



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Unidade de Pesquisa Urogenital

Fernanda da Silveira Cavalcante

**DIFERENTES TIPOS DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR MATERNA
DURANTE A LACTAÇÃO PROGRAMAM A FOLICULOGÊNESE E A
EXPRESSÃO OVARIANA DA LEPTINA E DAS DIFERENTES
ISOFORMAS DO SEU RECEPTOR.**

Rio de Janeiro

2009

Fernanda da Silveira Cavalcante

**DIFERENTES TIPOS DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR MATERNA DURANTE A
LACTAÇÃO PROGRAMAM A FOLICULOGÊNESE E A EXPRESSÃO OVARIANA
DA LEPTINA E DAS DIFERENTES ISOFORMAS DO SEU RECEPTOR.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, para obtenção do Grau de Mestre.
Área de concentração: Urogenital.

Orientadora Prof^a. Dr^a. Cristiane da Fonte Ramos

Rio de Janeiro

2009

Ficha catalográfica feita pela biblioteca no verso da folha de rosto

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

Assinatura

Data

Fernanda da Silveira Cavalcante

**DIFERENTES TIPOS DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR MATERNA DURANTE A
LACTAÇÃO PROGRAMAM A FOLICULOGÊNESE E A EXPRESSÃO OVARIANA
DA LEPTINA E DAS DIFERENTES ISOFORMAS DO SEU RECEPTOR.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Urogenital.

Aprovado em _____

Banca Examinadora: _____

Prof.^a. Dr.^a. Cristiane da Fonte Ramos
Instituto de Biologia da UERJ

Prof. Dr. Luciano Alves Favorito
Instituto de Biologia da UERJ

Prof. Dr. Marco Aurélio Pereira Sampaio
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Carlos Augusto Pais Cabral
Faculdade de Medicina de Petrópolis

Rio de Janeiro
2009

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa Urogenital do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Cristiane da Fonte Ramos, com apoio financeiro concedido pelo CNPq, CAPES e FAPERJ.

DEDICATÓRIA

*A minha família
pelo incentivo e amor constantes.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me ampara e dá forças, por menos que eu possa merecer.

À minha orientadora, Professora Cristiane Ramos, não apenas pela orientação, mas também pela paciência durante o desenvolvimento deste trabalho e em toda nossa jornada acadêmica.

À Rafaela Veiga pela parceria e amizade de sempre.

Aos amigos da Unidade de Pesquisa Urogenital, que com boa vontade contribuíram esclarecendo dúvidas, oferecendo auxílio e compartilhando ânimo a cada dia. E que souberam, com descontração, tornar o trabalho mais agradável e mais leve nos momentos difíceis.

À Flávia Meireles Gombar, em especial, e a todos que, ainda de uma forma mínima, ajudaram na realização deste trabalho.

Ao amigo Jorge Alves, por sua ajuda quando o cansaço falava mais alto.

À Carla Gallo, pela boa vontade de sempre, ao longo desses dois anos.

A todos os professores desta Unidade que, com sua conduta pessoal e acadêmica, serão sempre uma referência para mim.

RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar se diferentes tipos de restrição alimentar materna durante a lactação programam a foliculogênese e a expressão do RNAm para o gene da leptina e das diferentes isoformas do seu receptor no ovário da prole. Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas, com ninhada ajustada em 6 filhotes por mãe separadas, no dia do nascimento da ninhada, nos grupos controle (C) - com livre acesso à água e à dieta normal (ração comercial com 23% de proteína), restrição protéico-calórica (RPC) - com livre acesso à água e à dieta hipoprotéica (8% de proteína), restrição calórica (RC) - com livre acesso à água, recebendo ração comercial com 23% de proteína restrito as quantidades ingeridas pelo grupo RPC no dia anterior. Após o desmame, todos os animais tiveram livre acesso a ração comercial com 23% de proteína até o dia 90 quando foram mortos com tiopental, na fase proestro do ciclo estral. Quando comparado ao grupo C, ambos os grupos RPC e RC apresentaram redução significativa do peso corporal e crescimento linear a partir dos primeiros dias de vida até 60 dias de idade ($p < 0,0001$). O consumo alimentar apresentou alteração semelhante com uma redução adicional após o dia 80. Foi observada uma redução significativa no número de folículos primordiais (C= $6,6 \pm 0,2$; RPC= $5,2 \pm 0,2$, RC= $5,4 \pm 0,4$, $p < 0,01$), primários (C= $5,8 \pm 0,7$; RPC= $4,0 \pm 0,3$, RC= $2,2 \pm 0,5$, $p < 0,001$) e de Graaf (C= $2,2 \pm 0,3$; RPC= $1,2 \pm 0,3$, RC= $0,6 \pm 0,2$, $p < 0,006$) e na expressão do RNAm da leptina (C= $0,5 \pm 0,03$; RPC= $0,4 \pm 0,03$; RC= $0,2 \pm 0,02$, $p < 0,0001$), OBRa (C= $0,8 \pm 0,05$, RPC= $0,6 \pm 0,03$; RC= $0,4 \pm 0,02$, $p < 0,0001$) e OBRb (C= $0,3 \pm 0,007$, RPC= $0,26 \pm 0,1$, RC= $0,13 \pm 0,1$, $p < 0,0007$) nos animais dos grupos RPC e RC. Observamos ainda um aumento significativo na expressão do RNAm das isoformas OBRc (C= $0,7 \pm 0,1$; RPC= $0,9 \pm 0,04$; RC= $1,0 \pm 0,03$, $p < 0,04$) e OBRf (C= $0,5 \pm 0,06$; RPC= $0,6 \pm 0,06$; RC= $0,7 \pm 0,05$, $p < 0,02$) apenas no grupo RC. A restrição alimentar materna durante a lactação não alterou a quantidade de tecido adiposo abdominal expresso em grama (C= $2,8 \pm 0,1$, RPC= $2,8 \pm 0,08$, RC= $2,8 \pm 0,09$), ou em relação ao peso corporal (C= $13,7 \pm 1,1$, RPC= $14,1 \pm 0,6$, RC= $11,6 \pm 0,4$), nem a concentração sérica de estradiol (C= $13,7 \pm 1,1$, RPC= $14,1 \pm 0,6$, RC= $11,6 \pm 0,4$, pg/mL), leptina (C= $1,9 \pm 0,18$, RPC= $2,2 \pm 0,15$; RC= $2,5 \pm 0,2$, ng/mL), leptina em relação ao peso corporal (C= $9,8 \pm 0,9$; RPC= $9,7 \pm 0,53$; RC= $10,8 \pm 0,9$, ng/mL/peso corporal) ou a expressão do RNAm da isoforma OBRe (C= $0,6 \pm 0,05$; RPC= $0,7 \pm 0,06$; RC= $0,7 \pm 0,07$). Esses resultados sugerem que ambos os tipos de restrição alimentar materna durante a lactação programam a função ovariana da prole, levando a uma redução na foliculogênese, provavelmente em consequência da baixa expressão dos genes da leptina e das isoformas OBRa e OBRb de seus receptores.

ABSTRACT

This study aims to determine the effects of maternal protein and energy malnutrition during lactation on the folliculogenesis and on the gene ovarian expression of leptin and its receptors in the adult female offspring. At parturition, nine dams were randomly assigned to the following groups: (C) control group, with free access to a standard laboratory diet containing 23% protein; (PER) protein-restricted group, with free access to an isoenergy and protein-restricted diet containing 8% protein; and (ER) energy-restricted group, receiving standard laboratory diet in restricted quantities. After weaning, the female pups had free access to standard laboratory diet until day 90 when all animals at the proestrus stage were killed with thiopental. Body weight and linear growth of PER and ER groups were significantly lower ($p < 0.0001$) compared to C from the first days of life until day 60. Food consumption presented a similar pattern, with an additional reduction after day 80. Compared to C, both PER and ER groups presented a significant reduction in the primordial ($C = 6.6 \pm 0.2$; $PER = 5.2 \pm 0.2$, $ER = 5.4 \pm 0.4$, $p = 0.01$), primary ($C = 5.8 \pm 0.7$; $PER = 4.0 \pm 0.3$, $ER = 2.2 \pm 0.5$, $p = 0.001$) and Graaf follicles number ($C = 2.2 \pm 0.3$; $PER = 1.2 \pm 0.3$, $ER = 0.6 \pm 0.2$, $p = 0.006$), in the expression of leptin ($C = 0.5 \pm 0.03$; $PER = 0.4 \pm 0.03$; $ER = 0.2 \pm 0.02$, $p < 0.0001$), OBRb ($C = 0.3 \pm 0.007$, $RPC = 0.26 \pm 0.1$, $RC = 0.13 \pm 0.1$, $p < 0.0007$) and OBRa genes ($C = 0.8 \pm 0.05$, $PER = 0.6 \pm 0.03$; $ER = 0.4 \pm 0.02$, $p < 0.0001$). There was a significant increase only in group RC compared to group C of the expression of isoforms OBRc ($C = 0.7 \pm 0.1$; $RPC = 0.9 \pm 0.04$; $RC = 1.0 \pm 0.03$, $p < 0.04$) and presenting the group OBRf ($C = 0.5 \pm 0.06$; $RPC = 0.6 \pm 0.06$; $RC = 0.7 \pm 0.05$, $p < 0.02$), but in the PER group noticed only a slight increase. Already the OBRe isoform, soluble, no significant difference between groups ($C = 0.6 \pm 0.05$; $RPC = 0.7 \pm 0.06$; $RC = 0.7 \pm 0.07$), but was not observed changes in the quantity of abdominal adipose tissue when expressed in gram ($C = 2.8 \pm 0.1$, $RPC = 2.8 \pm 0.08$, $RC = 2.8 \pm 0.09$), or in relation to body weight ($C = 13.7 \pm 1.1$, $RPC = 14.1 \pm 0.6$, $RC = 11.6 \pm 0.4$). Also not alters the serum concentration of estradiol ($C = 13.7 \pm 1.1$, $RPC = 14.1 \pm 0.6$, $RC = 11.6 \pm 0.4$, pg/mL), leptin ($C = 1.9 \pm 0.18$, $RPC = 2.2 \pm 0.15$; $RC = 2.5 \pm 0.2$, ng/mL), leptin in relation to body weight ($C = 9.8 \pm 0.9$; $RPC = 9.7 \pm 0.53$; $RC = 10.8 \pm 0.9$, ng/mL/peso corporal). We can surmise that both protein-energy and energy restricted diets during lactation program the ovarian function of the offspring, leading to a reduction of folliculogenesis, probably in consequence of the altered expression of leptin and its isoforms receptors genes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ação central da leptina no balanço energético.....	13
FIGURA 2 – Isoformas do receptor de leptina.....	16
FIGURA 3 - Sinalização intracelular do receptor de leptina.....	17
FIGURA 4 - Peso corporal e crescimento linear.....	27
FIGURA 5 – Quantidade de gordura abdominal.....	28
FIGURA 6 – Consumo alimentar.....	29
FIGURA 7 - Número de folículos ovarianos.....	30
FIGURA 8 – Cortes ovarianos.....	31
FIGURA 9 – Concentração sérica de hormônios.....	32
FIGURA 10 – Expressão ovariana do RNAm.....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Composição das dietas normal e hipoprotéica.....	23
TABELA 2 - Composição da mistura de vitaminas.....	23
TABELA 3 - Composição da mistura de minerais.....	24
TABELA 4 - Sequências de oligonucleotídeos.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

