p. 147-50, Jan. 2010.
 40. Friedman, J.M. & Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. v. 22;365(6704), p. 763-70, Oct. 1998.
 41. Garcia-Souza, E.P, da Silva, S.V, Félix, G.B, Rodrigues, A.L, de Freitas, M.S, Moura, A.S, 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*. v. 295(3), pE626-36, Sep. 2008.

42. Gertler, A. Development of leptin antagonists and their potential use in experimental biology and medicine. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. v. 17(9), p. 372-8, Nov. 2006.
43. Gluckman PD, Lillycrop KA, Vickers MH, Pleasants AB, Phillips ES, Beedle AS, Burdge GC, Hanson MA. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 31;104, p. 12796-800, Jul. 2007.
44. Godfrey, K.M., Barker, D.J. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*. v. 71(5 Suppl), p.1344S-52S, May. 2000.
45. Grundy, S.M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr*. v. 67(Suppl 3), p. 563S-72S, Mar.1998.
46. Guarente, L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature*. v. 14; 444(7121), p. 868-74, Dec. 2006.
47. Guarente, L., Picard, F. Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell*. v.25;124(4), p. 473-82, Feb. 2005.
48. Haigis, M.C, Guarente, L.P. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev*. v. 20(21), p. 2913-21, Nov 1. 2006.
49. Hakansson, M.L. & Meister, B. Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. v.68(6), p.420-427, Dec. 1998.
50. Halaas, J.L, Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A, Friedman, J.M. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.94(16), p. 8878-83, Aug 5. 1997.
51. Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M. Weight regulation effects of the plasma protein encoding the obese gene. *Science*. v.269, p.543-546. Jul. 1995.
52. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003 (POF). <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2003medidas/pof2003medidas.pdf>. Acesso: 15.01.2009.

53. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE).; Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF) - Tabela de composição de alimentos. 5. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 1999. 137p.
54. Feige, J.N., Lagouge, M., Canto, C., Strehle, A., Houten, S.M., Milne, J.C, Lambert, P.D., Matak, C., Elliott, P.J., Auwerx, J. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metab.* v. 8(5), p347-58. Nov. 2008.
55. Moynihan, K.A., Grimm, A.A., Plueger, M.M., Bernal-Mizrachi, E., Ford, E., Cras-Meneur, C., Permutt, M.A., Imai, S. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab.* v.2(2), p. 105-117, Aug. 2005.
56. Karmazyn, M., Purdham, D.M., Rajapurohitam, V., Zeidan, A. Leptin as a cardiac hypertrophic factor: a potential target for therapeutics. *Trends Cardiovasc Med.* v. 17(6), p. 206-11, Aug. 2007.
57. Konstantinides, S., Schäfer, K., Neels, J.G., Dellas, C., Loskutoff, D.J. Inhibition of Endogenous Leptin Protects Mice From Arterial and Venous Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* v. 24(11), p. 2196-2220, Nov. 2004.
58. Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., Auwerx, J. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell.* v. 127(6), p. 1109-22, Dec 15. 2006.
59. Lee, D.W., Leinung, M.C., Rozhavskaya-Arena, M., Grasso, P. Leptin and the treatment of obesity: its current status. *Eur J Pharmacol.* v. 440(2-3), p. 129-39, Apr. 2002.
60. Leshner, A.L, Litwin, V.A. A simple method for carcass analysis. *Physiology and Behavior.* v. 9, p. 282 -289. Aug. 1972.
61. Liang F, Kume S, Koya D. SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* v. 5(7), p. 367-73, Jul. 2009.
62. Lins MC, de Moura EG, Lisboa PC, Bonomo IT, Passos MC. Effects of maternal leptin treatment during lactation on the body weight and leptin resistance of adult offspring. *Regul Pept.* v. 127(1-3), p197-202, Apr. 2005.

63. Lisboa, P.C, Passos, M.C, Dutra, S.C, Bonomo, I.T, Denolato, A.T, Reis, A.M, Moura, E.G. Leptin and prolactin, but not corticosterone, modulate body weight and thyroid function in protein-malnourished lactating rats. *Horm Metab Res.* v. 38(5), p. 295-9, May. 2006.
64. Marques, R.G, Morales, M.M., Petroianu, A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras.* v. 24(1), p. 69-74, Feb. 2009.
65. Matheny, M., Zhang, Y., Shapiro, A., Tümer, N., Scarpace, P.J. Central overexpression of leptin antagonist reduces wheel running and underscores importance of endogenous leptin receptor activity in energy homeostasis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* v. 297(5), p, R1254-61, Nov. 2009.
66. McMillen IC, Edwards LJ, Duffield J, Muhlhausler BS. Regulation of leptin synthesis and secretion before birth: implications for the early programming of adult obesity. *Reproduction.* v .131(3), p 415-27, Mar. 2006.
67. Moura, E.G, Bonomo, I.T, Nogueira-Neto, J.F, de Oliveira, E., Trevenzoli, I.H, Reis, A.M, Passos, M.C, Lisboa, P.C. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *J Physiol.* v. 15;587(pt20), p. 4914-29, Oct. 2009.
68. Moura, E.G. & Passos, M.C.F. Neonatal Programming of Body Weight Regulation and Energetic Metabolism. *Bioscience Reports.* v. 25(3-4), p. 251-69, Jun/Aug. 2005.
69. Moura, E.G., Lisboa, P.C., Passos, M.C.F. Neonatal Programming of Neuroimmunomodulation – Role of Adipocytokines and Neuropeptides. *Neuroimmunomodulation.* v. 15(3), p176-88. Sep. 2008.
70. Solomon, G., Niv-Spector, L., Gussakovsky, E,E., Gertler, A. Large-scale preparation of biologically active mouse and rat leptins and their L39A/D40A/F41A muteins which act as potent antagonists. *Protein Expr Purif* v. 47, p.128-36. May. 2006.
71. O’Rahilly, S. Clinical and Molecular Genetic Spectrum of Congenital Deficiency of the Leptin Receptor. *N engl J med.* v. 356(3), p. 237-247, Jan 18. 2007.
72. O’Rahilly, S. Effects of recombinant leptin therapy In a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J med.* v. 341(12), p. 879-84, Sep. 1999.

73. Osmond, C. & Barker, D.J. Fetal, Infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect.* v. 108(Suppl 3), p. 545-53, Jun. 2000.
74. Osmond, C., Barker, D.J., Winter, P.D., Fall, C.H., Simmonds, S.J. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ.* v. 11;307(6918), p. 1519-24, Dec.1993.
75. Passos, M.C, Lins, M.C, Lisboa, P.C, Toste, F.P, Bonomo, I.T, Moura, E.G. Maternal leptin treatment during lactation programs the thyroid function of adult rats. *Life Sci.* v. 80(19), p. 1754-8, Apr 17. 2007.
76. Passos, M.C, Toste, F.P, Dutra, S.C, Trotta, P.A, Toste, F.P, Lisboa, P.C, Moura, E.G. Role of neonatal hyperleptinaemia on serum adiponectin and suppressor of cytokine signalling-3 expression in young rats. *Br. J. Nutr.* v. 101(2), p. 250-6, Jan. 2009.
77. Passos, M.C., Vicente, L.L., Lisboa, P.C., de Moura, E.G. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res.* v.36(9), p. 625-9, Sep. 2004.
78. Passos, M.C.F, Ramos, C. F., Moura, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Research.* v.20, p. 1603-1612. 2000.
79. Passos, M.C.F., Ramos, C.F., Dutra, S.C.P., Mouço, T., Moura, E.G. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Hormone Metabolic Research.* v.34, p.40-43. Jan. 2002.
80. Pedersen, S.B, Ølholm, J., Paulsen, S.K, Bennetzen, M.F, Richelsen, B. Low Sirt1 expression, which is upregulated by fasting, in human adipose tissue from obese women. *International Journal of Obesity.* v. 32, p.1250-1255, Aug. 2008.
81. Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science.* v. 269(5223), p. 40-3, Jul 28. 1995.
82. Pereira-Toste, F., Toste, F.P, Oliveira, E., Trotta, P.A, Lisboa, P.C, Moura, E.G, Passos, M.C. Early maternal hyperleptinemia programs adipogenic phenotype in rats. *Horm Metab Res.* v. 41(12), p. 874-9, Dec. 2009.

