THAIS TESSARI ZAMPIERI

**Fatores moleculares envolvidos nas
alterações metabólicas durante a gestação:
papel do SOCS3**

Tese apresentada ao Departamento de
Fisiologia e Biofísica do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do título de
Doutora em Ciências.

São Paulo
2015

THAIS TESSARI ZAMPIERI

**Fatores moleculares envolvidos nas
alterações metabólicas durante a gestação:
papel do SOCS3**

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Zampieri, Thais Tessari.

Fatores moleculares envolvidos nas alterações metabólicas durante a gestação: papel do SOCS3 / Thais Tessari Zampieri. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Neurofisiologia da leptina e regulação central da ingestão alimentar.

Versão do título para o inglês: Molecular factors involved in the metabolic changes during pregnancy: role of SOCS3.

1. Leptina 2. Gestação 3. Hipotálamo 4. SOCS3 5. 6. I. Donato Júnior, Prof. Dr. José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB052/2015

Título da Tese: Fatores moleculares envolvidos nas alterações metabólicas durante a gestação: papel do SOCS3

( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome: .....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **012** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **José Donato Junior**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Neurofisiologia da leptina e regulação central da ingestão alimentar*" do qual participam o(s) aluno(s), **Thais Tessari Zampieri, Isadora Clivatti Furigo, João Alfredo Bolivar Pedroso, Laís Iatauro Cardinali, Vanessa Sayuri Nagaishi, Aline Coelho Macedo, Marina Silveira, Regina Silva** os pesquisadores **Martin Andreas Metzger, Sara Joyce Shammah Lagnado, Renata Frazão**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **19.03.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 20 de março de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico a minha filha querida que me proporcionou sentir na pele a resistência à leptina e insulina, o aumento do consumo alimentar e deposição de gordura, a alta demanda energética da lactação, e mais importante que tudo isso, me proporcionou a alegria infinita de poder ser mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof Dr José Donato Jr**, pela confiança em meu trabalho e pela orientação.

À **CAPES** e **FAPESP**, por auxiliar na realização desta tese.

Ao **Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**, onde desenvolvi meu trabalho de pesquisa.

Aos **Prof Dr Martin Andreas Metzger** e **Prof^a Dra Sara Joyce Shammah Lagnado**, por compartilhar o espaço de trabalho.

A todos os integrantes do **Laboratório de Neurociência (ICB/USP)**, que direta ou indiretamente contribuíram com a realização desta tese.

Aos meus maravilhosos amigos da “**turminha da kiki e do luiz**”, que estão sempre presentes mesmo que a quilômetros de distância.

Ao **Norair, Cristina e Thiago**, por darem força para sempre continuar em frente.

Ao **Felipe**, por ser minha testemunha e incentivar.

RESUMO

ZAMPIERI, T. T. Fatores moleculares envolvidos nas alterações metabólicas durante a gestação: papel do SOCS3. 2014. 133 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Cerca de metade dos brasileiros adultos apresentam obesidade ou sobrepeso, sendo o excesso de ganho de peso durante a gestação um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento da obesidade em mulheres. Além do ganho de peso excessivo durante a gravidez, o diabetes gestacional é outro problema metabólico enfrentado frequentemente por gestantes. Apesar dos recentes avanços no entendimento dos componentes fisiológicos que regulam o balanço energético, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que estão envolvidos com a deposição de gordura e a resistência à insulina durante a gestação. Um aspecto conhecido é que gestantes apresentam resistência à leptina. Além disso, alguns estudos mostraram que a expressão hipotalâmica de proteínas conhecidas como supressores do sinal de citocinas (SOCS) está aumentada em gestantes, em particular o SOCS3. Entre outros efeitos, o aumento da expressão de SOCS3 no hipotálamo inibe a sinalização intracelular induzida pela leptina e pela insulina. Entretanto, o possível envolvimento do SOCS3 na etiologia da resistência à leptina decorrente da gestação ainda não foi investigado. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o papel desempenhado pelo SOCS3 na etiologia da resistência à leptina observada durante a gestação. Nesse sentido, fêmeas com deleção condicional do SOCS3 em células que expressam o receptor de leptina (LepR) foram acasaladas e alterações no peso corporal, ingestão alimentar, adiposidade, controle glicêmico, sensibilidade à leptina, resistência à insulina e expressão gênica foram avaliadas durante toda a gestação. A expressão de SOCS3 em células que expressam o LepR demonstrou ser essencial para causar plenamente a hiperfagia decorrente da gestação e lactação. Consequentemente, a inativação do SOCS3 apenas em células que expressam o receptor de leptina reduz o ganho de peso e o acúmulo de gordura durante estes períodos, garantindo menor retenção do peso pós-parto. Além disso, o aumento da expressão de SOCS3 foi um fator importante para a determinação do aumento nos níveis séricos de leptina durante a gestação, sugerindo que o SOCS3 desempenhe papel importante na resistência à leptina em gestantes. Finalmente, a deleção do gene SOCS3 em células que expressam o LepR melhorou significativamente a homeostase glicêmica durante a gestação protegendo as fêmeas contra o desenvolvimento do diabetes gestacional. Portanto, o presente estudo identificou pela primeira vez um mecanismo molecular chave responsável pela indução de alterações metabólicas observadas durante a gravidez. Esta descoberta não só explica um fenômeno pouco conhecido na fisiologia das mulheres, mas pode ajudar a desenvolver terapias mais específicas e bem-sucedidas com o objetivo de prevenir e tratar a obesidade e diabetes gestacional. Além disso, esse conhecimento pode contribuir para o entendimento da fisiopatologia da obesidade e do diabetes mellitus do tipo 2.