- AgRP (proteína relacionada a agouti)
- ATP (adenosina trifosfato)
- C (grupo de animais controle)
- CART (peptídeo derivado de cocína)
- cDNA (ácido desoxiribonucléico complementar)
- ERK (sinal extracelular quinase-regulado)
- FSH (hormônio folículo estimulante)
- GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)
- Grb 2 (fator de crescimento de receptor ativado)
- IMC (índice de massa corporal)
- IRS (substrato do receptor de insulina)
- JAK (proteína Janus-kinase)
- LH (hormônio luteinizante)
- MSH- α (peptídeo de melanocortina α)
- NPY (neuropeptídeo Y)
- OBRa (isoforma a do receptor de leptina)
- OBRb (isoforma b do receptor de leptina)
- OBRc (isoforma c do receptor de leptina)
- OBRe (isoforma e do receptor de leptina)
- OBRf (isoforma f do receptor de leptina)
- PCR (reação em cadeia de polymerase)
- POMC (pro-opiomelanocortina)
- PI3K (fosfoinosítídeo 3-quinase)
- RC (animais do grupo restrição calórica)
- RNA (ácido ribonucléico)
- RNAm (ácido ribonucléico mensageiro)
- RPC (animais do grupo restrição proteico-calórica)
- RT-PCR (reação em cadeia de polymerase por transcriptase reversa)
- SHP-2 (domínio contendo proteína tirosina fosfatada)
- SOCS 3 (supressor de sinalização da citocina)
- STAT (proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
1.1 Leptina e regulação alimentar.....	12
1.2 Leptina e isoformas dos receptores.....	14
1.3 Leptina e sistema reprodutor feminino.....	17
1.4 Leptina e puberdade.....	18
1.5 Leptina e ovário.....	18
1.6 Foliculogênese.....	19
1.7 Restrição alimentar e programação metabólica.....	20
OBJETIVO	21
MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1 Início da puberdade e análise do ciclo estral.....	25
2.2 Determinação das concentrações séricas hormonais.....	25
2.3 Extração do RNA.....	25
2.4 RT-PCR semiquantitativo.....	25
2.5 Análise estatística.....	26
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	48
3.1 Anexo A – Protocolo de aprovação da Comissão de Ética para cuidado e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.....	48
3.2 Anexo B – Carta de submissão do artigo para revista <i>Endocrinology</i>	49
3.3 Anexo C – Artigo submetido para revista <i>Endocrinology</i> . (Índice de impacto em 2007= 5.0).....	50

INTRODUÇÃO

Leptina e regulação alimentar

A leptina é um hormônio de natureza protéica, codificado pelo gene da obesidade e sintetizado principalmente no tecido adiposo [1-3]. É composto por 167 aminoácidos e tem peso molecular de 14-16 KDa. Como ação principal controla o gasto energético e o consumo alimentar, através de uma cascata de eventos regulatórios disparados pela interação da leptina com seus receptores no hipotálamo. A ligação da leptina ao seu receptor nos neurônios orexígenos inibe a atividade dessas células e reduz a liberação de NPY (neuropeptídeo Y) e AgRP (proteína relacionada agouti). Por outro lado, a leptina estimula a atividade dos neurônios anorexígenos, aumentando a liberação de MSH- α (peptídeo de melanocortina α) e CART (peptídeo derivado da cocaína). Dessa forma, situações que aumentam a concentração plasmática de leptina levam à inibição dos neurônios NPY/AgRP e à estimulação dos neurônios α -MSH/CART, causando diminuição da ingestão alimentar. Já situações em que ocorre diminuição na concentração de leptina, os neurônios anorexígenos não estão suficientemente estimulados e os neurônios orexígenos deixam de ser inibidos, levando ao aumento da ingestão alimentar [4]. A figura 1 esquematiza esses mecanismos.

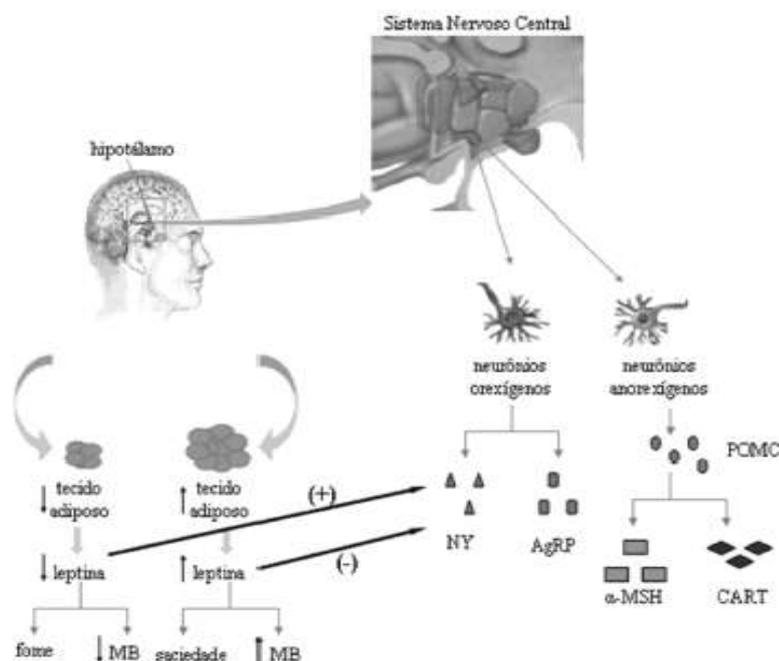


Figura 1. Ação central da leptina no balanço energético. MB (metabolismo basal); NY (neuropeptídeo Y); AgRP (proteína relacionada a agouti); POMC (pro-opiomelanocortina); MSH- α (peptídeos de melanocortina); CART (peptídeo derivado da cocaína). Retirado de Duclos M.,2001.

A leptina também estimula o sistema nervoso simpático, aumentando a pressão sanguínea, a pulsação e a termogênese (produção de calor pelo gasto de energia metabólica) acoplada à cadeia de transporte de elétrons e produção de ATP pelas mitocôndrias dos adipócitos [5].

Em um indivíduo com peso corporal normal, a leptina está mais correlacionada com a massa de gordura absoluta do que com o índice de massa corpórea (IMC) ou porcentagem de gordura corporal. Os níveis de leptina circulantes parecem estar diretamente relacionados com a quantidade de RNAm para leptina no tecido adiposo. Além disso, vários fatores metabólicos e endócrinos contribuem para regular a transcrição dos genes da leptina em adipócitos [6-8]. As evidências indicam que a insulina tem papel importante na regulação da expressão da leptina *in vivo* e *in vitro*. A insulina aumenta a expressão do RNAm da leptina, enquanto a leptina reduz a secreção de insulina no pâncreas e a sua habilidade de regular a utilização da glicose (resistência à insulina). Isso estabelece um mecanismo de feedback negativo entre insulina e leptina, existindo ainda relação semelhante entre leptina e cortisol [9].

Leptina e isoformas dos receptores

Os receptores de leptina são membros da família dos receptores de citocinas, cujo gene é transcrito e clivado em 6 diferentes isoformas: OBRb (receptor longo), OBRa, c, d, f (receptores curtos), e o OBRe (receptor solúvel). As isoformas curtas têm em comum o domínio extracelular constituído por mais de 800 aminoácidos, o domínio transmembrana de 34 aminoácidos e o domínio intracelular de 30-40 resíduos de aminoácidos, característico para cada uma das isoformas curtas. A isoforma longa (OBRb) diverge das demais por possuir domínio intracelular longo composto por aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, o que promove a interação com outras proteínas no citoplasma, ativando as vias de sinalização [10-13].

A isoforma longa é expressa principalmente no hipotálamo [14], e responde às ações centrais da leptina, sendo também representada em muitos outros tipos celulares, tais como adipócitos, osteoblastos, queratinócitos localizados em margem de lesão, células dos pulmões, rins, estômago, fígado, ácinos pancreáticas, células sanguíneas mononucleares, endoteliais, musculares, endometriais, da placenta, cordão umbilical, ovário e útero [15-22]. O papel biológico da isoforma OBRb está relacionado a sua capacidade de ativar as vias de sinalização intracelular para a leptina, sendo considerada então como a isoforma biologicamente funcional nos diferentes tecidos [6, 10, 11, 13].

As isoformas OBRa e OBRc são amplamente expressas no plexo coróide e em microvasos onde parecem ter um papel na captação ou no efluxo da leptina do líquido cefalorraquidiano, assim como no transporte mediado pelos receptores de leptina através da barreira hemato-encefálica [23, 24].

As isoformas OBRd e OBRf não demonstram expressão bem determinada nos tecidos corporais, parecendo estar homogeneamente distribuídos, embora sua representatividade seja baixa e sua função ainda não foi descrita [25-27].

OBRe, que não tem domínio intracelular, está codificado como receptor solúvel [26], circula no sangue e possui alta afinidade de ligação com a leptina [28, 29]. Assim, esta isoforma desempenha um papel na regulação dos níveis plasmáticos de leptina livre, a forma biologicamente ativa [30].

Inicialmente, ações diretas da leptina estavam relacionadas apenas ao sistema nervoso central. No entanto, a ampla distribuição das diferentes isoformas reflete a multiplicidade de efeitos biológicos em tecidos extra neurais, fornecendo evidências para a extrema funcionalidade da leptina [31].

O receptor da leptina é formado por único segmento transmembrana, o qual dimeriza-se quando a leptina se liga em seu domínio extracelular. Ambos os monômeros do receptor dimérico são fosforilados no resíduo tirosina do domínio intracelular por uma enzima JAK (Janus-Kinase) [31].

A região extracelular do receptor OBR é composta por quatro domínios de fibronectina tipo III e dois domínios de receptor para citocina [12]. No meio intracelular, toda a extensão dos receptores (exceto o OBRe) contém uma sequência de elementos (boxes) que são necessários para subsequentes eventos de sinalização e diferem entre as isoformas caracterizando diferentes funções [32].

O domínio intracelular de todas as isoformas OB-R contém a região box1 para ligação de proteínas JAK. Contudo, a isoforma OBRb inclui também o domínio box2, para ligação de fatores de transcrição STAT (proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição). A figura 2 demonstra diferenças nas isoformas do receptor de leptina, quanto ao domínio intracelular.

Ambos box1 e box2, são associados à interação e ativação de JAKs [33, 34]. No entanto, é conhecido que somente a região box1 e a sequência específica de aminoácidos 31-36, são indispensáveis para a ativação de JAKs [35, 36], e que aminoácidos 37-48 da região de domínio box2 estando presentes, podem aumentar o sinal de interação para estas, mas podem também ser substituídos por outros elementos [36]. Embora a região box2 não seja crucial para ativar JAKs [35, 36], as STATs são incapazes de promover sinalização sem interação com este [34-36].

Após a fosforilação pela JAK, as STATs se movem para o núcleo, onde eles se ligam a uma sequência específica do DNA e estimulam a expressão de genes específicos (figura 3). A síntese dos produtos das expressões gênicas, NPY e precursor do POMC (o qual produz α -MSH) são regulados pela leptina através desse mecanismo. A expressão do gene POMC é também regulada por hormônios glucocorticóides [37].