83. Peters, J. H., Simasko, S. M., Ritter, R. C. Leptin Analog Antagonizes Leptin Effects on Food Intake and Body Weight but Mimics Leptin-Induced Vagal Afferent Activation. *Endocrinology*. v. 148(6), p. 2878-85, Jun. 2007.
84. Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M.W, Guarente, L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. v. 429(6993), p.771-6, Jun. 2004.
85. Pinto, S., Roseberry, A.G, Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., Horvath, T.L. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*. v. 304(5667), p.110-5, Apr. 2004.
86. Purdham, D.M, Rajapurohitam, V., Zeidan, A., Huang, C., Gross, G.J, Karmazyn, M. A neutralizing leptin receptor antibody mitigates hypertrophy and hemodynamic dysfunction in the postinfarcted rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v.295(1), p.441-6, Jul. 2008.
87. Qiang, L., Wang, H., Farmer, S. R. Adiponectin Secretion Is Regulated by SIRT1 and the Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase Ero1-L α . *Mol Cell Biol*. V. 27(13), p. 4698-707, Jul. 2007.
88. Qiao, L. & Shao, J. SIRT1 Regulates Adiponectin Gene Expression through Foxo1-C/Enhancer-binding Protein Transcriptional Complex. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 281(52), p. 39915-24, Dec 29. 2006.
89. Rajapurohitam, V., Javadov, S., Purdham, M., Kirshenbaum, L.A., Karmazyn, M. An autocrine role for leptin in mediating the cardiomyocyte hypertrophic effects of angiotensin II and endothelin-1. *J. Mol. Cell. Cardiol*. v.41(2), p. 265-274, Aug. 2006.
90. Rana, J. S., Nieuwdorp, M., Jukema, J. W., Kastelein, J. J. P. Cardiovascular metabolic syndrome – an interplay of, obesity, inflammation, diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Obesity and Metabolism*. v. 9(3), p. 218-232, May. 2007.
91. Ravelli, G.P., Stein, Z.A & Susser, M.W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*. v.295(7), p.349-53, Aug 12. 1976.
92. Rodgers, J.T & Puigserver, P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 104(31), p.12861-6, Jul 31. 2007.

93. Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M, Puigserver, P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*. v. 434(7029), p. 113-8, Mar. 2005.
94. Rodrigues, A.L, de Moura, E.G, Passos, M.C, Dutra, S.C, Lisboa, P.C. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol*. v. 587(pt11), p. 2647-61, Jun 1. 2009.
95. Rodrigues, A.L, De Souza, E.P, Da Silva, S.V, Rodrigues, D.S, Nascimento, A.B, Barja-Fidalgo, C., De Freitas, M.S. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol*. v. 195(3), p. 485-94, Dec. 2007.
96. Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. v. 414(6865), p. 799-806, Dec 13. 2001.
97. Sampaio de Freitas, M., Garcia De Souza, E.P, 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*. v. 639(1), p.8-16, Sep 1. 2003.
98. Scarpace, P.J., Matheny, M., Zhang, Y, Cheng, K., Tu"mer, N. Leptin Antagonist Reveals an Uncoupling between Leptin Receptor Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signaling and Metabolic Responses with Central Leptin Resistance. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. v. 320(2), p.706-712, Feb. 2007.
99. Sichieri, R., de Moura, E.C. A multilevel analysis of variations in body mass index among adults, Brazil, 2006. *Rev Saude Publica*. v. 43(Suppl 2). p. 90-7, Nov. 2009.
100. Silva, S.V, Garcia-Souza, E.P, Moura, A.S, Barja-Fidalgo, C. Maternal Protein Restriction During Early Lactation Induces Changes on Neutrophil Activation and TNF-alpha Production of Adult Offspring. *Inflammation*. v.15. Oct. 2009.
101. Stansbie, D., Browsey, R.W., Crettaz, M., Demton, R.M. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of acids synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxilase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem J*. v. 160(2), p. 413-6, Nov 15. 1976.

102. Stepan, C. M., Wang, J., Whiteman, E. L., Birnbaum, M. J., Lazar, M. A. Activation of SOCS-3 by Resistin. *Molecular and cellular biology*. v.25(4), p.1569-1575, Feb. 2004.
103. Stocker CJ, Wargent E, O'Dowd J, Cornick C, Speakman JR, Arch JR, Cawthorne MA. Prevention of diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats following administration of leptin to their mothers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v. 292(5), p.1810-8, May. 2007.
104. Teixeira, C.V., Passos, M.C.F., Ramos, C.F., Dutra, S.C.P., Moura, E.G. Leptin serum concentration in rats whose mothers were submitted to malnutrition during lactation. *Journal Nutritional Biochemistry*. v.13(8), p.493-498, Aug. 2002.
105. Teixeira, C.V., Ramos, C.D., Mouco, T., Passos, M.C., Moura, E.G. Leptin injection during lactation alters thyroid function in adult rats. *Horm Metab Res*. v.35(6), p.367-371, Jun. 2003.
106. Toste, F.P., Moura, E.G., Lisboa, P.C., Fagundes, A.T., Oliveira, E., Passos, M.C.F. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *British Journal of Nutrition*. v.95(4), p.830-837, Apr. 2006a.
107. Toste, F.P., Alves, S.B., Dutra, S.C.P., Bonomo, I.T., Lisboa, P.C., Moura, E.G. & Passos, M.C.F. Temporal evaluation of the thyroid function of rats programmed by leptin treatment on the neonatal period. *Horm Metab Res*. v.38(12), p.827-831, Dec. 2006b.
108. Trevenzoli, I.H., Valle, M.M.R., Machado, F.B., Garcia, R.M.G., Passos, M.C.F., Lisboa, P.C. & Moura, E.G. Neonatal hyperleptinemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol*. v.580(Pt 2), p. 629-637, Apr 15. 2007.
109. Troina, A.A, Figueiredo, M.S., Moura, E.G., Boaventura, G.T., Soares, L.L., Cardozo, L.F, Oliveira, E., Lisboa, P.C., Passos, M.A., Passos, M.C. Maternal flaxseed diet during lactation alters milk composition and programs the offspring body composition, lipid profile and sexual function. *Food Chem Toxicol*. v. 48(2), p. 697-703, Feb. 2010.
110. Valassi, E., Scacchi, M., Cavagnini, F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*. v.18, p.158-168. Feb. 2008.

111. Vicente, L.L., Moura, E.G., Lisboa, P.C., Monte Alto Costa, A., Amadeu, T., Mandarim-de-Lacerda, C.A. & Passos, M.C. Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. *Nutrition*. v.20(10), p. 924-928, Oct. 2004.
112. Vickers, M.H., Gluckman, P.D., Coveny, A.H., Hofman, P.L., Cutfield, W.S., Gertler, A., Breier, B.H., Harris, M. The Effect of Neonatal Leptin Treatment on Postnatal Weight Gain in Male Rats Is Dependent on Maternal Nutritional Status during Pregnancy. *Endocrinology*. v. 149(4), p.1906–1913, Apr. 2008.
113. Wang, R.H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H.S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., Jia, R., Zheng, Z.M., Appella, E., Wang, X.W., Ried, T., Deng, C.X. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*. v.14(4), p. 312-23, Oct. 2008
114. Widdowson, P.S., Upton, R., Henderson, L., Buckingham, R., Wilson, S., Williams, G. Reciprocal regional changes in brain NPY receptor density during dietary restriction and dietary-induced obesity in the rat. *Brain Res*. v. 774(1-2), p. 1-10, Nov.1997.
115. World Health Organization. The World Health Report 2003—Shaping the Future. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 2003.
116. X. Li, S. Zhang, G. Blander, J.G. Tse, M. Krieger and L. Guarente. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell*. v.28, p. 91–106. Oct. 2007.
117. Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., Kawamura, M., Takemura, M., Kakui, K., Ogawa, Y., Fujii, S. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab*. v. 1(6), p. 371-8, Jun. 2005.
118. Zhang, J. Leptin antagonist prevents the homeostatic downregulation following high-fat enhanced caloric intake. *FASEB J*. v.832 Part 2. 2006.
119. Zhang, Y. & Scarpace, P.J. The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol Behav*. v. 88(3), p.249-56. Jun. 2006.
120. Zhang, Y., Proença, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its homologue. *Nature*. v.372(6505). p. 425 – 432. Mar. 1994.