Palavras-chave: Leptina. Gestação. Hipotálamo. SOCS3.

ABSTRACT

ZAMPIERI, T. T. Molecular factors involved in the metabolic changes during pregnancy: role of SOCS3. 2014. 133 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

About half of Brazilian adults are obese or overweight, and excessive weight gain during pregnancy is an important risk factor for the development of obesity in women. Besides the excessive weight gain during pregnancy, gestational diabetes is another metabolic problem often faced by pregnant women. Despite recent advances in understanding the physiological components that regulate energy balance, little is known about the molecular mechanisms that are involved in fat deposition and insulin resistance during pregnancy. A known fact is that pregnant women have leptin resistance. In addition, some studies showed that the hypothalamic expression of proteins known as cytokine suppressive signal (SOCS) is increased in pregnant women, particularly the SOCS3. Among other effects, increased SOCS3 expression in the hypothalamus inhibits the intracellular signaling induced by leptin and insulin. However, the possible involvement of SOCS3 in the etiology of leptin resistance due to pregnancy has not been investigated. Thus, the present study aimed to investigate the role of SOCS3 in the etiology of leptin resistance observed during pregnancy. For this purpose, females with SOCS3 conditional deletion in leptin receptor expressing cells were mated and changes in body weight, food intake, body fat, blood glucose control, sensitivity to leptin, insulin resistance and gene expression were assessed throughout pregnancy. The expression of SOCS3 in LepR expressing cells has proved essential to fully cause the hyperphagia due to pregnancy and lactation. Consequently, these mice reduced the weight gain and fat accumulation during these periods, leading to lower postpartum weight retention. Furthermore, the expression of SOCS3 appears to be an important factor for determining the increase in serum leptin levels during pregnancy, suggesting that SOCS3 plays an important role in leptin resistance during pregnancy. Finally, the conditional deletion of SOCS3 significantly improves glucose homeostasis during pregnancy protecting against the development of gestational diabetes. Therefore, the present study identified for the first time a key molecular mechanism responsible for the induction of metabolic changes observed during pregnancy. This discovery not only explains a poorly known phenomenon in women physiology, but it can help to develop more specific and successful therapies aiming to prevent and treat obesity and diabetes gestational. In addition, this knowledge can contribute to the understanding of the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes mellitus.

Keywords: Leptin. Pregnancy. Hypothalamus. SOCS3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sistema de acasalamento.	38
Figura 2 - Imagem representativa de gel de agarose com as respectivas bandas de genotipagem: selvagem = SOCS3 ^{+/+} LepR ^{+/+} ; controle = SOCS3 ^{+/+} LepR ^{Cre/Cre} ; SOCS3 KO = SOCS3 ^{flox/flox} LepR ^{Cre/Cre}	48
Figura 3 - Fluxograma dos experimentos realizados ao longo da idade reprodutiva de fêmeas controle e SOCS3 KO.	53
Figura 4 - Expressão de genes hipotalâmicos envolvidos na sensibilidade à leptina. Comparação entre fêmeas nulíparas e grávidas (n=8 animais/grupo).	54
Figura 5 - Redução do consumo alimentar (%) após administração (s.c.) de leptina (2,5 µg/g) (n=10 animais/grupo).	55
Figura 6 - Expressão relativa de SOCS3 hipotalâmico após administração subcutânea de leptina em fêmeas não grávidas (n=6 animais/grupo).	56
Figura 7 - Expressão de RNAm para SOCS3 em fêmeas nulíparas e grávidas KO condicional (A); expressão de genes hipotalâmicos envolvidos na sensibilidade à leptina. Comparação entre fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (B) (n=8 animais/grupo).	57
Figura 8 - Expressão proteica hipotalâmica de SOCS3 após administração subcutânea de leptina em fêmeas grávidas (n=3 animais/grupo).	58
Figura 9 - Expressão proteica hipotalâmica de P-STAT3 após administração subcutânea de leptina em fêmeas grávidas (n=3 animais/grupo).	59
Figura 10 - Consumo alimentar longitudinal (% do período basal): durante os períodos de gestação, lactação e após o desmame (recuperação) (n=20-30 animais/grupo).	60
Figura 11 - Peso corporal (g) durante os períodos basal, gestação, lactação e após o desmame (recuperação) (n=20-30 animais/grupo).	60
Figura 12 - Acompanhamento do peso corporal (g) (A) e peso corporal médio (g) (B) de fêmeas primíparas após o desmame e nulíparas de mesma idade (n=12 animais/grupo).	61
Figura 13 - Composição corporal de fêmeas nas condições Basal, Gestação e Lactação, controle e SOCS3 KO. Adiposidade (g) dos diferentes depósitos de gordura:	