Além da via JAK-STAT, atualmente sabe-se que a leptina é capaz de ativar a sinalização celular por outros mecanismos, sendo que a ativação da proteína fosfatidilinositol-3-kinase merece destaque por ser um ponto de convergência (*cross-*

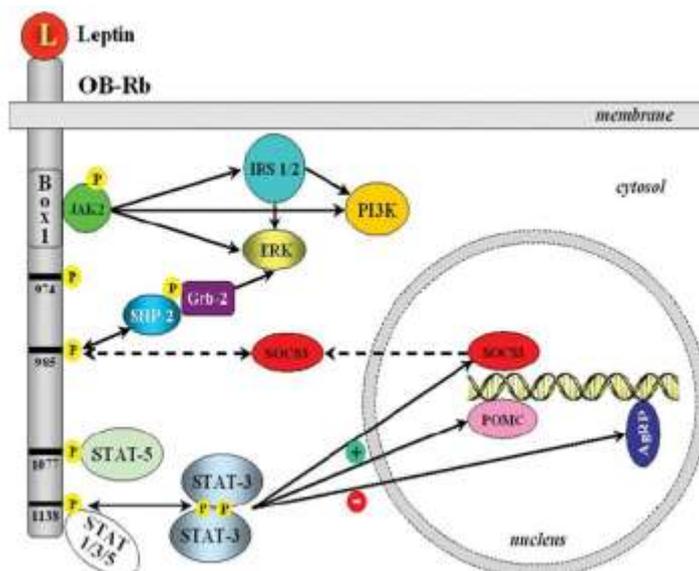


Figura 3: Sinalização intracelular da leptina em receptor OBRb. JAK (proteína Janus-Kinase); IRS (substrato do receptor de insulina); ERK (sinal extracelular-kinase regulada); PI3K (fosfoinosítido 3-kinase); SHP-2 (domínio contendo proteína tirosina fosfatada); Grb-2 (fator de crescimento de receptor ativado); SOCS3 (supressor de sinalização da citocina); STAT (proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição); POMC (pro-opiomelanocortina); AgRP (proteína relacionada a agouti). Retirado de Frühbeck, 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin.

Leptina e sistema reprodutor feminino

Diferentes autores demonstraram a ação da leptina em vários locais do sistema reprodutor. Em ratos, as isoformas OBRa e OBRb são amplamente expressas nos folículos ovarianos [41, 42] e no útero [43-45], epitélio da parede vaginal e do oviduto [46], além de outros tecidos do sistema urogenital, tais como, rins e bexiga [47].

Especificamente no ovário, os receptores de leptina são expressos nas células da granulosa e da teca [42, 48, 49], células do cumulus [50], ovócitos [43, 50, 51], e embriões [52]. Além disto, o ovário parece ser um sítio de síntese da leptina já que tanto a proteína quanto o RNAm para leptina foram identificados no ovário [43, 49, 50, 53] e ovócitos [43, 50, 53].

Leptina e puberdade

A leptina parece ter um papel integrador entre o estado nutricional e os eixos hormonais, sendo um indicador dos estoques de energia para um funcionamento normal do sistema reprodutivo [54-56]. Assim, a manutenção de uma concentração mínima de leptina é necessária para uma secreção adequada dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH) [57, 58].

A leptina pode ainda ser um sinal que alerta ao cérebro que as reservas lipídicas já possibilitam o início da puberdade, da manutenção do ciclo menstrual e da habilidade de reprodução. Na fase pré-púbere ocorre uma elevação nas concentrações de leptina em meninos, marcando uma fase inicial da puberdade. Contudo, diminuem à medida que se elevam as concentrações de testosterona, enquanto em meninas as concentrações se elevam proporcionalmente ao aumento do estradiol [59]. Em meninas, a leptina se relaciona inversamente com a idade da menarca [60].

A ação da leptina no desencadeamento do início da puberdade foi observada também em camundongos fêmeas pré-púberes que receberam injeções de leptina. Foi visto que, apesar de os animais tratados com leptina apresentarem um menor peso corporal, eles entram na puberdade nove dias antes dos animais controle e seu sistema reprodutor amadurece mais rapidamente [61].

Leptina e ovário

A ação da leptina sobre os ovários não está completamente desvendada. Zerani e colaboradores em 2004, observaram uma função luteolítica da leptina [62]. Porém sabe-se que deve existir uma concentração ótima desse hormônio para a sua atividade normal. Abaixo dessas possíveis concentrações, a multiplicação celular e o amadurecimento dos oócitos não ocorreriam, e por outro lado a concentração muito elevada de leptina seria responsável por alterações nos ovários como, por exemplo, a síndrome dos ovários policísticos, que converge com obesidade e anovulação crônica [56, 57, 63-68].

Está descrito que ratos deficientes em leptina ou em seu receptor são obesos e tem a função reprodutiva comprometida [69], e já foi demonstrado que a indução de leptina nestes animais restaura a fertilidade [67, 70].

Tem sido descrito o comprometimento da esteroidogênese ovariana por ação da leptina que promove efeitos estimulatórios e inibitórios na secreção de progesterona, andrógenos e estradiol em cultura de células ovarianas de rato, boi, porco e homens [71-74] embora tais alterações não tenham sido substancialmente encontradas [48, 70, 73, 75, 76]. Além da esteroidogênese, a ação inibitória da leptina na secreção de prostaglandina E2 em células ovarianas de rato foi relatada [75].

In vitro, leptina é capaz de inibir o crescimento de folículos ovarianos em camundongos [77] enquanto *in vivo*, leptina suprime a apoptose de células ovarianas e o início da puberdade em ratos [72]. Além disso, a deficiência de leptina em camundongos está associada com a supressão da foliculogênese ovariana e aumento da apoptose de células da granulosa [78].

Em ratas, a leptina sérica é detectada apenas no período de proestro e a expressão do RNAm para o receptor de leptina varia durante o ciclo estral [75]. Ryan e colaboradores em 2003 forneceram evidência de que a leptina produzida no ovário pode regular seu próprio receptor [79].

Foliculogênese

O desenvolvimento folicular começa durante a vida fetal com a transformação das células germinativas primordiais dentro de ovócitos e seu local em estruturas chamadas folículos. Na maioria dos mamíferos, os folículos primordiais são formados, antes do nascimento, ou nos primeiros dias após. Folículos primordiais dão origem a folículos primários que se transformam então em folículos antrais e finalmente em folículos pré-ovulatórios, folículos de Graaf, numa série coordenada de transições reguladas por hormônios, como o hormônio folículo estimulante (FSH) e fatores intraovarianos locais, como leptina e outros [80]. Com o pico do hormônio luteinizante (LH) ocorre a ruptura dos folículos de Graaf e os ovócitos são liberados deixando as células foliculares que se transformam em corpo lúteo [81].

Restrição alimentar e programação metabólica

Condições metabólicas adversas como a má nutrição, obesidade, anorexia nervosa ou exercícios intensos, são associados com a redução ou extinção das funções reprodutivas [82, 83]. Alterações na nutrição materna afetam o crescimento fetal total e desenvolvimento [84], atrasa o início da puberdade [85-87] e conduz a uma atrofia das glândulas endometriais [88] em roedores, interfere no ciclo estral normal [89]; e altera a função endócrina [90] da prole em muitas espécies.

Em organismos de crescimento rápido, a má nutrição no início da vida é um desafio em que o sistema tenta se ajustar para sobrevivência. A quantidade ou qualidade da nutrição nesse período crítico promove consequências permanentes por toda vida. Um dos mecanismos de adaptação para o fornecimento inadequado de nutrientes é reduzir o ritmo de divisão celular nos órgãos e tecidos, o que pode levar a uma alteração “programada” da estrutura e função do sistema [91-93]. A má nutrição induzida no início da vida está associada com o aumento do risco em desenvolver diabetes tipo 2, hipertensão e doenças cardiovasculares a longo prazo [94-98].

OBJETIVO

O objetivo deste estudo é avaliar se diferentes tipos de restrição alimentar materna durante a lactação programam a foliculogênese e a expressão do RNAm para o gene da leptina e das diferentes isoformas do seu receptor no ovário da prole.

MATERIAL E MÉTODOS

Ratas Wistar fêmeas, nulíparas, foram mantidas em biotério com temperatura ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro (7:00-19:00) controlados. Foram utilizados os princípios descritos em “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” para os cuidados no uso e manuseio com os animais [99]. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Anexo – A).

Aos 3 meses de idade 9 animais foram acasalados na proporção de 2 fêmeas para 1 macho, recebendo ração comercial (23% de proteína) até o nascimento dos filhotes, quando então foram divididas em 3 grupos de tratamento:

Controle (C) - com livre acesso à água e à dieta normal (ração comercial com 23% de proteína).

Restrição protéico-calórica (RPC) - com livre acesso à água e à dieta hipoprotéica (8% de proteína).

Restrição calórica (RC) - com livre acesso à água, ingerindo ração comercial (23% de proteína) restrito apenas à quantidade, com base no que o grupo RPC ingeriu no dia anterior.

A dieta hipoprotéica foi preparada manualmente em nosso laboratório e sua composição é mostrada na tabela 1. A fonte protéica (8%) desta dieta foi a ração comercial macerada (Labina - Purina Nutrimentos LTDA) e as calorias foram compensadas pelo acréscimo de amido de milho a fim de se obter uma dieta hipoprotéica e isocalórica. As vitaminas e os minerais foram suplementados de maneira a se obter a mesma composição da ração comercial, mostrada nas tabelas 2 e 3, que é baseada nas recomendações do National Research Council e National Institute of Health-USA [100].

A dieta hipoprotéica foi administrada no dia do nascimento dos filhotes e a ninhada ajustada em 6 filhotes. Este número de filhotes foi escolhido, pois, segundo Fishbeck e Rasmussen [101] parece ser este o número de animais que confere o maior potencial lactotóxico. Provavelmente, o tamanho da ninhada influencia muito mais na quantidade de leite produzida do que em sua composição [102, 103].

Tabela 1: Composição das dietas normo e hipoprotéica

Nutriente (Kg/dieta)	Dieta Normoprotéica	Dieta Hipoprotéica
Energia Total - kcal	4070.4	4070.4
Proteína %	23.0	8.0
Hidratos de Carbono %	66.0	81.0
Lipídios %	11.0	11.0
Proteína g	230.0	80.0
Hidratos de Carbono g	676.0	826.0
Lipídios g	50.0	50.0
Mistura de Vitaminas g	4.0	4.0
Mistura de Sais Minerais g	40.0	40.0

Composição da dieta de acordo com as recomendações do National Research Council e National Institute of Health-USA [100].

Tabela 2: Composição da mistura de vitaminas

Vitaminas*	
	g /kg de mistura
Ácido Nicotínico	3.000
Ácido Pantotênico	1.600
Piridoxina - B6	0.700
Tiamina - B1	0.600
Riboflavina	0.600
Ácido Fólico	0.200
Biotina	0.020
Cianocobalamina - B12	2.500
Vitamina E (500 UI/g)	15.00
Vitamina A (500,000 UI/g)	0.800
Vitamina D (400,000 UI/g)	0.250
Vitamina K	0.075

*De acordo com as recomendações do National Research Council e National Institute of Health-USA [100].

Tabela 3: Composição da mistura de minerais

Minerais *	g /kg de mistura
Carbonato de cálcio, 40,04% Ca	357.00
Fosfato de Potássio, 22,76% P; 28,73% K	196.00
Citrato de Potássio, 36,16% K	70.78
Cloreto de Sódio, 39,34% Na; 60,66% Cl	74.00
Sulfato de Potássio, 44,87% K; 18,39% S	46.60
Óxido de Magnésio, 60,32% Mg	24.00
Citrato de Ferro, 16,5% Fé	6.06
Carbonato de Zinco, 52,14% Zn	1.65
Carbonato de Manganês, 47,79% Mn	0.63
Carbonato de Cobre, 57,47% Cu	0.30
Iodeto de Potássio, 59,3% I	0.01
Selenato de Sódio, 41,79% Se	0.010
Paramolibidato de Amônio, 54,34% Mo	0.008

*De acordo com as recomendações do National Research Council e National Institute of Health-USA [100].