ARTIGO CIENTÍFICO**INHIBITION OF HIGH SERUM LEPTIN AT 29 AND 30 DAYS OF LIFE PREVENTS METABOLIC DISORDERS IN ADULT RATS PROGRAMMED BY LEPTIN ADMINISTRATION DURING LACTATION**

P.A. Trotta¹, E.G. Moura¹, J.G. Franco¹, N.S. Lima¹, A. Cordeiro³, L.L. Souza³, K.J. Oliveira³, P.C. Lisboa¹, C.C. Pazos-Moura³, M.C.F. Passos^{1,2}

¹Department of Physiological Sciences, Biology Institute, ²Department of Applied Nutrition, Nutrition Institute, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ³Biophysic Institute Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil

RUNNING TITLE: leptin inhibition reverts the programming

KEY WORDS: leptin; programming; leptin antibody

TOTAL NUMBER OF WORDS: 3,502

* Corresponding author:

Professor Egberto Gaspar de MOURA, Ph.D.

Departamento de Ciências Fisiológicas – 5o andar

Instituto de Biologia - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Av. 28 de setembro, 87- Rio de Janeiro, RJ, 20550-030 - Brazil

Phone #: (+55.21) 25876434, FAX #: (+55.21) 25876129

e-mail: egbertomoura@globocom

NON – TECHNICAL SUMMARY: Hyperleptinemia during lactation programs the rats for higher serum leptin concentrations at 30 and 180 days old. Our objective was to evaluate if the inhibition of leptin with anti-leptin antibody, at 29 and 30 days old rats, reverts the metabolic phenotype programmed by leptin administration on the first 10 days of lactation and the role of Sirtuin1. In

fact, programmed changes, such as higher visceral fat mass hypertriglyceridemia and hyperleptinemia were prevented by inhibition of leptin, and Sirtuin 1 was only higher in this group. Our results suggest an important role of serum leptin, a week after weaning, suggesting another critical period for imprinting. It is likely that Sirtuin1 plays a major role in these reversals.

TOTAL NUMBER OF WORDS: 115

ABSTRACT

Hyperleptinemia during lactation programs for higher serum leptin in 30 and 180 days-old rats, higher adiposity and related metabolic changes. Here we evaluated the inhibition of serum leptin at 29 and 30 days on the metabolic phenotype of rats programmed with leptin during lactation. Pups from Wistar rats were saline-injected (C) or leptin-injected (L) from postnatal day 1 to day 10. At 29 and 30 days old the animals from both groups were injected with anti-leptin antibody (LA and CA) or saline (LS and CS). The higher visceral (VFM) (+53%) and total fat mass (TFM) (+33%), hyperleptinemia (+67%) hypertriglyceridemia (+47%) and lower adiponectinemia (-44%) observed in LS group compared to CS were prevented by immunoneutralization of leptin, since LA group had those parameters values similar to CS group. However, the immunoblockade of leptin in normal animals led to the same metabolic changes seen in leptin-treated animals, in addition to a lower serum adiponectin (-74% versus CS) and higher insulin resistance index (+37%). Hepatic SIRT1, a histone/protein deacetylase, was higher (+41%) only in LA group, suggesting a role for SIRT1 and possible epigenetic mechanisms in prevention of leptin programming. Therefore, our data suggest that one week after weaning is also a critical period for metabolic imprinting and that either lack or excess of leptin programs for metabolic unfavorable phenotype at adulthood. Remarkably, inhibition of hyperleptinemia effects in 30 days-old rats abolish most of the leptin-programmed unfavorable metabolic phenotype, which represents a promising strategy for prevention or treatment of these metabolic dysfunctions.

TOTAL NUMBER OF WORDS: 250

Abbreviations: SIRT1, sirtuin 1; VFM, visceral fat mass; TFM, total fat mass.

INTRODUCTION

Obesity and related metabolic disorders have become a major health issue in modern society and it is widely associated with lifestyle and dietary factors. In addition, it is often associated with a susceptibility to develop a series of diseases later in life, such as type 2 diabetes, hypertension, dyslipidemia that are risk factors for cardiovascular diseases and regrouped as the well-described metabolic syndrome (Barker et al. 1993).

Recent investigations in experimental animal models have brought new insight into the early events in the ontogeny of obesity and have reinforced the concept of programming. This concept supports the idea that nutritional and hormonal status during early life determines the long-term control of energy metabolism, particularly by programming the food intake and energy expenditure regulation (Moura et al. 2008; Moura & Passos, 2005).

Developmental programming may be considered as an attempt to match the original experiences during fetal life to the expected future environment (Gluckman et al. 2007). The mechanisms underlying this metabolic programming remain poorly documented. It has been proposed that these effects can be achieved by changes in the expression of genes that regulates metabolism mediated by epigenetic mechanisms. Sirtuin 1 (SIRT1), a Class III histone/protein NAD⁺-dependent deacetylases, have been importantly implicated in the regulation of energy homeostasis and longevity (Blander & Guarente, 2004; Guarente & Picard, 2005; Finkel et al. 2009). Among multiple targets, SIRT1 is able to modulate the activity of key transcriptional factors and receptors involved in the regulation of genes of the metabolic and oxidative processes, in response to nutrient availability or hormonal status. Increased activity of SIRT1 has been associated with lower adiposity and protection to diet-induced metabolic disorders (Bordone et al. 2007; Guarente, 2006; Liang et al. 2009; Pfluger et al. 2008; Banks et al. 2008; Purushotham et al. 2009).

Our group developed several models of neonatal programming in which serum leptin was higher in the mothers or pups during lactation and could act as a hormonal imprinting, such as protein malnutrition (Teixeira et al. 2002; Lisboa et al. 2006), inhibition of prolactin at the end of lactation (Bonomo et al. 2005) and small litter size (Rodrigues et al. 2009). Other reports indicate that leptin may play critical role in the establishment of the programming of body adiposity, insulin resistance, leptin resistance, and glucose and lipid metabolism, when its injected in the pups or mothers during the neonatal period (De Oliveira Cravo et al. 2002; Yura et al. 2005; Lins et al. 2005; Toste et al. 2006; McMillen et al. 2006; Stocker et al. 2007; Vickers et al. 2008; Passos et al. 2009; Pereira-Toste et al. 2009).

Our previous findings (De Oliveira et al. 2002) showed that hyperleptinemia, induced by leptin administration in the first 10 days of lactation, programmed for higher body mass and food intake, higher serum leptin accompanied by resistance to its anorexigenic effect and lower expression of hypothalamic leptin receptor at 150 days old rats (Toste et al. 2006) and higher catecholamine secretion by adrenal medullae (Trevanzoli et al. 2007). Recently, we showed that these animals present hyperleptinemia already when they were 30 days old, and hypothalamic increase of SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling 3), an intracellular feedback inhibitor of leptin signaling pathway, which may play a critical role in the establishment of this programming (Passos et al. 2009).

The recent development of leptin muteins with antagonistic properties and other proteins that block leptin activity opens up new possibilities for their use in research and, eventually, therapy. The specific leptin muteins act as competitive antagonists that bind to the leptin receptor, and are completely unprovided of agonistic activity (Solomon et al. 2006). Recently, Rajapurohitam et al. (2006) showed that the hypertrophic effects of leptin on cell area of ventricular cardiomyocytes were prevented by rat muteins. The same antagonist administered, for seven days, on lateral hypothalamus also prevented the increase in fat diet intake of 5 months-old rats (Zhang et al. 2007). This group also related that the acute administration of leptin antagonist inhibited leptin anorexigenic effect blocking the hypothalamic signaling pathway. When used during lactation leptin antagonist programmed female

rats to leptin resistance, higher adiposity and hiperleptinemia in later life (Attig et al. 2008), similar to leptin programming effect.