coxim periuterino (A), coxim periovariano (B) e coxim retroperitoneal (C) (n=12 animais/grupo).....	62
Figura 14 - Composição corporal de fêmeas nulíparas e primíparas, controle e SOCS3 KO. Adiposidade (g) dos diferentes depósitos de gordura: peri-uterino, peri-ovariano e retroperitoneal (RP). Os valores percentuais indicam a diferença dentre as fêmeas primíparas (n=12 animais/grupo).....	62
Figura 15 - Consumo alimentar (A), peso (B) e composição corporal (C) pós-parto de fêmeas controle e SOCS3 KO lactantes e não lactantes.	63
Figura 16 - Expressão de genes hipotalâmicos envolvidos no balanço energético (POMC, CART, NPY, AgRP, ORX e MCH) de fêmeas controle nas três diferentes condições do experimento: basal, gestante e lactante (n=8 animais/grupo).....	64
Figura 17 - Expressão de genes hipotalâmicos envolvidos no balanço energético (POMC, CART, NPY, AgRP, ORX e MCH) de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (16º dia de gestação) (n=8 animais/grupo).	65
Figura 18 - Expressão de genes hipotalâmicos envolvidos no balanço energético (POMC, CART, NPY, AgRP, ORX e MCH) de fêmeas controle e SOCS3 KO lactantes (14º dia da lactação) (n=8 animais/grupo).....	65
Figura 19 - Tempo e gestação (dias) para fêmeas controle e SOCS3 KO (A); número de embriões e reabsorções embrionárias observados no 16º dia de gestação de fêmeas controle e SOCS3 KO (B).....	66
Figura 20 - Peso corporal (por ninhada) da prole de fêmeas controle e SOCS3 KO em diferentes etapas do desenvolvimento (embrionário e lactente).	67
Figura 21 - peso da glândula mamária (g) (A) e concentração da prolactina circulante (pg/mL) (B) das fêmeas controle e SOCS3 KO em diferentes momentos (gestação e lactação).....	68
Figura 22 - Concentração de leptina plasmática (ng/mL) de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (16º dia de gestação) e não grávidas (basal) (n=8 animais/grupo)	69
Figura 23 - Ganho de peso (g) (A-B) e consumo alimentar (C-D) ao longo da gestação com infusão crônica de leptina (seta indica o momento do implante da mini-bomba osmótica) (n=8-22 animais/grupo).....	70

Figura 24 - Ganho de peso gestacional (g) (A) e consumo alimentar (%) [variação percentual entre o início (1º-5º dia) e fim (14º-16º dia) da gestação] (B) de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas com e sem infusão crônica de leptina (n=8-22 animais/grupo).....	70
Figura 25 - número de embriões e reabsorções embrionárias observados no 16º dia de gestação de fêmeas controle e SOCS3 KO submetidas a infusão crônica de leptina (a partir do 5º dia de gestação).	72
Figura 26 - Ativação de STAT3 após 3h da administração de leptina em fêmeas grávidas, controle e SOCS3 KO, em diferentes núcleos encefálicos. MPA; ARH; VMH; LHA; DMH; PMV e NTS (n=5-6 animais/grupo).	72
Figura 27 - Fotomicrografias representativas da distribuição de células imunorreativas a pSTAT3 (pSTAT3-ir) após administração s.c. de leptina (2,5 µg/g). Abreviações: MPA, área pré-optica medial; ovl: órgão vascular da lâmina terminal; oc: quiasma ótico; VMH: núcleo ventro-medial do hipotálamo; ARH, núcleo arqueado do hipotálamo; 3v: terceiro ventrículo; LHA: área hipotalâmica lateral; DMH: núcleo dorso-medial do hipotálamo; PMV: núcleo pré-mamilar ventral; f: fornix; NTS: núcleo do trato solitário; AP: área postrema; cc: canal central; 12N: núcleo hipoglosso. Barra de escala = 100 µm.	73
Figura 28 - Concentração de insulina sérica (ng/mL) de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas e não grávidas (nulíparas) (A) e glucagon sérico (ng/mL) de fêmeas grávidas (n=8 animais/grupo).	74
Figura 29 - Testes de tolerância à glicose (tempo 0 = momento da administração de glicose 2g/kg) de fêmeas controle e SOCS3 KO não grávidas (A) e grávidas (B). Resultado global da área sob a curva (C) (n=10-16 animais/grupo).	75
Figura 30 - Secreção de insulina (ng/mL) após administração de glicose (tempo 0 = momento da administração de glicose 2g/kg) em fêmeas grávidas controle e SOCS3 KO (n=6 animais/grupo).	76
Figura 31 - Testes de tolerância à insulina (tempo 0 = momento da administração de insulina 1 U/kg) de fêmeas controle e SOCS3 KO não grávidas (A) e grávidas (B). Resultado global da área sob a curva (C) (n=10-16 animais/grupo).	77
Figura 32 - Expressão hipotalâmica de genes importantes na sinalização central de insulina (n=8 animais/grupo).	78