Ao final da lactação os filhotes receberam ração controle com 23% de proteína, sendo acompanhados até a idade adulta (90 dias). Para avaliação do estado nutricional dos animais a quantidade de ração ingerida, o peso corporal e o comprimento nariz-ânus foram monitorados durante todo o período experimental. Foi realizado um controle diário da quantidade de ração administrada e consumida pelos animais, enquanto o peso corporal e o comprimento foram avaliados em intervalos de quatro dias.

Ao sacrifício (aprox. 90 dias de idade), a fase do ciclo estral foi identificada pelo esfregaço vaginal e somente ratas em fase de proestro foram utilizadas (fase onde é possível a detecção da leptina sérica). No momento do sacrifício, os animais foram anestesiados com thiopental (0,15 ml/100g/peso corporal). O sangue foi coletado por punção cardíaca para detecção da leptina e estradiol séricos. Os ovários foram excisados e congelados a -80°C para posterior análise por RT-PCR.

Início da puberdade e análise do ciclo estral:

A partir do 30º dia após o nascimento, as fêmeas foram inspecionadas diariamente para observar a abertura vaginal. O início da puberdade foi definido como a idade (em dias) em que ocorre a abertura vaginal.

As fases do ciclo estral foram estudadas, após a abertura vaginal, até completarem 90 dias de idade, onde as fêmeas foram observadas diariamente através da citologia vaginal para se estabelecer à regularidade das fases do ciclo estral, as quais são descritas como proestro, estro, diestro I e diestro II [104].

O material para citologia foi coletado introduzindo-se um cotonete umedecido em soro fisiológico no orifício vaginal das ratas. Foram preparadas lâminas com o material coletado, coradas através do método de Shorr e observadas ao microscópio. Foram utilizados para análise dos parâmetros propostos apenas os animais que se encontravam na fase de proestro.

Determinação das concentrações séricas hormonais:

As concentrações séricas de estradiol, testosterona e leptina foram determinadas no soro através de radioimunoensaio específico para cada hormônio (ICN Pharmaceuticals, Inc, CA, USA). O coeficiente de variação intra e inter ensaio foi de 6,4 e 5,9% para estradiol, 4,6 e 7,5% para testosterona e 2,4 e 4,8% para leptina. Sensibilidade do RIA foi 0,04ng/mL para testosterona e 0,8pg/mL para o estradiol [105].

Extração de RNA:

O RNA total do tecido foi extraído utilizando-se o reagente trizol que baseia-se no método guanidium thiocyanate–phenol-chloroform [106]. A qualidade do RNA foi verificada pela razão 260 nm/280 nm e eletroforese em gel de agarose, sendo então as amostras armazenadas a –80°C até utilização.

RT-PCR semiquantitativo:

Um micrograma de RNA total foi transcrito reversamente utilizando-se o kit superscript III (Invitrogen) conforme indicação do fabricante. Posteriormente o cDNA foi amplificado por PCR utilizando-se primers específicos (tabela 4). As reações

foram realizadas num volume final de 50 µl a partir de 2 µl of cDNA com 2 IU Taq polymerase, 10 mM dNTP, 50 mM MgCl₂ and 30 pmoles de primers sense e antisense. GAPDH foi utilizado para corrigir as diferenças na quantidade de RNA total usado para transcrição reversa. Todos os fragmentos de cDNA amplificados foram analisados em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizados com UV. A densitometria foi feita utilizando-se o programa Image J.

Tabela 4: Sequências dos oligonucleotídeos usados para amplificação da RT-PCR e condições cíclicas para os diferentes pares de genes.

Gene	Sequência (5'-3')	Condições do ciclo	Nº de ciclos
GAPDH	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	94°C/3min,94°C/30s 58°C/2min,72°C/2min	30
OBRa	5' CACTGTTAATTTACACCAGAG 3' 5' GTCATTCAAACCATAGTTTAGG 3'	97°C/5min,96°C/1:30min 55°C/1:30min,72°C/3min	35
OBRb	5' TGCTCGGAACACTGTTAAT 3' 5' GAAGAAGAGCAAATATCA 3'	94°C/2min,94°C/1min 55°C/1min,72°C/15min	34
OBRc	5'TGCTCGGAACACTGTTAAT 3' 5'ATAGAGTATCTAACCTGCACCCTT 3'	97°C/5min,96°C/1:30s 55°C/1:30s,72°C/3min	36
OBRe	5'TCCTGGACACTGTCACCTAA 3' 5'ATCAGGATTGCCAAT TTACA 3'	97°C/5min,96°C/1:30s 55°C/1:30s,72°C/3min	39
OBRf	5'GCTGCTCGGAACACTGTTAAT 3' 5'ACGGCATCCACTCTATATCCT 3'	97°C/5min,96°C/1:30s 55°C/1:30s,72°C/3min	30
Leptina	5'GACATTTACACACGACGTC 3' 5'GAGGAGGTCTCGCGAGTT 3'	94°C/2min,94°C/1:30s 55°C/1:30s,72°C/1:30s 72°C/15min	36

Análise estatística:

As diferenças entre os grupos foram determinadas através da análise de variância univariada (ANOVA) associada ao pós-teste de comparação múltipla entre as médias, teste de Newman-Keuls [107]. Os resultados foram dados por média ± erro padrão e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

O peso corporal e crescimento linear estão representados na figura 4. Em relação ao grupo C, o grupo RPC apresentou redução significativa ($p < 0,0001$) do peso corporal a partir do dia 4 após o nascimento, enquanto no grupo RC esta redução ($p < 0,0001$) ocorreu a partir do dia 9. A partir do dia 9, houve também diferença significativa ($p < 0,0001$) no peso corporal entre os grupos RPC e RC. Em relação ao crescimento linear, ambos os grupos RPC e RC apresentaram redução significativa ($p < 0,0004$) em relação ao C a partir do dia 5 após o nascimento, enquanto a diferença ($p < 0,0001$) entre os grupos RPC e RC ocorreu a partir do dia 16.

Após o desmame e com livre acesso a ração com 23% de proteína, ambos os grupos RPC e RC apresentaram redução significativa do peso corporal ($p < 0,0001$) e do comprimento linear ($p < 0,001$) até aproximadamente 60 dias de idade, não havendo diferença significativa após este período.

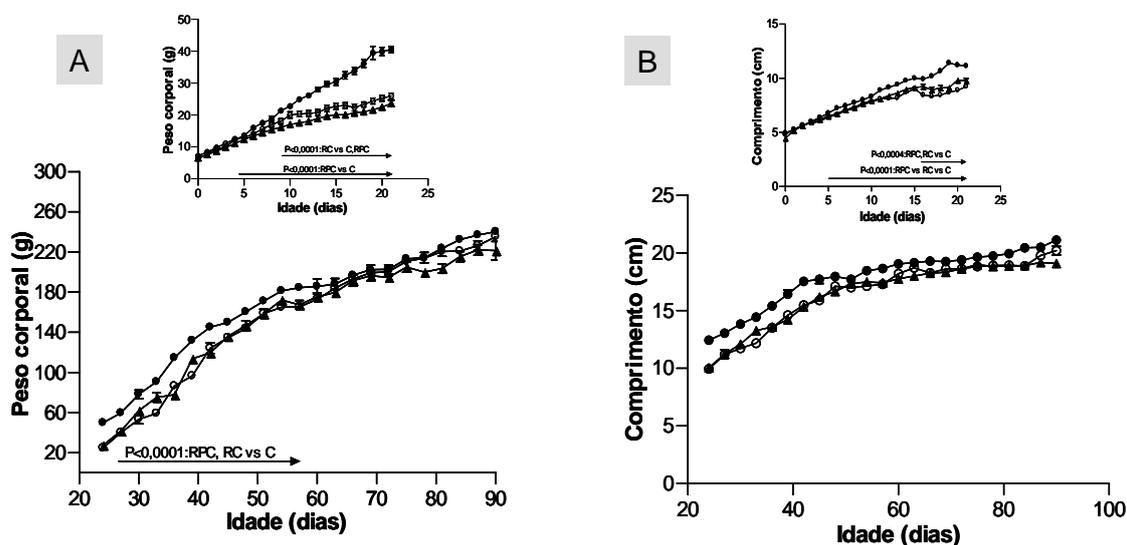


Figura 4: Peso corporal (A) e comprimento linear (B) nos grupos controle (C= ●), restrição protéico-calórica (RPC= ○) e restrição calórica (RC= ▲). Valores dados por média \pm erro padrão de 14 animais.

A figura 5 mostra a quantidade de tecido adiposo nos animais. A restrição alimentar materna durante a lactação não alterou a quantidade de tecido adiposo abdominal da prole na vida adulta quando expressa em grama ($C=2,8\pm0,1$, $RPC=2,8\pm0,08$, $RC=2,8\pm0,09$) ou em relação ao peso corporal ($C=13,7\pm1,1$, $RPC=14,1\pm0,6$, $RC=11,6\pm0,4$).

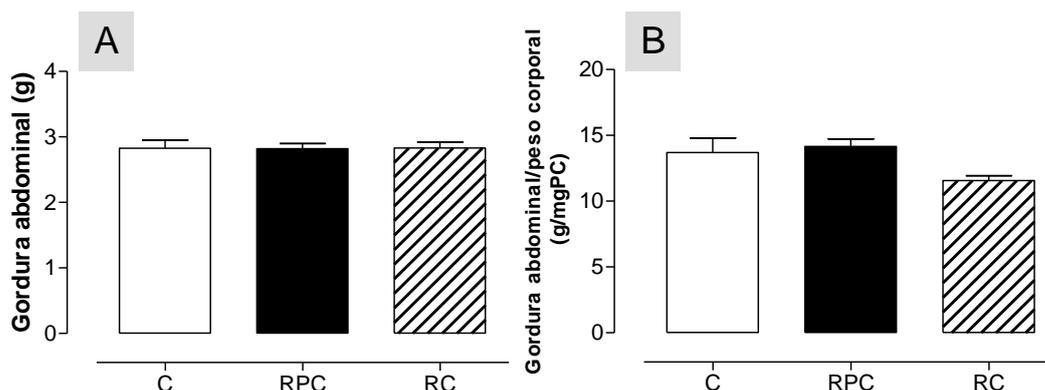


Figura 5: (A) Gordura abdominal (g) e (B) gordura abdominal (g/mgPC) nos grupos controle (C), restrição protéico-calórica (RPC) e restrição calórica (RC). Valores dados por média \pm erro padrão de 14 animais.

Após o desmame, foi avaliado também o consumo alimentar dos animais. O grupo RPC apresentou redução significativa ($p<0,0001$) do consumo alimentar até 65 dias de idade em comparação com os grupos C e RC. Após este período, o consumo alimentar foi normalizado, reduzindo novamente a partir do dia 80 ($p<0,005$). O consumo alimentar do grupo RC foi significativamente menor ($p<0,005$) que os grupos C e RPC apenas após o dia 80 (figura 6).