Thus, based in this context, we raised the hypothesis that the inhibition of the elevated serum leptin in 29 and 30 days old could revert the changes in the metabolic phenotype in rats programmed with leptin during lactation. We also addressed the question of whether the same blockage would affect normal rats. So, the aim of this study was to investigate the effects of leptin blockage, in 29 and 30 days old, on the metabolic phenotype in rats programmed with leptin during lactation. In addition, in order to have some insight into the mechanisms involved, we evaluated the role of SIRT1.

METHODS

Animals

The use of the animals according to our experimental design was approved by the Animal Care and Use Committee of the Biology Institute of The State University of Rio de Janeiro (protocol CEA/187/2009), which based their analysis on the principles adopted and promulgated by the Brazilian Law issued on November 8, 2008, by the President of the Brazilian Republic, which concerns the rearing and use of animals in teaching and research activities in Brazil (Marques et al. 2009). Experiments were conducted to minimize the number of animals used and the suffering caused by the procedures used in the present study following the ethical doctrine of the three 'Rs' – reduction, refinement and replacement (Drummond, 2009).

Wistar rats were housed under constant conditions with controlled temperature ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) and with artificial dark-light cycles (lights on from 07:00 a.m. to 07:00 p.m.) and fed with a standard chow diet.

One day after delivery (birth=day 0) all of the litters (n=8) were adjusted to six males for each dam, because litter size has been shown to influence lactating performance (Fishbeck & Rasmussen, 1987).

Model of Neonatal Hyperleptinemia

Pups, within 24 hours of birth, were randomly assigned into two groups of 24 animals: Leptin (L) – daily s.c. single injected with 8 μ g/100g of body weight (Toste et al. 2006a, b) of recombinant mouse leptin (Peprotech Inc, New Jersey, USA) for the first 10 days of lactation and the control (C) that received instead the same volume of saline (NaCl 0.9%).

Postweaning studies

Inhibition of high serum leptin for two days

At 29th and 30th days of age, the animals were subdivided into four groups (n=12) that received subcutaneously, one injection, each day, of either 3 μ g/100g of body weight anti-leptin antibody (Anti-Murine Leptin, Peprotech Inc, New Jersey, USA): groups LA and CA, or saline: LS and CS. The treatment with anti-leptin antibody was adapted from Konstantindes et al (2004).

Food intake, body mass and body composition

During lactation body mass (BM) and food intake (FI) were monitored daily. From weaning until day 200, BM and FI were monitored every 4 days. The amount of the diet ingested comprised the difference between the weight of food that remains in the food bin and the amount released four days earlier.

Body composition (fat mass) was determined at 200 days by carcass analysis as reported previous (Fagundes et al. 2009; Troina et al. 2009). After sacrifice, the animals were eviscerated, the carcass were weighed, autoclaved for 1 hour and homogenized on distilled water (1:1). Samples of the homogenate were stored at 4°C for analysis. Three grams of homogenized were used to determine fat mass gravimetrically. The samples were hydrolyzed on a shaking water bath at 70°C for 2 hour with 30% KOH and ethanol. The total fatty acids and free cholesterol were removed with 3 successive washing with petroleum ether. After drying overnight in vacuum all tubes were weighed and the results were expressed by grams of fat by 100 grams of carcass.

Visceral fat mass (mesenteric, epididimal and retroperitoneal) was excised and immediately weighed for the evaluation of central adiposity.

Serum Glucose, Triglycerides, Leptin, Adiponectin and Insulin measurement

Two hundred days-old animals were killed by decapitation and trunk blood was collected, centrifuged (1,500 x g/20 min/4° C) to obtain serum, which was frozen (-20°C) until assaying. Glucose and triglycerides (TG) were analysed using Biosystem ® commercial test kits (Barcelona, Spain). Each one of the hormones was evaluated in only one RIA assay. Leptin was measured by radioimmunoassay (RIA) kit (LINCO Research, Inc., MO, U.S.A.). This kit measures both rat and mouse leptin with an assay sensitivity of 0.5 ng/mL and an intra-assay variation of 4.2%. Insulin was measured by radioimmunoassay (RIA) kit (ImmuChem™125I, reconstituted tubes, ICN Biomedicals, Inc, U.S.A.), with an assay sensitivity of 0.1 ng/mL and an intra-assay variation of 8.9%. Adiponectin was measured with a specific RIA kit (Linco Research, St Charles, MO, USA) with an assay sensitivity of 0.5 ng/ml and an intra-assay variation of 7.1%.

Insulin sensitivity

To determine the insulin sensitivity of adult animals, we used the insulin resistance index (IRI), calculated as follows: fasting glycemia (mg/dL) X fasting insulinemia (µIU/mL).

Western blotting analysis

Hepatic tissues were excised and homogenized in an Ultra-Turrax T25 basic (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany), in lyses buffer [50 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 10mM EDTA, and 1%Triton X-100 with the protease inhibitor cocktail Complete (Roche, Indianapolis, IN, U.S.A.) (pH 6.4)]. A total of 30 µg total protein per sample was resolved by SDS-PAGE on a 12.5% gel and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Whatman plc, Kent, UK). Membrane was blocked with 5% nonfat dry milk (Molico; Nestle, Sao Paulo, Brazil) and incubated overnight at room temperature with anti-

SIRT1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., San Francisco, CA, U.S.A.; 1:500 dilution) and with the internal control anticyclophilin B antibody (Affinity BioReagents, Inc., Golden, CO, U.S.A.; 1:3000 dilution). Membranes were then washed and incubated with peroxidase-labeled antirabbit IgG antibody (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ, U.S.A.; 1:6250 dilution) for 3h at room temperature. All blots were then washed and incubated with a luminogen detection reagent (ECL; Amersham Biosciences, NJ, USA) to further exposure on autoradiograph film (Eastman Kodak, Sao Paulo, Brazil). The protein bands were evaluated by densitometry using the software Kodak 1 D 3.5. The membranes were stained with rouge ponceau to evaluate the relative amounts of transferred proteins. (Almeida et al. 2009)

Statistic analysis

The data are reported as mean \pm SEM. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparisons test were used to analyze experimental observations with significance level set at $p < 0.05$. Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons test were used to analyze experimental observations of SIRT1 hepatic content.

RESULTS

There were no significant effects of either neonatal leptin treatment (LS) or anti-leptin antibody (CA) injections on food intake and body weight from weaning until 200 days of age (figure 1). However, neonatally leptin-treated rats, exhibited at adulthood (200 days-old) higher carcass total fat mass (TFM, +33%, $P < 0.05$) and visceral fat mass (VFM, +53%, $P < 0.05$), as compared to control saline-treated rats (CS). The same profile was found in the normal group injected at the 29th and 30th days of age with the anti-leptin antibody (CA), which presented higher TFM (+33%, $P < 0.05$) and VFM (+48%, $P < 0.05$) as compared with controls (CS) (fig. 2A and 2B). By the contrary, the anti-leptin antibody administration at the 29th and 30th days of age in the animals treated during the first 10 days of life with leptin (LA) normalized the observed changes in TFM and VFM (figure 2 A,B) at adulthood.

Figure 3A shows serum leptin concentration of 200 days-old animals. Serum leptin was significantly higher in LS animals compared to both CS and LA groups (+67%, $P<0.05$ and 1.5 times, $P<0.01$, respectively). CA group also had a higher serum leptin concentration compared to CS (+82%, $P<0.05$) and to LA groups (1.8 times, $P<0.01$). LA group exhibited serum leptin similar to CS. Serum triglycerides were higher in both LS and CA animals compared to CS (+47%, $P<0.05$, +39%, $P<0.05$, respectively) and LA groups (+55%, $P<0.05$, +46.5%, $P<0.05$, respectively) and serum triglycerides of LA group was similar to CS group, as shown in Fig.3B. Serum adiponectin concentrations (Fig.3C) were significantly lower in CA group than in the other groups (-74%, $P<0.05$, compared to CS). Conversely, LA animals presented higher levels of adiponectin compared to LS animals (+69%, $P<0.05$). Coherently, LA animals presented the lowest serum insulin concentration (-26% compared to LS $P<0.05$) as shown in figure 4B. CA animals presented higher glucose (+43.6% compared to CS $P<0.05$, Figure 4A) and higher IRI (+44%, $P<0.05$ compared to CS, Figure 4C). Higher levels of hepatic SIRT1 were observed only in LA animals (+41%, $P<0.05$ compared to CS) and the other groups did not differ among them (figure 5).