Figura 33 - Expressão proteica hepática de pIR (B) e pAKT (C) após administração subcutânea de insulina em fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (n=4 animais/grupo).	78
Figura 34 - Expressão proteica no tecido muscular esquelético de pIR (B) e pAKT (C) após administração subcutânea de insulina em fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (n=4 animais/grupo).	79
Figura 35 - Concentração de glicose circulante (mg/dL) de fêmeas controle e SOCS3 KO não grávidas 8 dias após o tratamento com STZ (200 mg/kg) (A) e acompanhamento longitudinal da glicemia após o tratamento com STZ (B); Testes de tolerância à glicose (tempo 0 = momento da administração de glicose 0,5g/kg) de fêmeas controle e SOCS3 KO não grávidas tratadas com STZ (C) e resultado da área sob a curva (AUC) (D).	80
Figura 36 - Acompanhamento longitudinal da glicemia (A), concentração de insulina circulante (ng/mL) (B), testes de tolerância à glicose (tempo 0 = momento da administração de glicose 0,5g/kg) (C) e respectivo cálculo de área sob a curva (AUC) (D) de fêmeas controle e SOCS3 KO tratadas com STZ (200 mg/kg) no 5º dia de gestação (n=8-20 animais/grupo).	80
Figura 37 - número de embriões e reabsorções embrionárias observados no 16º dia de gestação de fêmeas controle e SOCS3 KO submetidas a infusão crônica de leptina (a partir do 5º dia de gestação) (A) ou tratadas com STZ (200 mg/kg no 5º dia de gestação) (B).	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição corporal de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas com infusão crônica de leptina. Adiposidade (g) dos diferentes depósitos de gordura: peri-uterino, peri-ovariano e retroperitoneal (RP) (n=12 animais/grupo).....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgRP - peptídeo relacionado ao agouti
AKT – proteína cinase B (PKB)
ARH - núcleo arqueado do hipotálamo
CART - transcrito regulado por cocaína e anfetamina
DMG - diabetes mellitus gestacional
DMH - núcleo dorso-medial do hipotálamo
DM2 - diabetes mellitus tipo 2
DNA - ácido desoxirribonucleico
GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GPGE - ganho de peso gestacional excessivo
JAK2 - Janus cinase 2
Kir6.1/ABCC8 - potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8
Kir6.2/ABCC9 - potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 9
LepR - receptor da leptina
LHA - área hipotalâmica lateral
MC3/4R - receptores de melanocortina 3/4
MPA - área pré-óptica medial
NPY - neuropeptídeo Y
NTS - núcleo do trato solitário
pAKT - proteína cinase B fosforilada
PBS - tampão fosfato salino
PCK θ - proteína cinase C theta
PIAS - proteínas inibidoras de ativação de STAT-ativada
pIR - receptor de insulina fosforilado
PKC δ - proteína cinase C delta
PMV - núcleo pré-mamilar ventral
POMC - pró-opiomelanocorticotropina
Ppia - ciclofilina A
PT1B - proteína tirosina fosfatase 1B
PTPN11 - Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
PTPN2 - Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2
PTPR ϵ - proteína tirosina fosfatase epsilon
RNA - ácido ribonucléico
RNA_m - ácido ribonucleico mensageiro
RP - retroperitoneal
sc - subcutânea
SH2B1 - SH2B adapter protein 1
SOCS1 - supressores de sinalização de citocinas 1
SOCS3 - supressores de sinalização de citocinas 3
STAT3 - sinal de transdução e ativador de transcrição 3
STZ - estreptozotocina
SUR1/KCNJ8 - receptor de sulfoniluréia 1
SUR2/KCNJ11 - receptor de sulfoniluréia 2
TTG - teste de tolerância à glicose

TTI - teste de tolerância à insulina

UA - unidades arbitrárias

VMH - núcleo ventro-medial do hipotálamo

α -MSH - alfa hormônio estimulador de melanócitos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Contexto atual	21
2.2 Alterações metabólicas durante a gestação	22
2.3 Leptina	24
2.4 Sinalização da leptina no SNC	24
2.5 Resistência à leptina durante a gestação	26
2.6 Mecanismos intracelulares de regulação da sinalização da leptina	28
2.7 SOCS3 e resistência à leptina	30
2.8 SOCS3 e insulina	32
3 OBJETIVOS	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Determinação de genes que podem influenciar a sensibilidade central à leptina durante a gestação	35
4.2 Produção dos animais com deleção condicional do SOCS3	35
4.3 Validação da deleção condicional do SOCS3	36
4.4 Sistema de acasalamento	37
4.5 Comprovação da deleção condicional do SOCS3 e ausência de mecanismos compensatórios durante a gestação	38
4.5.a Expressão de SOCS3 em fêmeas grávidas SOCS3 KO	38
4.5.b Expressão de genes envolvidos na sensibilidade à leptina durante a gestação	38
4.5.c Expressão proteica de SOCS3 e pSTAT3 após administração de leptina em fêmeas grávidas	39
4.6 Alterações no balanço energético durante e após a gestação	39
4.6.a Consumo alimentar e peso corporal	39
4.6.b Determinação da adiposidade	40
4.6.c Balanço energético de fêmeas privadas da lactação	40
4.6.d Expressão de genes envolvidos no balanço energético	41
4.7 Índices reprodutivos e acompanhamento de peso da prole	41
4.8 Determinação da sensibilidade à leptina durante a gestação	42
4.8.a Leptina circulante	42
4.8.b Ensaio crônico de sensibilidade à leptina	42
4.8.c Determinação da sensibilidade à leptina em áreas específicas do cérebro	42
4.9 Determinação da homeostase glicêmica durante a gestação	44
4.9.a Insulina e glucagon circulante	44
4.9.b Teste de tolerância à glicose	44
4.9.c Teste de tolerância à insulina	45