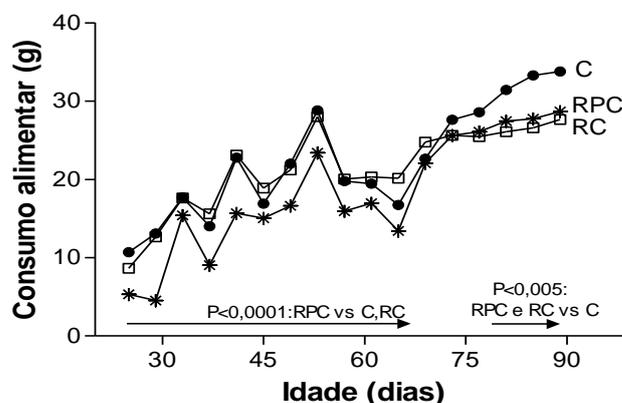


Figura 6: Consumo alimentar nos grupos controle (C), restrição protéico-calórica (RPC) e restrição calórica (RC). Valores dados por média \pm erro padrão de 14 animais.

Ambos os grupos RPC e RC apresentaram uma redução no número de folículos ovarianos, porém essa redução foi significativa somente nos folículos primordiais (C=6,6±0,2; RPC= 5,2±0,2, RC=5,4±0,4, p<0,01), primários (C=5,8±0,7; RPC=4,0±0,3, RC=2,2±0,5, p<0,001) e folículos de Graaf (C=2,2±0,3; RPC= 1,2±0,3, RC=0,6±0,2, p<0,006) (figura 7).

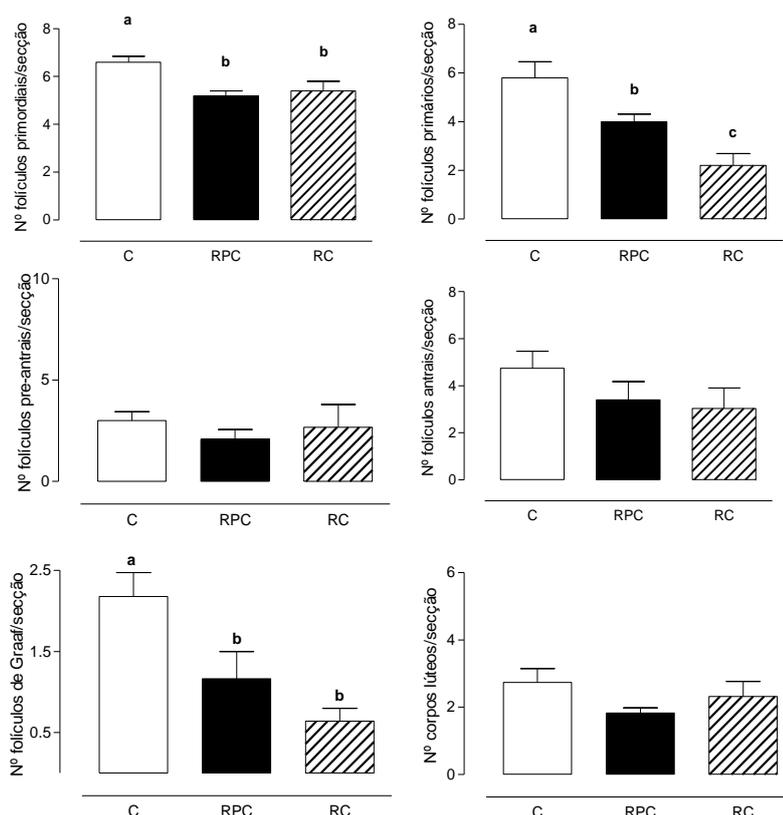


Figura 7: Número de folículos ovarianos nos grupos controle (C), restrição protéica-calórica (RPC) e restrição calórica (RC). Valores dados por média ± erro padrão de 5 animais. Letras diferentes significam diferença estatística.

Cortes ovarianos da prole são mostrados na figura 8. O folículo primordial consiste em um oócito rodeado por uma única camada relativamente indiferenciada de células da granulosa (fig. 8A). Folículos primários consistiam em um oócito rodeado por uma camada única de células cubóides da granulosa (fig. 8A). Folículos preantrais apresentam um oócito central rodeado por camadas de células da granulosa e células da teca, que formam uma teca externa fibrosa e uma teca interna sem antro totalmente formado. Nos folículos antrais, fluido aparece entre as células da granulosa e gotas formam fluido folicular dentro do antro (fig. 8B). Nos folículos de Graaf, o antro folicular é claramente desenvolvido, deixando o ovócito

rodeado por uma densa e distinta camada de células da granulosa, o cumulus oophorus. O corpo lúteo é formado por células luteais e abundantes capilares (fig. 8C).

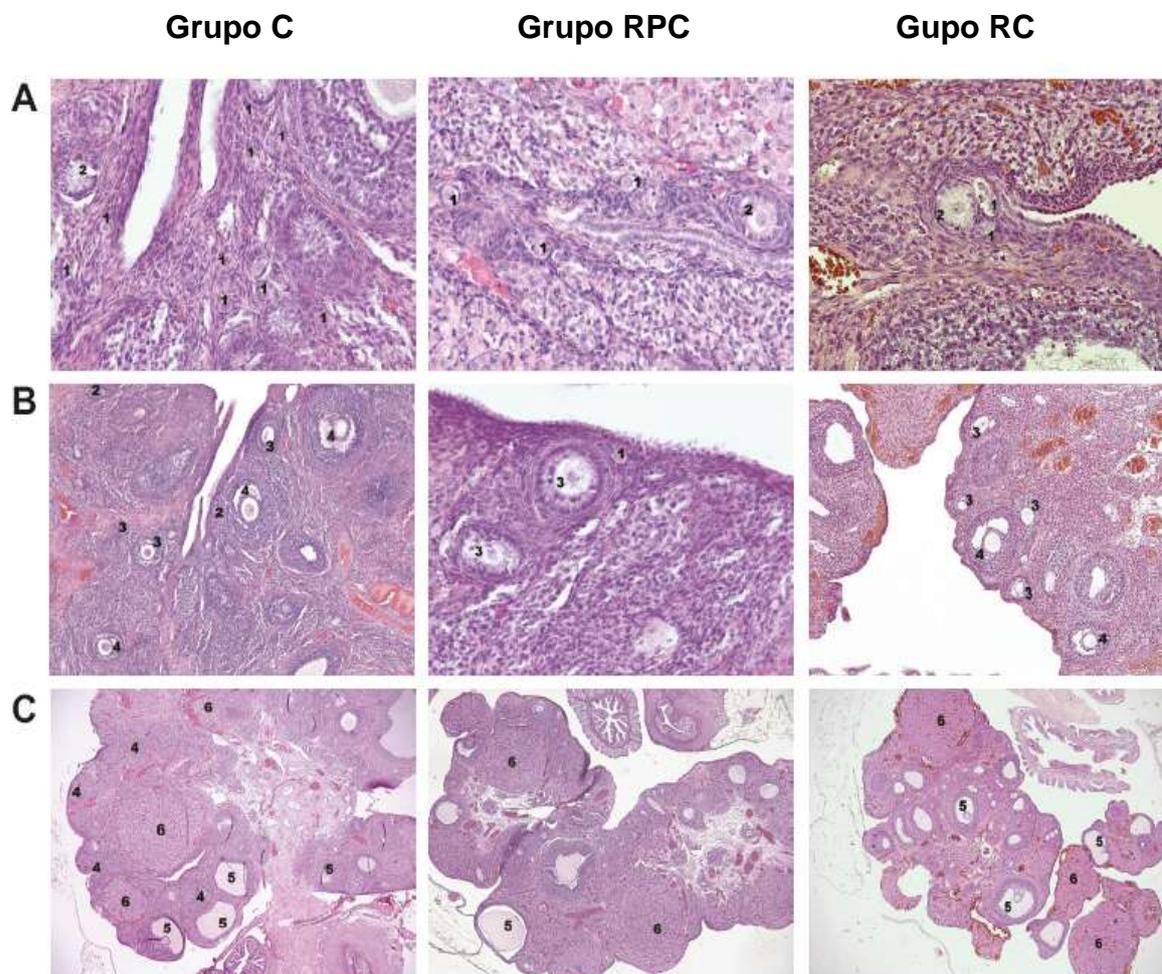


Figura 8- Fotomicrografia mostrando os ovários de ratas fêmeas no grupo controle (C), grupo restrição protéico-calórica (RPC) e grupo restrição calórica (RC). (Fig. 8A) Folículos primordiais 1; Folículos primários 2. (Fig. 8B) Folículos preantrais 3; Folículos antrais 4. (Fig. 8C) Folículos de Graaf 5; Corpo lúteo 6. Aumento A= 400X; B=200X; C=40X.

Na figura 9 estão apresentadas as concentrações séricas hormonais. A concentração sérica de testosterona não foi detectada. A concentração sérica de estradiol não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos (C=125,4±20,4; RPC=116,6±16,2; RC=102,1±9,3). A concentração sérica de leptina não mostrou diferença significativa entre os grupos nem quando expressa como ng/ml (C=1,9±0,18; RPC=2,2±0,15; RC=2,5±0,6) ou em relação ao peso corporal (ng/mL/mgPC) (C=9,8±0,9; RPC=9,7±0,5; RC=10,8±0,9).

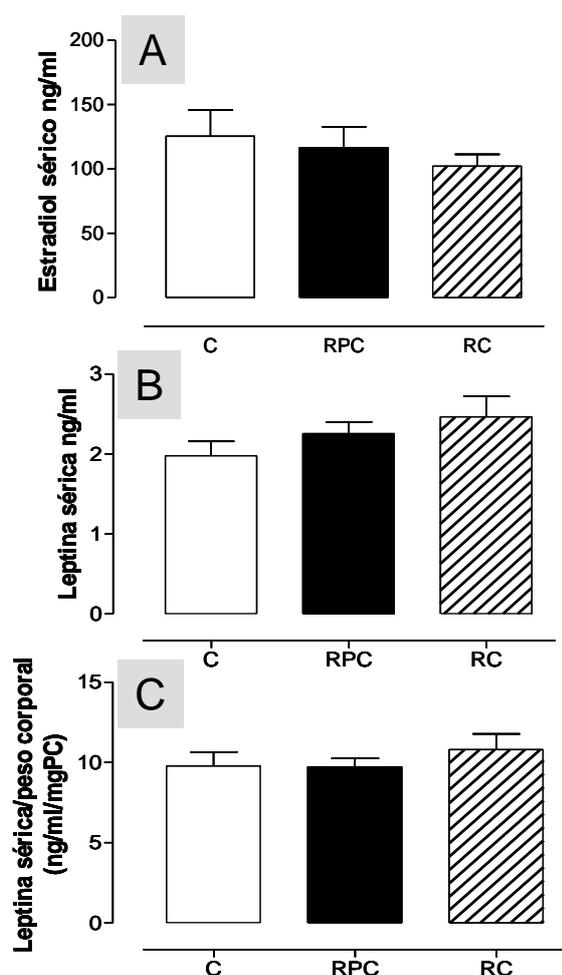


Figura 9: Concentração sérica de estradiol (A), leptina-ng/mL (B) e leptina-ng/mL/mgPC (C) nos grupos controle (C), restrição protéico-calórica (RPC) e restrição calórica (RC). Valores dados por média \pm erro padrão de 8 animais.