DISCUSSION

The remarkable finding of the present study is that the inhibition of leptin action at 29 and 30 days old could reverse metabolic disorders in rats programmed by leptin treatment during the first 10 days of lactation when they reached 200 days of age. However, in the normal animals, leptin inhibition at the same period of time produced the same metabolic and hormonal changes that the administration of leptin at the first ten days of lactation.

It has been demonstrated that high leptin levels in early life leads to obesity and a range of other related metabolic alterations (Pereira-Toste et al. 2009). These changes are possible because in the rat the central nervous system is still immature and very plastic on the first days after birth. The neural orexigenic and anorexigenic pathways are changed permanently, both morphologically and functionally, by the administration of leptin during this period (Bouret et al. 2004; Pinto et al. 2004).

We previously reported that energetic or caloric restriction during lactation increases the progeny serum leptin concentration at the end of lactation (Teixeira et al. 2002) and this could be due to a higher maternal leptin production and transfer through the milk (Lisboa et al. 2006). In another model of malnutrition, induced by inhibition of prolactin at the end of lactation, we also observed a higher transfer of leptin through the milk (Bonomo et al. 2005). All these models of neonatal imprinting programmed for leptin resistance at adulthood (Passos et al. 2004; Bonomo et al. 2007) and changes in insulin resistance, adiponectinemia, triglycerides and HDLc (Fagundes et al. 2009; Moura et al. 2009). Since leptin seems to be important for programming, we developed two models of neonatal leptin imprinting. In one of them we administered leptin to the mothers, either at the end of lactation (Lins et al. 2005) or in the first ten days (Pereira-Toste et al. 2009). In both situations, we observed higher amount of visceral adipose tissue, higher serum glucose, and higher serum leptin in 180 days old animals compared to control group. When injected directly in the pups, leptin programmed for hyperleptinemia (de Oliveira Cravo et al. 2002), leptin resistance to its anorexigenic effect associated with lower OBRb hypothalamic expression in 180 days-old animals (Toste et al. 2006). However, most of these altered metabolic parameters are observed already when pups are 30 days-old (Toste et al. 2006), including higher hypothalamic SOCS3 (Passos et al. 2009), which could explain the leptin intracellular resistance, since SOCS3 docks to the 985Y JAK2 domain attenuating leptin receptor signaling and contributing to leptin resistance (Israel & Chua, 2010). In the present study, we also observed higher total and visceral fat mass and leptin serum concentration in the adult leptin-treated group, effects that were abolished by the blocking of the leptin at 30 days with the antibody administration.

Curiously, the immunoneutralization of leptin in normal animals produced the same kind of alterations observed in leptin-programmed group (LS) group, such as higher total and visceral fat mass, higher serum leptin and serum triglycerides and reduced adiponectin suggesting that at this age, 30 days-old, it is important to maintain a normal leptin serum concentration. In agreement with our results, Attig et al (2008) administered leptin antagonist during lactation and programmed female rats to leptin resistance, higher

adiposity and hiperleptinemia in later life. Therefore, inhibition of the action of leptin during a critical neonatal period impairs hypothalamic development, programming for metabolic disturbances. Thus, higher or lower leptin serum concentration in a critical period can program changes in adiposity, leptin concentration and action, and alter glucose and lipid homeostasis.

Triglyceride was higher in both leptin programmed (LS) and control antibody-treated (CA) groups, and the immunoneutralization of leptin-treated group at 29 and 30 days of age (LA group) normalized those changes. Higher triglyceride is associated with diabetes mellitus or insulin resistance (Cannon, 2008; Depres & Marette, 1994).

Consistent with their increase in adiposity, the animals of control anti-leptin-treated group (CA) showed changes in glucose homeostasis characterized by hyperglycemia, higher insulin resistance index and lower adiponectinemia. Leptin neonatal programming (LS) induced a trend to insulin resistance since high insulin serum levels were observed in the presence of normal glycemia and adiponectin showed a non-statistically significant reduction. These changes were also prevented by the administration of the antibody against leptin at the 29th and 30th day of age (LA group), again showing the importance of the appropriate leptin concentrations at neonatal life to the glucose homeostasis at adulthood.

The mechanistic basis of programming with leptin or reprogramming by leptin immunoneutralization is unknown. However, based on current knowledge of the role of SIRT1, the higher expression of SIRT1 in the liver of adult rats reprogrammed by leptin antibody might be involved in the prevention of the metabolic phenotype induced by leptin neonatal treatment. SIRT1 overexpression in mice have been reported to promote reduced adiposity, lower blood triglycerides, reduced leptin and decreased serum insulin (Bordone et al. 2007). Sirt 1 overexpression has also been reported to improve glucose tolerance and increase adiponectin levels in models of diet-induced insulin resistance (Banks et al. 2008, Pfluger et al. 2008). In a model of SIRT1 overexpression targeted to the pancreatic islet cells, the animals show improvement of glucose tolerance and higher glucose-stimulated insulin secretion (Moynihan et al., 2005). Activating SIRT1 with the synthetic compound SRT1720, not only protected mice from insulin resistance and

obesity, but also decreased white adipose stores and reduced levels of serum triglycerides (Feige et al. 2008). SIRT 1 has an important role in the regulation of hepatic lipid and glucose metabolism. Hepatic-specific hyperexpression of SIRT1, via activation of PGC1 α and PPAR α increases the fat oxidative metabolism (Rodgers & Puigserver 2007; Purushotham et al. 2009). Therefore, higher hepatic SIRT1 content in LA animals may be potentially associated with increased SIRT1 expression, which regulates metabolic genes expression contributing to the favorable metabolic phenotype of LA group. The fact that CA animals had no increase in SIRT1 could explain the inappropriated insulin secretion in relation to the higher glycemia.

In conclusion, blocking leptin action one week after weaning seems to revert most of the alterations observed in rats programmed by neonatal hiperleptinemia, and probably this normalizing effect is mediated, at least in part, through higher SIRT1 expression in the liver leading to a better glucose and lipid metabolism. Both low fat mass and high SIRT1 are correlated with better insulin sensitivity (Liang et al. 2009). Thus, normal levels of leptin in the first month of life, in rats, is important to adipogenesis, glucose homeostasis and lipid metabolism during development, while higher or lower levels may be deleterious to the animal health.

ACKNOWLEDGEMENT

Research is supported by the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; CNPq), Coordination for the Enhancement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; CAPES) and the State of Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro; FAPERJ).

All authors are grateful to Ms Monica Gaspar de Moura and Mr Carlos Roberto for their technical assistance.