4.9.d Controle glicêmico hipotalâmico	45
4.9.e Ativação das vias de sinalização da insulina no fígado e músculo esquelético	45
4.10 Protocolo de indução do diabetes gestacional	46
4.11 Genotipagem	46
4.11.a Extração de DNA genômico	47
4.11.b Reação em cadeia da polimerase (PCR)	47
4.11.c Eletroforese	48
4.12 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real	49
4.12.a Extração de RNA total	49
4.12.b Transcrição Reversa	49
4.12.c Escolha do gene constitutivo	50
4.12.d Expressão gênica por PCR em tempo real	50
4.13 Western Blot	51
4.13.a Extração de proteínas	51
4.13.b Eletroforese e transferência	52
4.14 Imunohistoquímica.....	52
4.15 Fluxograma	53
4.16 Forma de análise dos resultados.....	53
5 RESULTADOS.....	54
5.1 Determinação dos genes que podem influenciar a resistência à leptina durante a gestação.....	54
5.2 Validação da deleção condicional do SOCS3.....	54
5.3 Comprovação da deleção condicional do SOCS3 e ausência de mecanismos compensatórios durante a gestação	56
5.3.a Expressão de SOCS3 em fêmeas grávidas SOCS3 KO	56
5.3.b Expressão de genes envolvidos na sensibilidade à leptina durante a gestação ...	57
5.3.c Expressão proteica de SOCS3 e pSTAT3 após administração de leptina em fêmeas grávidas	57
5.4 Alterações no balanço energético durante a gestação e lactação	59
5.4.a Consumo alimentar e peso corporal.....	59
5.4.b Determinação da adiposidade.....	61
5.4.c Balanço energético de fêmeas privadas da lactação	63
5.4.d Expressão de genes envolvidos no balanço energético.....	63
5.5 Índices reprodutivos e acompanhamento de peso da prole	66
5.6 Determinação da sensibilidade à leptina durante a gestação	68
5.6.a Leptina circulante	68
5.6.b. Ensaio crônico de sensibilidade a leptina durante a gravidez	69
5.6.c Determinação da sensibilidade à leptina em áreas específicas do cérebro	72
5.7 Determinação da homeostase glicêmica durante a gestação.....	74
5.7.a Insulina e glucagon circulante	74
5.7.b Teste de tolerância à glicose.....	74
5.7.c Teste de tolerância à insulina	76
5.7.d Controle glicêmico hipotalâmico.....	77
5.7.e Sinalização de insulina no fígado e músculo esquelético.....	78

5.8 Paradigma do diabetes gestacional.....	79
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÕES	101
8 ATIVIDADES COMPLEMENTARES	102
REFERÊNCIAS.....	103
ANEXOS	122
A - Primers utilizados para determinação de expressão gênica por PCR em tempo real.....	122
B - Anticorpos utilizados no Western blot ou imunohistoquímica.....	123
C - ZAMPIERI, THAIS T., RAMOS-LOBO, ÂNGELA, FURIGO, ISADORA C., PEDROSO, JOÃO A. B., BUONFIGLIO, DANIELLA, C., DONATO, JOSÉ JR. 2014. SOCS3 effects on leptin receptor-expressing cells orchestrate metabolic changes during pregnancy. Molecular Metabolism, 4 (3): 237-245.....	124

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um embrião e subsequente feto impõe exigências de energia adicionais para a mulher grávida. Por conseguinte, um aumento da ingestão alimentar é esperado durante a gestação (LADYMAN et al., 2010). No entanto, o balanço energético positivo produzido durante a gravidez normalmente excede a demanda de energia necessária para o desenvolvimento da prole, resultando no acúmulo de gordura excessiva (SARWER et al., 2006). Além disso, a gravidez é caracterizada por alterações na homeostase glicêmica, que leva a um estado transitório de resistência à insulina (NORMAN; REYNOLDS, 2011). Acredita-se que essas adaptações metabólicas foram moldadas durante a evolução para garantir melhores condições para o desenvolvimento do feto e para suprir as exigências de energia da gestação e lactação (LADYMAN et al., 2010).

No entanto, atualmente estamos expostos a um ambiente obesogênico, onde um número crescente de mulheres são obesas no momento da concepção ou vão apresentar ganho de peso excessivo durante a gestação (NORMAN; REYNOLDS, 2011). Essas condições podem levar a complicações graves que têm impacto negativo sobre a saúde das mulheres e sua prole (SARWER et al., 2006). O ganho de peso gestacional excessivo (GPGE) aumenta o risco de mortalidade materna, diabetes mellitus gestacional (DMG), pré-eclampsia, tromboembolismo, hemorragia pós-parto e outras complicações gestacionais (NORMAN; REYNOLDS, 2011). É importante ressaltar que a gravidez representa um dos principais fatores de risco para a obesidade em mulheres (NEHRING et al., 2011). Para a prole, alterações metabólicas durante a gestação podem levar a programação metabólica, aumentando o risco de obesidade, diabetes mellitus, hipertensão e outras doenças na idade adulta (HANLEY et al., 2010).

Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que desencadeiam as alterações metabólicas que ocorrem durante a gravidez não só poderia explicar um fenômeno pouco conhecido na fisiologia das mulheres, mas também pode revelar abordagens terapêuticas para a prevenção e tratamento de doenças metabólicas durante a gestação.

Dentre os eventos propostos que poderiam explicar a predisposição ao ganho de peso e resistência à insulina durante a gestação é o aparecimento de resistência à leptina (LADYMAN et al., 2010). Vários autores têm mostrado menor resposta à ação da leptina no hipotálamo de animais prenhes (LADYMAN; GRATTAN, 2005; LADYMAN et al, 2012; NAGAISHI et al, 2014.). A diminuição da sensibilidade à leptina é mais aparente na segunda metade da gestação, que representa o período da gestação em que as mulheres apresentam a maior taxa de ganho de peso e resistência à insulina (AUGUSTINE et al, 2008; LADYMAN et al, 2009; SARWER et al ., 2006). Contudo, os mecanismos responsáveis por orquestrar as mudanças metabólicas observadas durante a gravidez permanecem desconhecidos.