A expressão ovariana do RNAm para leptina e as diferentes isoformas do seu receptor está apresentada na figura 10. Ambos os grupos cujas mães foram submetidas a restrição alimentar na lactação apresentaram redução significativa na expressão de leptina em relação ao grupo controle ($C=0,5\pm0,03$; $RPC=0,4\pm0,03$; $RC=0,2\pm0,02$, $p<0,0001$). Houve ainda diferença significativa ($p<0,0001$) na expressão de leptina entre os grupos RPC e RC.

A restrição alimentar materna durante a lactação reduziu significativamente a expressão da isoforma longa, OBRb, em ambos grupos RPC e RC quando comparados ao C ($C=0,3\pm0,007$, $RPC=0,26\pm0,1$, $RC=0,13\pm0,1$, $p<0,0007$). Houve ainda diferença significativa na expressão da isoforma OBRb entre os grupos RPC e RC ($p<0,0007$). Dentre as isoformas curtas do receptor, houve redução significativa

da isoforma OBRA em ambos os grupos RPC e RC quando comparados ao grupo C ($C=0,8\pm0,05$, $RPC=0,6\pm0,03$; $RC=0,4\pm0,02$, $p<0,0001$).

Houve aumento significativo apenas no grupo RC em relação ao grupo C da expressão das isoformas OBRc ($C=0,7\pm0,1$; $RPC=0,9\pm0,04$; $RC=1,0\pm0,03$, $p<0,04$) e OBRf ($C=0,5\pm0,06$; $RPC=0,6\pm0,06$; $RC=0,7\pm0,05$, $p<0,02$) apresentando o grupo RPC apenas um discreto aumento. Já a isoforma OBRe, solúvel, não apresentou diferença significativa entre os grupos ($C=0,6\pm0,05$; $RPC=0,7\pm0,06$; $RC=0,7\pm0,07$).

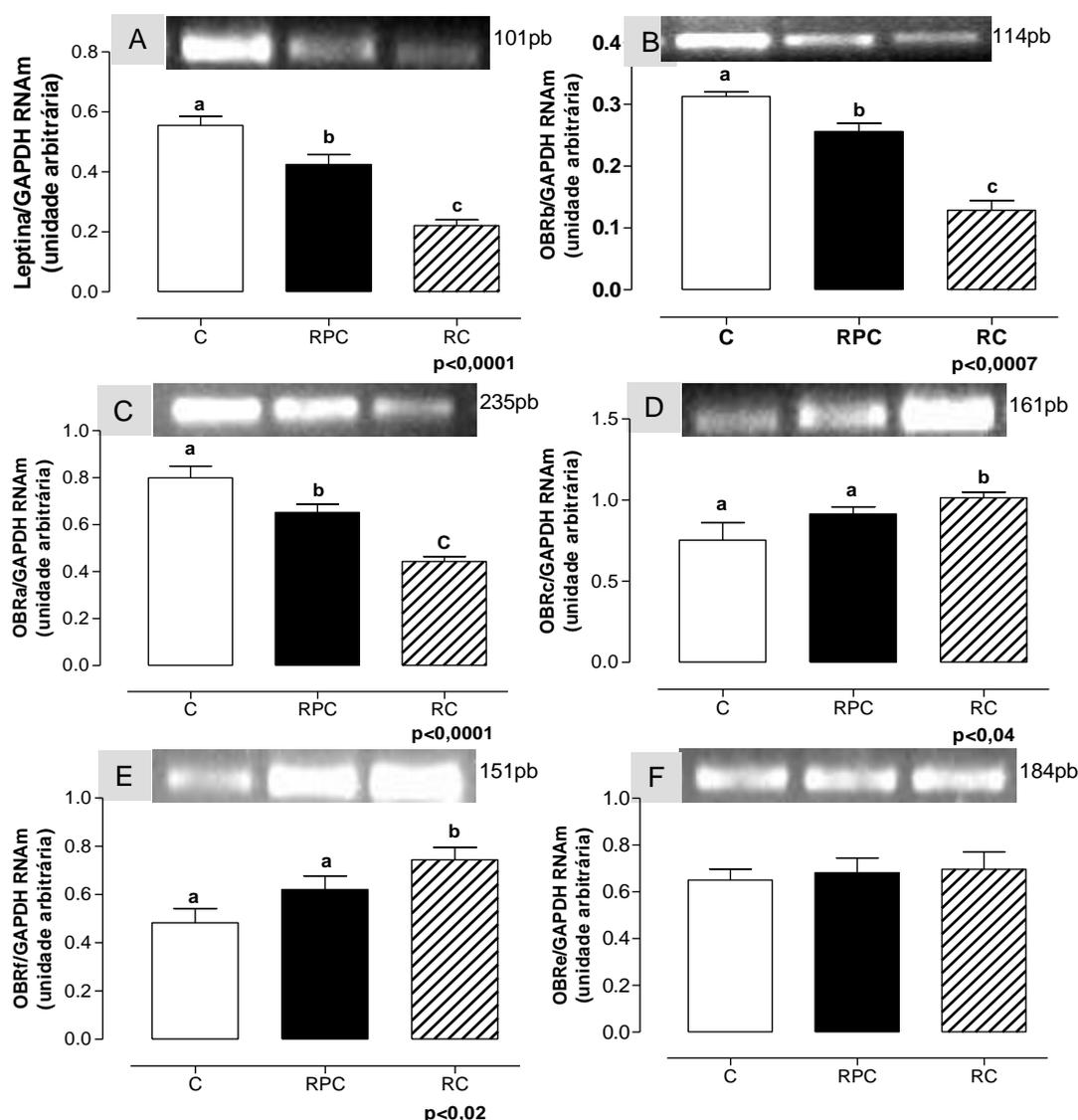


Figura 10: Expressão ovariana do RNAm para os receptores de leptina (A) e as isoformas OBRb (B), OBRa (C), OBRc (D), OBRf (E) e OBRe (F) nos grupos controle (C), restrição proteico-calórica (RPC) e restrição calórica (RC). Valores dados por média \pm erro padrão de 5 animais. Letras diferentes significam diferença estatística.

Discussão

Um dos fatores neonatal mais importante envolvido na programação do desenvolvimento é a nutrição adequada durante o período de lactação. Este estudo está de acordo com outros que suportam a evidência de que a má nutrição precoce pode programar vários sistemas fisiológicos [85-88, 108] na prole de diferentes espécies.

A restrição alimentar durante o período perinatal é associada com redução na taxa de crescimento. Os presentes resultados de baixo peso corporal e crescimento linear estão de acordo com a literatura [42, 67, 89, 109]. No entanto, a alteração no peso corporal, não parece estar diretamente relacionada ao consumo alimentar. Enquanto nos animais RPC houve uma diminuição no consumo alimentar e peso corporal do desmame até 60 dias, nos animais RC, o consumo alimentar não foi alterado, apesar do menor peso corporal. Também, em torno de 80 dias, ambos os grupos RPC e RC apresentaram menor consumo alimentar, sem qualquer alteração no peso corporal e crescimento linear.

Recentemente foi demonstrado que ratos machos cujas mães foram submetidas a dieta protéico-energética durante a lactação apresentaram menor peso corporal até 180 dias de vida, apesar de consumo alimentar normal. Além disso, os animais cujas mães foram submetidas à dieta energética durante a lactação, apesar de apresentarem consumo alimentar normal, apresentaram menor peso corporal até 52 dias e um aumento no peso corporal após 140 dias de idade [110]. Portanto, alterações no peso corporal podem ser causadas por outros fatores além da ingestão alimentar, especialmente aqueles envolvidos com a regulação da taxa metabólica. Passos e colaboradores [111] demonstraram que a função tireóidea é alterada em animais submetidos à restrição alimentar materna durante a lactação o que poderia explicar as alterações de peso corporal.

A relação entre nutrição e reprodução tem sido amplamente investigada, mas o mecanismo exato que liga estes processos ainda não é totalmente conhecido. Vários fatores devem ser considerados como ligação entre o estado nutricional e o processo reprodutivo, sendo a leptina um forte candidato a modulador deste mecanismo [112].

A secreção de leptina relaciona-se principalmente ao tamanho do tecido adiposo corporal; a expressão gênica de leptina e concentrações de leptina

plasmática no jejum estão positivamente correlacionadas com o percentual de gordura corporal [113]. Além disso, sugere-se que o fator crucial na regulação sérica de leptina parece ser a ingestão calórica e a quantidade de energia armazenada nos adipócitos [114]. Nossos resultados atuais mostram que não há diferença no consumo alimentar ou na massa de tecido adiposo abdominal entre os grupos o que poderia explicar os níveis normais de leptina.

Há controvérsias no que diz respeito a interação entre leptina e hormônios esteróides. Ao contrário da situação em humanos, as concentrações séricas de leptina permanecem constantes ao longo de todo o ciclo estral em camundongos [61] e ratos [115]. No entanto, um estudo mais recente mostra que as concentrações séricas de leptina são máximas no pró-estro, período em que estradiol alcança o pico máximo [75]. Neste estudo nós mostramos que ambos, leptina e estradiol séricos não foram alterados pela restrição alimentar materna durante a lactação. Apesar de não podermos confirmar se a secreção destes hormônios é regulada um pelo outro, este resultado sugere uma interação entre ambos os hormônios, de acordo com relatos anteriores [61, 115].

Em roedores, os folículos primordiais são formados após 3 dias de idade, e a primeira remessa de folículos que se desenvolvem a folículos antrais ocorre ao longo das 3 semanas seguintes [116, 117]. De acordo com a literatura [118, 119], mostramos aqui que, neste período, ambos os grupos desnutridos apresentam alterações significativas no seu peso corporal. Além disso, a função tireóidea e a composição do leite são alteradas neste momento [118, 119]. Assim, é possível que a diminuição observada no número de folículos primordiais possa resultar de uma ação direta da restrição alimentar no ovário dos filhotes nos primeiros dias de vida, quando os folículos primordiais são formados.

Recentemente Guzman e colaboradores [89] utilizando um modelo semelhante da desnutrição durante a lactação, demonstraram que ratos com 1 ano de idade apresentaram um aumento na duração do ciclo estral e redução na taxa de fertilidade. Nosso dado de redução do número de folículos primordiais poderia explicar este fato, sugerindo que a redução da reserva folicular que serve como um marcador para o início da senescência poderia ser responsável pela diminuição na taxa de fertilidade.

Há também uma redução no número total de folículos ovarianos nos animais cujas mães foram submetidas à restrição alimentar durante a lactação,

embora esta redução tenha sido significativa apenas nos folículos primordiais, primários e de Graaf. A partir desta constatação, poderíamos esperar uma baixa nos níveis séricos de estradiol destes animais. No entanto, Zhao e colaboradores [120] sugerem que uma aromatização extragonadal pode tornar-se relevante para manter os níveis séricos de estradiol após a ovariectomia, o que poderia explicar os níveis séricos de estradiol normal nos animais cujas mães foram submetidas à restrição alimentar durante a lactação

Dentre todas as isoformas do receptor de leptina, apenas a isoforma longa OBRb é considerada capaz de ativar a transdução de sinal através da membrana celular [79] e, provavelmente, por este motivo, tem despertado mais interesse do que as outras isoformas. Neste trabalho, nós avaliamos além da isoforma longa, OBRb, a expressão gênica das outras isoformas curtas, OBRa, OBRc e OBRf e a isoforma solúvel do receptor, OBRe, e a expressão gênica da leptina ovariana.