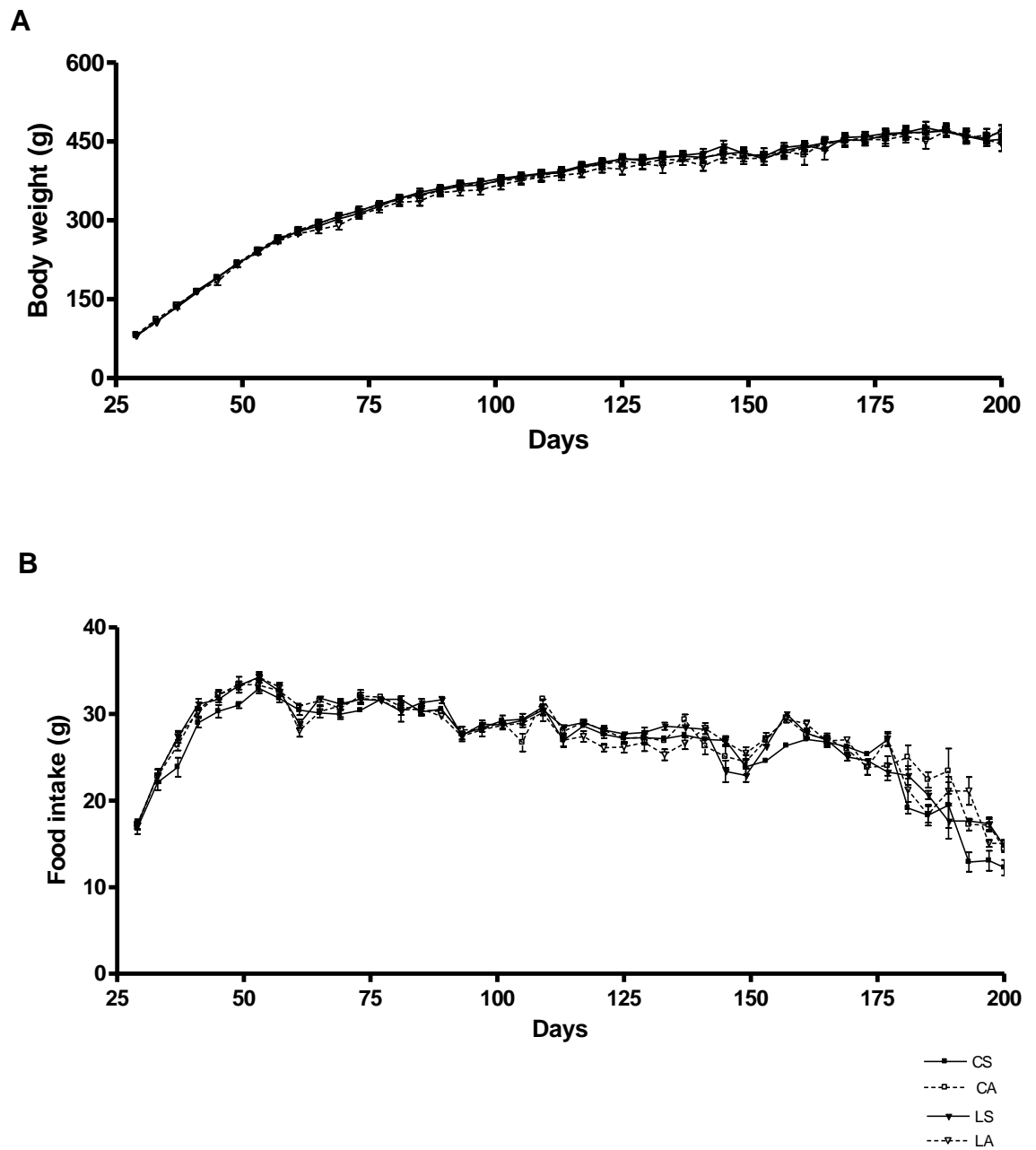


Figure 1 – Body weight and food intake evaluation. Body weight (A) and food intake (B) from post weaning (25 days old) until 200 days-old rats that received daily injections of leptin (L) or saline (C) during the first 10 days of lactation and post-weaning (29 and 30 days old) were injected with anti-leptin antibody (CA and LA) or saline (CS and LS). Values represent the mean \pm SEM of 12 animals per group.

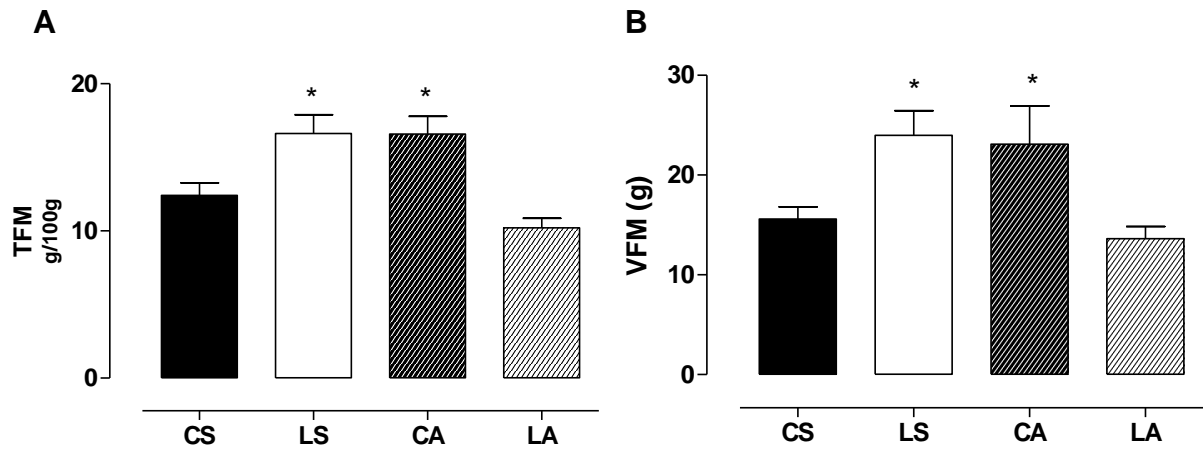


Figure 2 – Evaluation of Total Fat Mass (TFM – Panel A) and Visceral Fat Mass (VFM – Panel B) in 200 days-old rats that received daily injections of leptin (L) or saline (C) during the first 10 days of lactation and post-weaning (29 and 30 days old) were injected with anti-leptin antibody (CA and LA) or saline (CS and LS). Values represent mean \pm SEM of 12 animals per group. (*) Significant differences between treated groups (LS-CA) and CS. The level of significance set at $P < 0.05$.