Neste trabalho, foram investigados potenciais genes que estão relacionados com a resistência à leptina e mostram aumento da expressão hipotalâmica durante a gravidez, o que sugere uma possível participação nas alterações metabólicas observadas nesse período. Posteriormente, foram produzidos camundongos deficientes deste gene (SOCS3) apenas em células que expressam o receptor da leptina (LepR), e avaliamos suas alterações metabólicas durante a gravidez. Nosso objetivo foi identificar os mecanismos moleculares fundamentais necessários para as alterações metabólicas observadas durante a gravidez.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contexto atual

Mais de 500 milhões de pessoas são obesas no mundo. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (VIGITEL Brasil, 2013), cerca de 17,5% da população adulta é obesa e 50,8% está acima do peso. Entre os anos de 2006 e 2013, os casos de sobrepeso e obesidade aumentaram entre brasileiros. Nesse sentido, o sobrepeso passou de 42,7% para 48,1%, enquanto que a obesidade aumentou de 11,4% para 15,0%.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a obesidade está listada dentre os 10 fatores de risco mais importantes à saúde global. Além dos problemas evidentes que o acúmulo excessivo de gordura corporal promove, como problemas ortopédicos, esteatose hepática e distúrbios psicológicos, a obesidade tem sido associada a maior predisposição ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (infarto, trombose, embolia, arteriosclerose e hipertensão), diabetes mellitus, alterações respiratórias (asma, apneia do sono) e até alguns tipos de câncer.

Dentre os diversos fatores que predispõem a obesidade, que incluem o envelhecimento, a alimentação com alto teor de gordura e o sedentarismo, a gestação tem sido indicada como um importante fator de risco para o desenvolvimento da obesidade na população feminina (SCHMITT; NICHOLSON; SCHMITT, 2007). De fato, inúmeros estudos encontraram evidências de que o ganho de peso excessivo durante a gestação está relacionado à maior retenção de peso pós-parto em curto e longo prazo (KAC et al., 2004; LINNE et al., 2004; ROONEY; SCHAUBERGER, 2002; VESCO et al., 2009). Em estudos de meta-análise, NEHRING et al. (2011) avaliaram a manutenção do peso corporal até 15 anos após o parto, e verificaram que mulheres cujo ganho de peso durante a gestação foi acima da recomendação, apresentam em média 5 kg a mais de peso corporal que mulheres que apresentaram ganho de peso dentro dos limites recomendados. Este valor é ainda mais expressivo quando apresentado em percentual, revelando que a predisposição a desenvolver obesidade é 4,5 vezes maior em mulheres que ganharam peso em excesso durante a gestação (MAMUN et al., 2010). Nestes estudos foi comprovado que o ganho de peso excessivo durante a gestação tem

relação direta com a manutenção do excesso de peso pós-parto e ao índice de massa corpórea décadas após a gestação, contribuindo com o desenvolvimento da obesidade em mulheres.

Além da maior predisposição à obesidade, o aumento excessivo do índice de massa corpórea materno está fortemente associado a complicações durante a gestação. Atualmente, a obesidade é considerada o fator de risco mais comum na prática obstétrica (KRISHNAMOORTHY; SCHRAM; HILL, 2006), uma vez que inúmeras mulheres iniciam a gestação já acima do peso e outras, em peso ideal, apresentam ganho de peso excessivo. No Brasil, são 47,7% de mulheres em idade reprodutiva com sobrepeso e 17,5% com obesidade, representando uma parcela significativa da população que merece atenção especial (VIGITEL Brasil, 2013).

Dentre as complicações frequentemente observadas com o excesso de peso durante a gestação estão: risco aumentado de mortalidade materna; tromboembolismo; hipertensão; pré-eclâmpsia; hemorragia pós-parto e diabetes gestacional (NORMAN; REYNOLDS, 2011; NUCCI et al., 2001). Existem inúmeros estudos correlacionando o excesso de peso e à ocorrência destes complicadores, a exemplo do tromboembolismo que dobra a prevalência em gestantes obesas (SEBIRE et al., 2001). A pré-eclâmpsia, também associada à hipertensão gestacional (4% dos casos; MARTIN 2009), aparece em 35% de todas as gestantes obesas (KABIRU; RAYNOR, 2004) e a probabilidade de sua ocorrência aumenta conforme o peso corporal (O'BRIEN; RAY; CHAN, 2003). O DMG possivelmente seja a complicação mais importante relacionada à obesidade, e ocorre em cerca de 5% de todas as gestações (GABBE; GRAVES, 2003; MARTIN, 2009). Trabalhos com diferentes populações e regiões mostraram que mulheres obesas têm aproximadamente 4 vezes mais chances de desenvolver o DMG, que mulheres com peso adequado (SEBIRE et al., 2001; WEISS et al., 2004), e que a probabilidade de sua ocorrência aumenta junto com o índice de massa corporal, podendo chegar até 15% em mulheres obesas (RODE et al., 2005).

2.2 Alterações metabólicas durante a gestação

Mesmo em mulheres que mantém o ganho de peso dentro das recomendações, é observado aumento de peso e do consumo alimentar durante a gestação. Estas

alterações adaptativas na homeostase do peso corporal materno se dão por mudanças hormonais associadas à gravidez (AUGUSTINE; LADYMAN; GRATTAN, 2008; GRATTAN; LADYMAN; AUGUSTINE, 2007; LADYMAN; AUGUSTINE; GRATTAN, 2010). Já no início da gestação há aumento no consumo alimentar (GRATTAN et al., 2008), sendo a prolactina um dos hormônios possivelmente responsáveis por desencadear as alterações dos mecanismos de metabolismo energético durante o início da gestação (CHEN; SMITH, 2004), e o lactogênio placentário durante estágios avançados (JOHNSTONE; HIGUCHI, 2001; WADE; SCHNEIDER, 1992).