Tem sido sugerido que a leptina atua de forma autócrina, regulando a sua própria expressão através de receptores de leptina no tecido adiposo [79, 121] e nos ovários [79]. Neste trabalho nós mostramos que a expressão gênica de leptina no ovário e as isoformas, OBRa e OBRb, são reduzidas, enquanto as isoformas OBRc e OBRf são aumentadas pela restrição alimentar materna durante a lactação. Estes resultados sugerem que, no ovário, após a restrição alimentar materna durante a lactação, a leptina age de forma autócrina regulando a expressão dos seus receptores. A redução na expressão gênica de leptina pode ser diretamente relacionadas à redução das isoformas OBRa e OBRb e inversamente relacionada as isoformas OBRc e OBRf.

A deficiência de leptina em camundongos está associada com a supressão da foliculogênese ovariana e aumento do apoptose de células ovarianas da granulosa [78]. Sendo o OBRb o receptor funcional para leptina enquanto o OBRa parece estar envolvida com o transporte de leptina para o ovócito, podemos supor que as mudanças observadas na expressão gênica da leptina, nas isoformas do receptor OBRa e OBRb após restrição alimentar materna durante a lactação podem ter contribuído para a redução na foliculogênese nestes animais. Apesar de nenhuma função específica ter sido descrita para as isoformas curtas ainda, o aumento da expressão gênica de OBRc e OBRf, especialmente no grupo RC, poderia ter sido importante para manter o crescimento e desenvolvimento de alguns folículos.

Provavelmente este mecanismo de compensação poderia ser responsável pela não diferença estatística entre os grupos em algumas classes de folículos.

Nos seres humanos, a maioria da leptina circula ligada a macromoléculas no soro, que podem modular a bioatividade do ligante e a biodisponibilidade para os tecidos-alvo [122]. Em indivíduos magros com uma massa de tecido adiposo relativamente pequena, a maioria da leptina é circula na forma ligada, enquanto a proporção de leptina livre está aumentada no soro de pacientes obesos [122, 123]. A leptina livre pode ter um *turnover* mais rápido devido à clivagem proteolítica ou aumento do *clearance*. Durante o jejum, uma diminuição na concentração livre de leptina tem sido observada, enquanto que nenhuma mudança foi observada na leptina ligada em ambos os grupos magros e obesos [123]. Pode-se especular que a relação de leptina livre / total não é constante, mas que, dependendo do estado nutricional e metabólico, existe um equilíbrio dinâmico entre a leptina ligada as proteínas circulantes e a leptina livre [31].

A restrição alimentar materna não alterara a isoforma solúvel do receptor da leptina, a OBRe. Em camundongos, foi relatado que a isoforma OBRe, é produzida a um nível suficientemente elevado para agir como um sistema de tamponamento para a leptina livre circulante [124]. Portanto, podemos supor que a expressão normal de OBRe foi importante para manter inalterado o nível sérico de leptina.

Os dois diferentes tipos de dietas dadas às mães durante a lactação causaram efeitos diferentes em alguns parâmetros avaliados. As alterações observadas na expressão gênica de leptina e de todas as isoformas dos receptores, exceto a isoforma solúvel, e também no número de folículos primários e de Graaf foram mais pronunciados nos animais cujas mães foram submetidas à dieta energética durante a lactação. Provavelmente estas diferenças estão relacionadas com algum micro ou macro nutriente da dieta, uma vez que já foi relatado que o leite das ratas submetidas a dieta protéico-energética ou energética apresentam diferenças quanto a quantidade de proteína e lipídeos [125].

Nós não mensuramos a leptina sérica no início da vida, mas alguns trabalhos têm mostrado que a leptina é diminuído nos primeiros dias de vida após a restrição alimentar materna durante a lactação, desempenhando um papel importante na programação neonatal [110, 126]. Vickers e colaboradores [127] revelaram que várias conseqüências metabólicas da restrição alimentar materna foram revertidas pelo tratamento neonatal com leptina e que alterações perinatais

nos níveis de leptina podem desempenhar um papel crucial na determinação da ocorrência de seqüelas metabólicas a longo prazo.

A noção de que a nutrição durante fases iniciais do desenvolvimento humano pode predispor indivíduos ou programar doença na vida adulta tem despertado grande interesse, especialmente desde a última década. Podemos sugerir que tanto as dietas de restrição energética e protéico-energética durante a lactação programam a função ovariana da prole, levando a uma redução na foliculogênese, provavelmente em conseqüência da baixa expressão dos genes da leptina e das isoformas de seus receptores. Com base no fato de que o tecido adiposo poder aumentar em número ou tamanho em qualquer tempo de desenvolvimento, este não deve estar sob controle de uma programação metabólica. O fato pode explicar a manutenção de sua função como a síntese e secreção de leptina e aromatização para manter os níveis séricos normais de estradiol e leptina.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que ambos os tipos de restrição alimentar materna durante a lactação programam a função ovariana da prole, levando a uma redução na foliculogênese, provavelmente em consequência da alteração na expressão dos genes da leptina e das isoformas de seus receptores.

REFERÊNCIAS:

- [1]Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med.* 1997 Sep;3(9):1029-33.
- [2]Zang R, Muller HJ, Kielbassa K, Marks F, Gschwendt M. Partial purification of a type eta protein kinase C from murine brain: separation from other protein kinase C isoenzymes and characterization. *Biochem J.* 1994 Dec 1;304 (Pt 2):641-7.
- [3]Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, et al. The stomach is a source of leptin. *Nature.* 1998 Aug 20;394(6695):790-3.
- [4]Bouret SG, Simerly RB. Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology.* 2004 Jun;145(6):2621-6.
- [5]Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet.* 1998 Mar;18(3):213-5.
- [6]Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Oct;11(8):327-32.
- [7]Hickey MS, Houmard JA, Considine RV, Tyndall GL, Midgette JB, Gavigan KE, et al. Gender-dependent effects of exercise training on serum leptin levels in humans. *Am J Physiol.* 1997 Apr;272(4 Pt 1):E562-6.
- [8]Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res.* 1996 Dec;28(12):619-32.
- [9]Houseknecht KL, Portocarrero CP, Ji S, Lemenager R, Spurlock ME. Growth hormone regulates leptin gene expression in bovine adipose tissue: correlation with adipose IGF-1 expression. *The Journal of endocrinology.* 2000 Jan;164(1):51-7.
- [10]Tartaglia LA. The leptin receptor. *The Journal of biological chemistry.* 1997 Mar 7;272(10):6093-6.
- [11]Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995 Dec 29;83(7):1263-71.
- [12]Heshka JT, Jones PJ. A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. *Life sciences.* 2001 Jul 20;69(9):987-1003.
- [13]Myers MG, Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent progress in hormone research.* 2004;59:287-304.
- [14]Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, et al. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *The Journal of biological chemistry.* 2001 Feb 16;276(7):4747-55.
- [15]Akerman F, Lei ZM, Rao CV. Human umbilical cord and fetal membranes co-express leptin and its receptor genes. *Gynecol Endocrinol.* 2002 Aug;16(4):299-306.
- [16]Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, Tsocas A, Voisin T, Peranzi G, et al. PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalaxin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *The Journal of clinical investigation.* 2001 Nov;108(10):1483-94.
- [17]Ebenbichler CF, Kaser S, Laimer M, Wolf HJ, Patsch JR, Illsley NP. Polar expression and phosphorylation of human leptin receptor isoforms in paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human term placenta. *Placenta.* 2002 Jul;23(6):516-21.

- [18]Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Aug;106(4):501-9.
- [19]Goiot H, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Lardeux B, Lehy T, et al. Antral mucosa expresses functional leptin receptors coupled to STAT-3 signaling, which is involved in the control of gastric secretions in the rat. *Gastroenterology*. 2001 Dec;121(6):1417-27.
- [20]Kim YB, Uotani S, Pierroz DD, Flier JS, Kahn BB. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology*. 2000 Jul;141(7):2328-39.
- [21]Lee YJ, Park JH, Ju SK, You KH, Ko JS, Kim HM. Leptin receptor isoform expression in rat osteoblasts and their functional analysis. *FEBS Lett*. 2002 Sep 25;528(1-3):43-7.
- [22]Morton NM, Emilsson V, de Groot P, Pallett AL, Cawthorne MA. Leptin signalling in pancreatic islets and clonal insulin-secreting cells. *J Mol Endocrinol*. 1999 Apr;22(2):173-84.
- [23]Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent progress in hormone research*. 2004;59:305-31.
- [24]Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, et al. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology*. 2002 Mar;143(3):775-83.
- [25]Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Dec 19;272(51):32686-95.
- [26]Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. 1996 Feb 15;379(6566):632-5.
- [27]Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett*. 1996 Aug 26;392(2):87-90.
- [28]Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001 May 18;283(4):982-8.
- [29]Li H, Matheny M, Tumer N, Scarpace PJ. Aging and fasting regulation of leptin and hypothalamic neuropeptide Y gene expression. *Am J Physiol*. 1998 Sep;275(3 Pt 1):E405-11.
- [30]Chan JL, Bluher S, Yiannakouris N, Suchard MA, Kratzsch J, Mantzoros CS. Regulation of circulating soluble leptin receptor levels by gender, adiposity, sex steroids, and leptin: observational and interventional studies in humans. *Diabetes*. 2002 Jul;51(7):2105-12.
- [31]Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*. 2006 Jan 1;393(Pt 1):7-20.
- [32]Ghilardi N, Skoda RC. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol*. 1997 Apr;11(4):393-9.
- [33]Jiang N, He TC, Miyajima A, Wojchowski DM. The box1 domain of the erythropoietin receptor specifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin 2 beta-receptor chimera. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Jul 12;271(28):16472-6.

- [34]Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kuwajima M, Shima K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997 Feb 3;231(1):26-9.
- [35]Bahrenberg G, Behrmann I, Barthel A, Hekerman P, Heinrich PC, Joost HG, et al. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol*. 2002 Apr;16(4):859-72.
- [36]Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG, Jr. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Nov 1;277(44):41547-55.
- [37]Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*. 1994 Oct 27;371(6500):799-802.
- [38]Hegyí K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int*. 2004;28(3):159-69.
- [39]Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell*. 1998 Mar;1(4):619-25.
- [40]Yamashita T, Murakami T, Iida M, Kuwajima M, Shima K. Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes*. 1997 Jun;46(6):1077-80.
- [41]Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, et al. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med*. 1996 May;2(5):585-9.
- [42]Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, et al. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec;82(12):4144-8.
- [43]Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ. Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biology of reproduction*. 2002 May;66(5):1548-54.
- [44]Swain JE, Dunn RL, McConnell D, Gonzalez-Martinez J, Smith GD. Direct effects of leptin on mouse reproductive function: regulation of follicular, oocyte, and embryo development. *Biology of reproduction*. 2004 Nov;71(5):1446-52.
- [45]Akhter N, Johnson BW, Crane C, Iruthayanathan M, Zhou YH, Kudo A, et al. Anterior pituitary leptin expression changes in different reproductive states: in vitro stimulation by gonadotropin-releasing hormone. *J Histochem Cytochem*. 2007 Feb;55(2):151-66.
- [46]Liu LL, Qiao J, Wang YZ, Chen YJ, Gao YQ. [Expression of leptin and leptin receptor system in woman reproductive organs]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2003 Apr 25;83(8):666-8.
- [47]Dal Farra C, Zsurger N, Vincent JP, Cupo A. Binding of a pure 125I-monoiodoleptin analog to mouse tissues: a developmental study. *Peptides*. 2000 Apr;21(4):577-87.
- [48]Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, Magoffin DA. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Mar;84(3):1072-6.
- [49]Loffler S, Aust G, Kohler U, Spanel-Borowski K. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod*. 2001 Dec;7(12):1143-9.