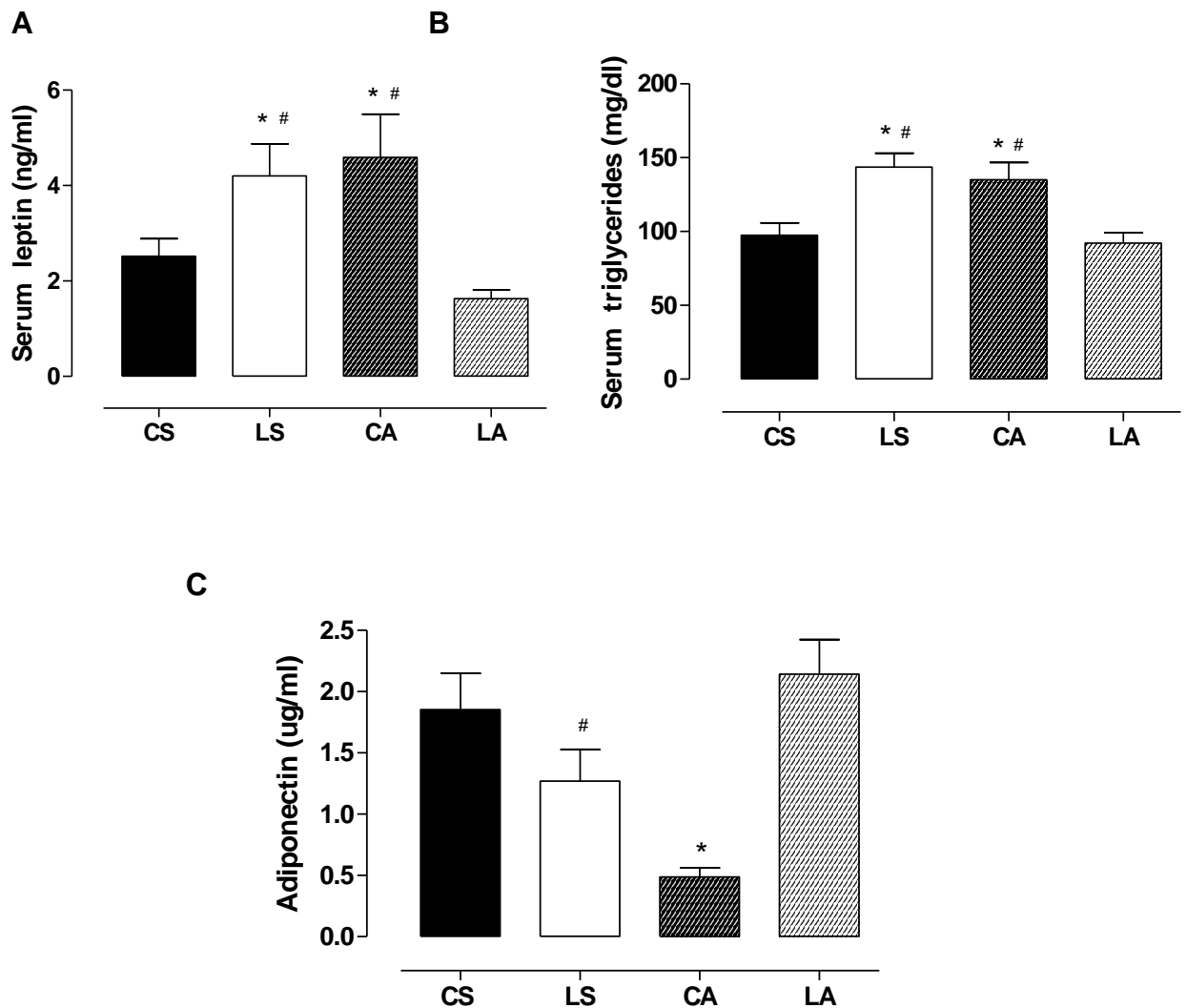


Figure 3 – Evaluation of serum dosages. Serum leptin (A), triglycerides (B), adiponectin (C) in 200 days-old rats that received daily injections of leptin (L) or saline (C) during the first 10 days of lactation and post-weaning (29 and 30 days old) were injected with anti-leptin antibody (CA and LA) or saline (CS and LS). Values are expressed as the mean \pm SEM of 12 animals per group. (*) Significant differences

between treated groups and CS. (#) Significant differences between treated groups and LA. The level of significance was set at $P < 0.05$.

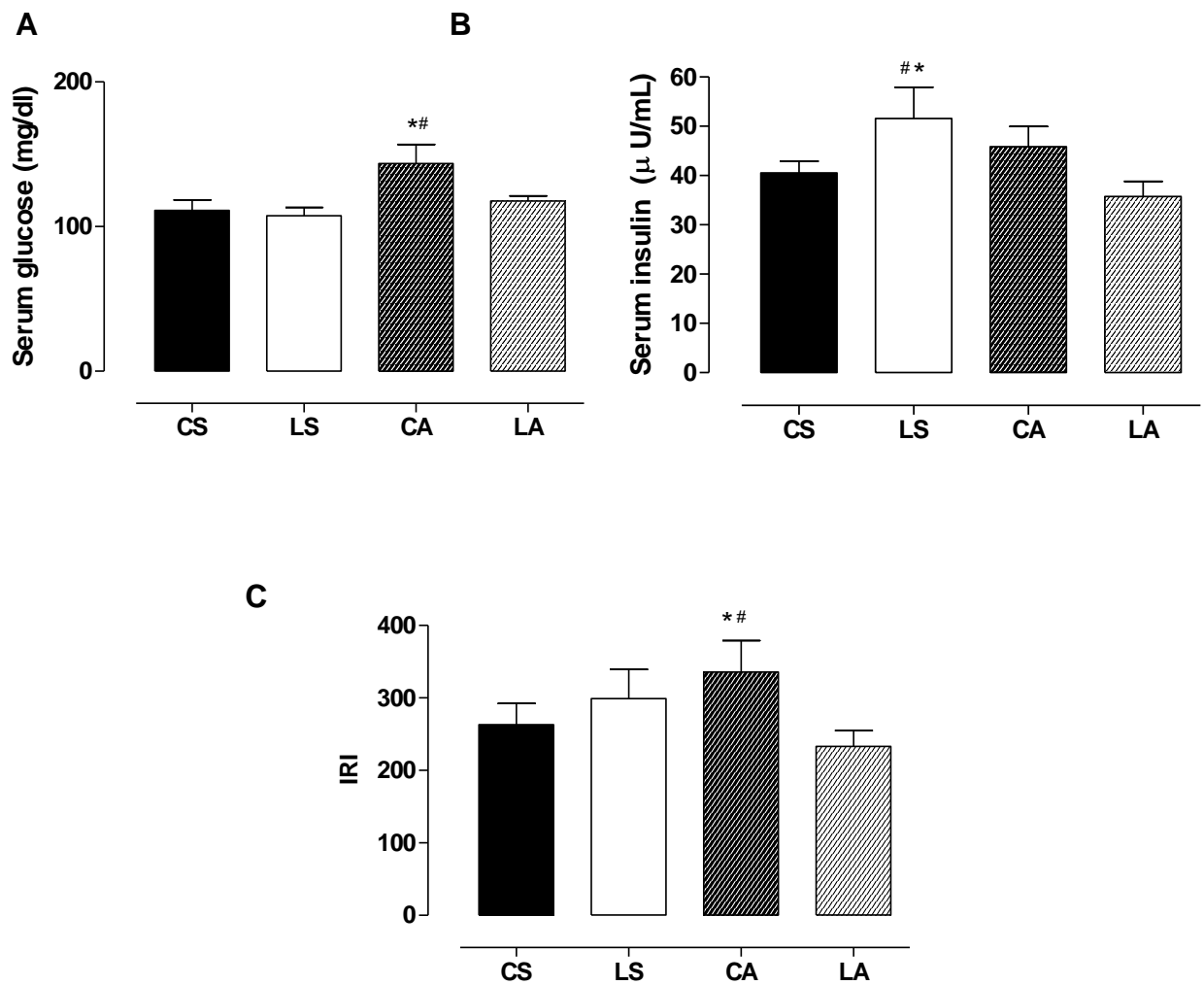


Figure 4 – Glucose metabolism homeostasis. Glucose (A), insulin (B) and Insulin Resistance Index – IRI (C) in 200 days-old rats that received daily injections of leptin (L) or saline (C) during the first 10 days of lactation and post-weaning (29 and 30 days old) were injected with anti-leptin antibody (CA and LA) or saline (CS and LS).

Values are expressed as the mean \pm SEM of 12 animals per group. (*) Significant differences between treated groups and CS. (#) Significant differences between treated groups and LA. The level of significance was set at $P < 0.05$.

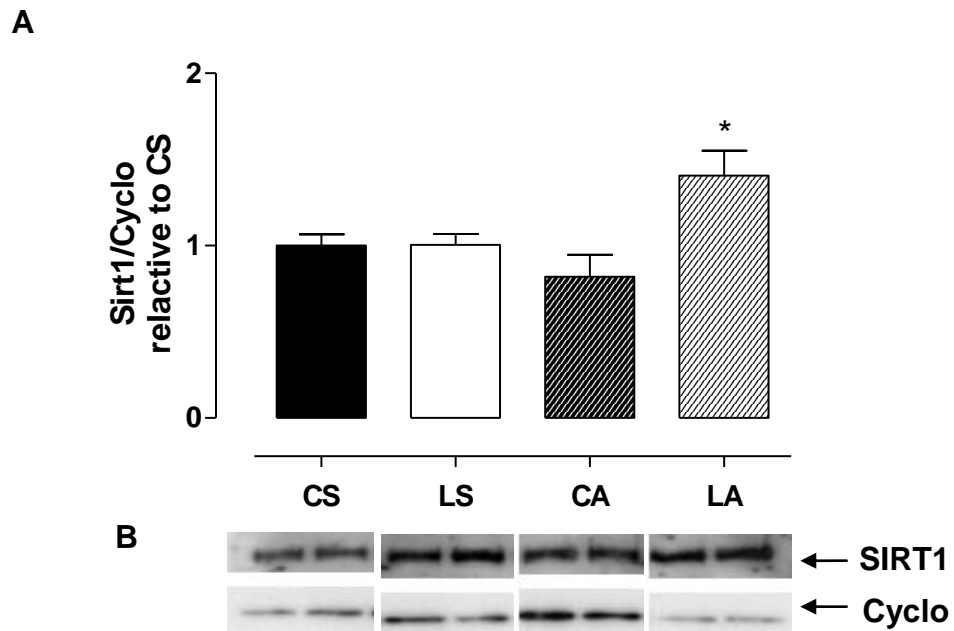


Figure 5 – Hepatic Sirtuin1 expression. Densitometric values (A) and representative autoradiograph (B) of SIRT1 (120kDa) and cyclophilin (19kDa, internal control) evaluated by western blotting in liver of 200 days-old rats that received daily injections of leptin (L) or saline (C) during the first 10 days of lactation and post-weaning (29 and 30 days old) were injected with anti-leptin antibody (CA and LA) or saline (CS and LS). Values are expressed as the mean \pm SEM of 8 animals per group. (*) Significant different from all groups.