O apetite e o consumo alimentar aumentados durante a gestação ocorrem devido a alterações dos mecanismos centrais que controlam o balanço energético (GRATTAN; LADYMAN; AUGUSTINE, 2007; LADYMAN, 2008). Acredita-se que essas alterações metabólicas visam suprir a demanda energética/nutricional para o desenvolvimento/crescimento fetal e armazenamento de energia, que poderá ser utilizado durante a lactação. O aumento do consumo alimentar e consequente ganho de peso, vêm acompanhados pelo aumento tanto da insulina quanto da leptina circulante, caracterizando um quadro de resistência à insulina e à leptina que se desenvolve de modo transitório durante a gestação (LADYMAN; GRATTAN, 2004; RYAN; O'SULLIVAN; SKYLER, 1985). A resistência à insulina é importante para garantir disponibilidade de glicose para o embrião/feto (BELL; BAUMAN, 1997). No entanto, a resistência à insulina pode evoluir para o DMG (KING, 2006). Uma vez que a gestação representa um desafio à fisiologia da mulher, o desenvolvimento do DMG equivale a uma predição ao diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Já foi demonstrado que o DM2 é observado em 30% das gestantes que apresentaram DMG, contudo se esta mulher é obesa o percentual sobe para 70% dos casos (O'SULLIVAN, 1989). Deste modo, além do conhecimento acerca dos fatores causadores das alterações metabólicas, a gestação pode ser considerada um interessante modelo para o estudo do DM2.

A resistência à leptina que se desenvolve durante a gestação é importante para garantir maior consumo alimentar e, consequentemente, aumentar a deposição de gordura como forma de reserva energética para o crescimento fetal e subsequente lactação. Contudo, o consumo alimentar durante o período gestacional frequentemente excede as necessidades exigidas para o desenvolvimento/crescimento fetal e,

consequentemente, pode acarretar no excesso de ganho de peso em 44% das gestações (SCHIEVE; COGSWELL; SCANLON, 1998). Assim, essas gestantes ultrapassam o ganho de peso recomendado, promovendo aumento do peso corporal e tornando a gestação um fator de risco bastante relevante para o desenvolvimento da obesidade (SARWER et al., 2006). Neste sentido, a gestação pode também ser considerada um modelo importante no estudo da obesidade.

2.3 Leptina

O sistema regulatório do consumo alimentar, localizado primordialmente no hipotálamo, necessita de informação aferente sobre a condição nutricional do corpo e níveis do estoque de energia para controlar o apetite. Esta informação aferente se dá, principalmente, por meio da leptina, um hormônio produzido nos adipócitos, componente integral do complexo sistema fisiológico que regula o armazenamento, equilíbrio e utilização de energia pelo organismo (SCHWARTZ et al., 2000).

Após sua descoberta (ZHANG, 1994), a leptina e os mecanismos envolvidos em sua sinalização têm sido amplamente estudados para que possamos melhor compreender as alterações no padrão alimentar observadas nos casos de obesidade e gestação. Além de seu envolvimento no balanço energético, a leptina tem sido amplamente indicada como o fator de convergência entre o metabolismo corpóreo e o sistema reprodutivo (DONATO et al., 2011a), sendo envolvida na sinalização para a puberdade (DONATO et al., 2009, 2011b; DONATO; ELIAS, 2011).

A leptina é produzida em grande parte pelo tecido adiposo branco e é secretada de acordo com a proporção de tecido adiposo depositado no corpo (CONSIDINE et al., 1996). Deste modo, oscilações na massa gorda promovem mudanças na concentração plasmática de leptina (MAFFEI et al., 1995).

2.4 Sinalização da leptina no SNC

O efeito da leptina é de promover redução do consumo alimentar e do peso corpóreo, além de aumentar o gasto energético (AHIMA; FLIER, 2000; FRIEDMAN; HALAAS, 1998). O hipotálamo apresenta um complexo circuito neural de regulação do balanço energético, na qual a leptina tem atuação significativa. Mais especificamente,

as regiões basomediais do hipotálamo, classicamente implicadas na regulação do comportamento alimentar (núcleos arqueado, ventromedial e área hipotalâmica lateral), contêm as maiores concentrações do receptor de leptina no cérebro (ELMQUIST et al., 1998; HAKANSSON et al., 1998; MERCER et al., 1996; SCHWARTZ et al., 1996, 2000).

A isoforma de seu receptor mais envolvida na regulação do peso corporal é o de forma longa (Ob-Rb ou LepR), que possui o domínio intracelular capaz de transmitir o sinal transducional completo da ligação da leptina (TARTAGLIA et al., 1995; TARTAGLIA, 1997; VAISSE et al., 1996). O LepR faz parte da família de receptores classe I de citocinas, que após sua ligação com a leptina ativa o sistema JAK/STAT de transdução (TARTAGLIA, 1997; TOUW et al., 2000).

A ligação com a leptina resulta no recrutamento do Janus cinase 2 (JAK2) que se associa de forma não covalente ao LepR e induz a fosforilação de resíduos específicos de tirosina do domínio intracelular do LepR. A fosforilação do resíduo Tyr1138 recruta o sinal de transdução e ativador de transcrição 3 (STAT3) que, uma vez fosforilado, dimeriza e é translocado para o núcleo onde combina-se com sequências promotoras do DNA e medeia a regulação da transcrição de genes alvos (LEONARD; O'SHEA, 1998). Esta etapa é crucial para a ação da leptina sobre o consumo alimentar e gasto energético (BATES et al., 2003; CUI et al., 2004). O resíduo Tyr985 é conhecido por ser um sítio de recrutamento e ativação de SRC homolog-2 (SHP-2), quando fosforilado, e leva à ativação da cinase regulada extracelularmente (ERK) e c-Fos (MUNZBERG; MYERS, 2005). A ação da leptina também envolve fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) e consequente ativação de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K), o que resulta na fosforilação de proteínas cinase B (PKB ou AKT) (MORRISON et al., 2005; MORTON et al., 2005; XU et al., 2005). A ativação de PI3-K também demonstrou-se ser necessária para os efeitos agudos da leptina, como a redução de consumo alimentar e mudanças no potencial de membrana (DONATO; FRAZÃO; ELIAS, 2010; WILLIAMS et al., 2011).