- [50]Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod*. 1997 Jun;3(6):467-72.
- [51]Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumoto N, Takeda T, Yamaguchi M, et al. Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999 Mar 24;256(3):480-4.
- [52]Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, et al. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology*. 2002 May;143(5):1922-31.
- [53]Antczak M, Van Blerkom J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Mol Hum Reprod*. 1997 Dec;3(12):1067-86.
- [54]Negrao AB, Licinio J. Obesity: on the eve of a major conceptual revolution. *Drug Discov Today*. 2000 May;5(5):177-9.
- [55]Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*. 1996 Jul 18;382(6588):250-2.
- [56]Tataranni PA, Monroe MB, Dueck CA, Traub SA, Nicolson M, Manore MM, et al. Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997 Sep;21(9):818-21.
- [57]Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*. 1999 Apr 20;130(8):671-80.
- [58]Kraemer RR, Chu H, Castracane VD. Leptin and exercise. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2002 Oct;227(9):701-8.
- [59]Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Sep;82(9):2849-55.
- [60]Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Feb 4;94(3):1023-8.
- [61]Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science*. 1997 Jan 3;275(5296):88-90.
- [62]Zerani M, Boiti C, Zampini D, Brecchia G, Dall'Aglio C, Ceccarelli P, et al. Ob receptor in rabbit ovary and leptin in vitro regulation of corpora lutea. *The Journal of endocrinology*. 2004 Nov;183(2):279-88.
- [63]Thong FS, McLean C, Graham TE. Plasma leptin in female athletes: relationship with body fat, reproductive, nutritional, and endocrine factors. *J Appl Physiol*. 2000 Jun;88(6):2037-44.
- [64]Thong FS, Graham TE. Leptin and reproduction: is it a critical link between adipose tissue, nutrition, and reproduction? *Can J Appl Physiol*. 1999 Aug;24(4):317-36.
- [65]Clarke IJ, Henry BA. Leptin and reproduction. *Rev Reprod*. 1999 Jan;4(1):48-55.
- [66]Bluher S, Mantzoros CS. The role of leptin in regulating neuroendocrine function in humans. *The Journal of nutrition*. 2004 Sep;134(9):2469S-74S.
- [67]Duggal PS, Van Der Hoek KH, Milner CR, Ryan NK, Armstrong DT, Magoffin DA, et al. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology*. 2000 Jun;141(6):1971-6.

- [68]Kraemer RR, Acevedo EO, Synovitz LB, Hebert EP, Gimpel T, Castracane VD. Leptin and steroid hormone responses to exercise in adolescent female runners over a 7-week season. *Eur J Appl Physiol*. 2001 Nov;86(1):85-91.
- [69]Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
- [70]Spicer LJ. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domest Anim Endocrinol*. 2001 Nov;21(4):251-70.
- [71]Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K, Honjo H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol Hum Reprod*. 1999 Aug;5(8):708-13.
- [72]Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, et al. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Molecular and cellular endocrinology*. 2001 Oct 25;183(1-2):179-91.
- [73]Ruiz-Cortes ZT, Martel-Kennes Y, Gevry NY, Downey BR, Palin MF, Murphy BD. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. *Biology of reproduction*. 2003 Mar;68(3):789-96.
- [74]Sirotkin AV, Mlyncek M, Kotwica J, Makarevich AV, Florkovicova I, Hetenyi L. Leptin directly controls secretory activity of human ovarian granulosa cells: possible inter-relationship with the IGF/IGFBP system. *Horm Res*. 2005;64(4):198-202.
- [75]Duggal PS, Weitsman SR, Magoffin DA, Norman RJ. Expression of the long (OB-RB) and short (OB-RA) forms of the leptin receptor throughout the oestrous cycle in the mature rat ovary. *Reproduction*. 2002 Jun;123(6):899-905.
- [76]Spicer LJ, Chamberlain CS, Francisco CC. Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells. *Endocrine*. 2000 Feb;12(1):53-9.
- [77]Kikuchi N, Andoh K, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biology of reproduction*. 2001 Jul;65(1):66-71.
- [78]Hamm ML, Bhat GK, Thompson WE, Mann DR. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biology of reproduction*. 2004 Jul;71(1):66-72.
- [79]Ryan NK, Van der Hoek KH, Robertson SA, Norman RJ. Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary. *Endocrinology*. 2003 Nov;144(11):5006-13.
- [80]Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine reviews*. 1996 Apr;17(2):121-55.
- [81]Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocrine reviews*. 1997 Feb;18(1):71-106.
- [82]Stewart KJ, Seemans CM, McFarland LD, Weinhofer JJ, Brown CS. Dietary fat and cholesterol intake in young children compared with recommended levels. *J Cardiopulm Rehabil*. 1999 Mar-Apr;19(2):112-7.
- [83]Sprenkel R, Braun T, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH. The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol*. 1990 Apr;4(4):525-30.
- [84]Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine reviews*. 1994 Dec;15(6):725-51.
- [85]Engelbregt MJ, Houdijk ME, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric research*. 2000 Dec;48(6):803-7.

- [86]Engelbregt MJ, van Weissenbruch MM, Popp-Snijders C, Lips P, Delemarre-van de Waal HA. Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction. *Pediatric research*. 2001 Oct;50(4):474-8.
- [87]da Silva Faria T, da Fonte Ramos C, Sampaio FJ. Puberty onset in the female offspring of rats submitted to protein or energy restricted diet during lactation. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2004 Feb;15(2):123-7.
- [88]Brasil FB, Faria TS, Costa WS, Sampaio FJ, Ramos CF. The pups' endometrium morphology is affected by maternal malnutrition during suckling. *Maturitas*. 2005 Aug 16;51(4):405-12.
- [89]Guzman C, Cabrera R, Cardenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. *J Physiol*. 2006 Apr 1;572(Pt 1):97-108.
- [90]Wade CE, Moran MM, Oyama J. Resting energy expenditure of rats acclimated to hypergravity. *Aviat Space Environ Med*. 2002 Sep;73(9):859-64.
- [91]Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Archives of disease in childhood*. 1994 Oct;71(4):288-90.
- [92]Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *The Journal of nutrition*. 1998 Feb;128(2 Suppl):401S-6S.
- [93]Barker DJ. In utero programming of cardiovascular disease. *Theriogenology*. 2000 Jan 15;53(2):555-74.
- [94]Heywood WE, Mian N, Milla PJ, Lindley KJ. Programming of defective rat pancreatic beta-cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. *Clin Sci (Lond)*. 2004 Jul;107(1):37-45.
- [95]Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 1999 Feb;69(2):179-97.
- [96]Ozanne SE. Metabolic programming in animals. *Br Med Bull*. 2001;60:143-52.
- [97]Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition*. 2004 Jan;20(1):63-8.
- [98]Armitage JA, Lakasing L, Taylor PD, Balachandran AA, Jensen RI, Dekou V, et al. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J Physiol*. 2005 May 15;565(Pt 1):171-84.
- [99]Bayne K. Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. American Physiological Society. *Physiologist*. 1996 Aug;39(4):199, 208-11.
- [100]Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition*. 1993 Nov;123(11):1939-51.
- [101]Fischbeck KL, Rasmussen KM. Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *The Journal of nutrition*. 1987 Nov;117(11):1967-75.
- [102]Crnic LS, Chase HP. Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk. *The Journal of nutrition*. 1978 Nov;108(11):1755-60.
- [103]Yagil R, Etzion Z, Berlyne GM. Changes in rat milk quantity and quality due to variations in litter size and high ambient temperature. *Lab Anim Sci*. 1976 Feb;26(1):33-7.

- [104]Feder. Estrous cyclicity in mammals. In: Adler NT,eds. Neuroendocrinology of reproduction, physiology and behavior. . New York: Plenum Press 1981:279-348.
- [105]Teixeira CV, Silandre D, de Souza Santos AM, Delalande C, Sampaio FJ, Carreau S, et al. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *The Journal of endocrinology*. 2007 Feb;192(2):301-11.
- [106]Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.
- [107]Zar S, Mendall MA. Clinical practice--strategies for management of dyspepsia. *Br Med Bull*. 1998;54(1):217-28.
- [108]Leonhardt M, Lesage J, Croix D, Dutriez-Casteloot I, Beauvillain JC, Dupouy JP. Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biology of reproduction*. 2003 Feb;68(2):390-400.
- [109]Faria Tda S, Brasil Fde B, Sampaio FJ, Ramos Cda F. Maternal malnutrition during lactation alters the folliculogenesis and gonadotropins and estrogen isoforms ovarian receptors in the offspring at puberty. *The Journal of endocrinology*. 2008 Sep;198(3):625-34.
- [110]Teixeira C, Passos M, Ramos C, Dutra S, Moura E. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2002 Aug;13(8):493.
- [111]Passos MC, da Fonte Ramos C, Dutra SC, Mouco T, de Moura EG. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res*. 2002 Jan;34(1):40-3.
- [112]Magni P, Motta M, Martini L. Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regulatory peptides*. 2000 Aug 25;92(1-3):51-6.
- [113]Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):661-71.
- [114]Kelesidis T, Mantzoros CS. The emerging role of leptin in humans. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2006 Mar;3(3):239-48.
- [115]Bennett PA, Lindell K, Wilson C, Carlsson LM, Carlsson B, Robinson IC. Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrous cycle. *Neuroendocrinology*. 1999 Jun;69(6):417-23.
- [116]Rajah R, Glaser EM, Hirshfield AN. The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn*. 1992 Jul;194(3):177-92.
- [117]McGee EA, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiri A, Hsueh AJ. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biology of reproduction*. 1997 Nov;57(5):990-8.
- [118]Passos MC, da Fonte Ramos C, Potente Dutra SC, Gaspar de Moura E. Transfer of iodine through the milk in protein-restricted lactating rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2001 May;12(5):300-3.
- [119]Ramos CF, Teixeira CV, Passos MC, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Curty FH, et al. Low-protein diet changes thyroid function in lactating rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)*. 2000 Sep;224(4):256-63.
- [120]Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B. Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:6.

- [121]Zhang Y, Olbort M, Schwarzer K, Nuesslein-Hildesheim B, Nicolson M, Murphy E, et al. The leptin receptor mediates apparent autocrine regulation of leptin gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997 Nov 17;240(2):492-5.
- [122]Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, Hadro E, Flier JS, Kahn BB. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes*. 1996 Nov;45(11):1638-43.
- [123]Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Sep 15;98(6):1277-82.
- [124]Lollmann B, Gruninger S, Stricker-Krongrad A, Chiesi M. Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997 Sep 18;238(2):648-52.
- [125]Passos MC, Ramos CF, Bernardo-Filho M, de Mattos DM, Moura EG. The effect of protein or energy restriction on the biodistribution of Na99TcmO4 in Wistar rats. *Nucl Med Commun*. 2000 Nov;21(11):1059-62.
- [126]Bautista CJ, Boeck L, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatric research*. 2008 Apr;63(4):358-63.
- [127]Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, et al. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology*. 2005 Oct;146(10):4211-6.

ANEXOS

Anexo A – Protocolo de aprovação da Comissão de Ética para cuidado e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

Anexo B – Submissão do artigo para revista *Endocrinology*.

Anexo C – Artigo submetido para revista *Endocrinology*. Índice de impacto 2007- 5.0