References

1. Almeida NA, Cordeiro A, Machado DS, Souza LL, Ortiga-Carvalho TM, Campos-de-Carvalho AC, Wondisford FE & Pazos-Moura CC (2009). Connexin40 messenger ribonucleic acid is positively regulated by thyroid hormone (TH) acting in cardiac atria via the TH receptor. *Endocrinology* **150**, 546-54.
2. Attig L, Solomon G, Ferezou J, Abdennebi-Najar L, Taouis M, Gertler A & Djiane J (2008). Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes* **32**, 1-8.
3. Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutierrez-Juarez R, Rossetti L, Gu W & Accili D (2008). SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* **8**, 333-341.
4. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*, 36: 62-7.
5. Blander G & Guarente L (2004). The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* **73**, 417-35.
6. Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC, Pazos-Moura CC, Reis AM & Moura EG (2005). Prolactin inhibition in lactating rats changes leptin transfer through the milk. *Horm Metab Res* **37**, 220-5.
7. Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC & Moura EG (2007). Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J Endocrinol* **192**, 339-44.

8. Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J, Gu W & Guarente L (2007). SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* **6**, 759-67.
9. Bouret SG, Draper SJ & Simerly RB (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* **304**, 108-10.
10. Cannon CP (2008). Mixed dyslipidemia, metabolic syndrome, diabetes mellitus, and cardiovascular disease: clinical implications. *Am J Cardiol* **22**, 5-9
11. de Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MC & Lisboa PC (2009). Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *J Physiol* **587**, 4919-29.
12. de Oliveira Cravo C, Teixeira CV, Passos MC, Dutra SC, de Moura EG & Ramos C (2002). Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Horm Metab Res* **34**, 400-5.
13. Despres JP & Marette A (1994). Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr Opin Lipidol* **5**, 274-289.
14. Drummond GB (2009). Reporting ethical matters in the Journal of Physiology: standards and advice. *J Physiol* **587**, 713-9.
15. Fagundes AT, Moura EG, Passos MC, Santos-Silva AP, de Oliveira E, Trevenzoli IH, Casimiro-Lopes G, Nogueira-Neto JF & Lisboa PC (2009). Temporal evaluation of body composition, glucose homeostasis and lipid profile of male rats programmed by maternal protein restriction during lactation. *Horm Metab Res* **41**, 866-73.

16. Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakis C, Elliott PJ & Auwerx J (2008). Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation, *Cell Metab* **8**, 347-358.
17. Finkel T, Deng CX & Mostoslavsky R (2009). Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* **30**, 587-91.
18. Fishbeck KL & Rasmussen KM (1987). Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr* **117(11)**, 1967-75.
19. Gluckman PD (2007). Evolving a definition of disease. *Arch Dis Child* **92(12)**, 1053-4.
20. Guarente L & Picard F (2005). Calorie restriction--the SIR2 connection. *Cell* **25**, 473-82.
21. Guarente L (2006). Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome. *Nature* **14**, 868-74.
22. Israel D & Chua S Jr (2010). Leptin receptor modulation of adiposity and fertility. *Trends Endocrinol Metab* **21(1)**, 10-6.
23. Konstantinides S, Schäfer K, Neels JG, Dellas C & Loskutoff DJ (2004). Inhibition of Endogenous Leptin Protects Mice From Arterial and Venous Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24(11)**, 2196-2220.
24. Liang F, Kume S & Koya D (2009). SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol* **5**, 367-73.
25. Lins MC, de Moura EG, Lisboa PC, Bonomo IT & Passos MC (2005). Effects of maternal leptin treatment during lactation on the body weight and leptin resistance of adult offspring. *Regul Pept* **127**, 197-202.

26. 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**, 295-9.
27. Marques RG, Morales MM & Petroianu A (2009). Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras* **24**, 69-74.
28. McMillen IC, Edwards LJ, Duffield J & Muhlhausler BS (2006). Regulation of leptin synthesis and secretion before birth: implications for the early programming of adult obesity. *Reproduction* **131**, 415-27.
29. Moura EG & Passos MCF (2005). Neonatal Programming of Body Weight Regulation and Energetic Metabolism. *Biosci Rep* **25**, 251-269.
30. Moura EG, Lisboa PC & Passos MCF (2008). Neonatal Programming of Neuroimmunomodulation – Role of Adipocytokines and Neuropeptides. *Neuroimmunomodulation* **15**, 176-188.
31. Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Meneur C, Permutt MA & Imai S (2005). Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab.* **2(2)**, 105-117.
32. Passos MC, Toste FP, Dutra SC, Trotta PA, Toste FP, Lisboa PC & Moura EG (2009). Role of neonatal hyperleptinaemia on serum adiponectin and suppressor of cytokine signalling-3 expression in young rats. *Br. J. Nutr* **101**, 250-6.
33. Passos MC, Vicente LL, Lisboa PC & de Moura EG (2004). Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res* **36**, 625-9.

34. Pereira-Toste F, Toste FP, Oliveira E, Trotta PA, Lisboa PC, Moura EG & Passos MC (2009). Early maternal hyperleptinemia programs adipogenic phenotype in rats. *Horm Metab Res* **41**, 874-9.
35. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M & Tschop (2008) Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *PNAS* **105**, 9793-9798
36. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM & Horvath TL (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* **304**, 110-5.
37. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X & Li X (2009). Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* **9**, 327-38.
38. Rajapurohitam V, Javadov S, Purdham DM, Kirshenbaum LA & Karmazyn M (2006). An autocrine role for leptin in mediating the cardiomyocyte hypertrophic effects of angiotensin II and endothelin-1. *J Mol Cell Cardiol* **41**, 265-74.
39. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM & Puigserver P (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* **434**, 113-8.
40. Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Dutra SC & Lisboa PC (2009). Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol* **587**, 2647-61.
41. Solomon G, Niv-Spector L, Gussakovsky EE & Gertler A (2006). Large-scale preparation of biologically active mouse and rat leptins and their

- L39A/D40A/F41A muteins which act as potent antagonists. *Protein Expr Purif* **47**, 128-36.
42. Stocker CJ, Wargent E, O'Dowd J, Cornick C, Speakman JR, Arch JR & Cawthorne MA (2007). Prevention of diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats following administration of leptin to their mothers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, 1810-8.
43. Teixeira CV, Passos MCF, Ramos CF, Dutra SCP & Moura EG (2002). Leptin serum concentration in rats whose mothers were submitted to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem* **13**, 493-498.
44. Toste FP, de Moura EG, Lisboa PC, Fagundes AT, de Oliveira E & Passos MC (2006). Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr* **95**, 830–837.
45. Trevenzoli IH, Valle MMR, Machado FB, Garcia RMG, Passos MCF, Lisboa PC & Moura EG (2007). Neonatal hyperleptinemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *J Physiol.* **580**, 629-637.
46. Troina AA, Figueiredo MS, Moura EG, Boaventura GT, Soares LL, Cardozo LF, Oliveira E, Lisboa PC, Passos MA & Passos MC (2009). Maternal flaxseed diet during lactation alters milk composition and programs the offspring body composition, lipid profile and sexual function. *Food Chem Toxicol* **48**, 697-703.
47. Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH & Harris M (2008). The Effect of Neonatal Leptin Treatment on

- Postnatal Weight Gain in Male Rats Is Dependent on Maternal Nutritional Status during Pregnancy. *Endocrinology* **149**, 1906-1913.
48. Yura S, Itoh H, Sagawa N, Yamamoto H, Masuzaki H, Nakao K, Kawamura M, Takemura M, Kakui K, Ogawa Y & Fujii S (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* **6**, 371-8.
49. Zhang J, Matheny MK, Tümer N, Mitchell MK & Scarpace PJ (2007). Leptin antagonist reveals that the normalization of caloric intake and the thermic effect of food after high-fat feeding are leptin dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, 868-74.