A interação da leptina com seu receptor se dá em neurônios produtores de neuropeptídeos e neurotransmissores que aumentam (orexígenos) ou diminuem (anorexígenos) a ingestão alimentar. O aumento da leptina plasmática promove

supressão da atividade de neurônios que co-expressam o neuropeptídeo Y, o peptídeo relacionado ao agouti (NPY/AgRP) e o ácido γ -aminobutírico (GABA). Esses neurônios atuam estimulando a ingestão alimentar. De maneira oposta, o aumento da leptina plasmática estimula a atividade de neurônios produtores de pró-opiomelanocorticotropina (POMC) e do transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) que possuem efeitos anorexígenos (SCHWARTZ et al., 2000). Os neurônios produtores de POMC têm efeito anorexígeno, pois a clivagem proteica de POMC produz o hormônio estimulador de melanócitos alfa (α -MSH), que ao se ligar aos receptores de melanocortina (MC3/4), causa redução no consumo alimentar. Já o AGRP funciona como antagonista endógeno de MC4R, bloqueando o efeito anorexígeno de α -MSH (ELMQUIST et al., 2005).

2.5 Resistência à leptina durante a gestação

A gestação é caracterizada por um quadro de resistência à leptina, que é caracterizado pelo aumento do apetite, consumo alimentar e ganho de peso associado ao aumento de leptina plasmática (GRATTAN; LADYMAN; AUGUSTINE, 2007; LADYMAN; GRATTAN, 2004, 2005; MOUNZIH et al., 1998). Outros autores ainda associaram o período de gestação ao aumento da expressão dos peptídeos orexígenos NPY e AGRP (GARCIA et al., 2003; ROCHA et al., 2003; TRUJILLO et al., 2011) e diminuição de α -MSH e POMC (KHORRAM; DEPALATIS; MCCANN, 1984; TRUJILLO et al., 2011), como sendo alterações que poderiam contribuir com o aumento do consumo alimentar e peso corporal das gestantes.

Ainda, alguns autores mostraram que uma razão para o desenvolvimento da resistência à leptina gestacional seria um transporte menos efetivo da leptina entre o plasma e o fluido cefalorraquidiano pela barreira hemato-encefálica (TRUJILLO, 2011). Sustentando uma hipótese similar ao observado no quadro de obesidade em que é afirmado que resistência à leptina deva ser causada pelo déficit no transporte de leptina pela barreira hemato-encefálica (BANKS, 2008). Por outro lado, estudo recente de LI et al. (2013) demonstrou que a deleção específica do receptor de leptina envolvido neste transporte pela barreira hemato-encefálica (Ob-Ra), não contribui de forma significativa com o desenvolvimento de resistência à leptina ou aumento do peso corporal,

sugerindo que o transporte pela barreira hemato-encefálica via Ob-Ra tem uma importância reduzida no controle do metabolismo

Uma das hipóteses para a causa da obesidade, é o desenvolvimento da resistência à leptina periférica, quando ocorre dificuldade do transporte de leptina pela barreira hemato-encefálica, seguido da resistência central que é a ineficiência do LepR em conduzir o sinal promovido pela leptina (EL RASCHIMI et al., 2000). Portanto, durante o período de gestação podemos assumir que as duas possibilidades são válidas.

Estudos de GARCIA et al. (2000) mostraram que durante a gestação o aumento de leptina plasmática está associado a uma redução na expressão do LepR no hipotálamo, o que poderia contribuir com o desenvolvimento do quadro de resistência à leptina, caracterizando um quadro de resistência à leptina central durante a gestação. Adicionalmente, LADYMAN e GRATTAN (2005) observaram diminuição na expressão de LepR especificamente no VMH de fêmeas ao longo do período gestacional, que foi acompanhado por menor fosforilação de STAT3 induzida por leptina especificamente nesta região hipotalâmica (GRATTAN; LADYMAN; AUGUSTINE, 2007; LADYMAN; FIELDWICK; GRATTAN, 2012). Estes autores apontam que a causa do aumento consumo alimentar e ganho de peso gestacional seja decorrente do surgimento de uma resistência à sinalização da leptina a nível hipotalâmico, mais especificamente no VMH. O mesmo grupo de pesquisa indica que as alterações hormonais decorrentes da gestação responsáveis por desencadear o quadro de resistência à leptina incluem a exposição ao lactogênio placentário e à prolactina (AUGUSTINE; GRATTAN, 2008). Estudos de NAGAISHI et al. (2014) demonstraram que realmente existe interação entre a prolactina e leptina, visto que algumas populações de neurônios hipotalâmicos respondem simultaneamente a esses hormônios, indicando uma potencial influência da prolactina na sinalização hipotalâmica da leptina.

Por outro lado, existem estudos que mesmo ocorrendo o aumento da leptina plasmática de gestantes, não observaram alteração da expressão gênica ou protéica do LepR no hipotálamo (SEEBER et al., 2002). Sendo assim, alta concentração de leptina circulante e manutenção da expressão de receptores, associada às alterações na sinalização peptidérgica do balanço energético, sugerem que deva haver modificações no sinal transducional do LepR durante a gestação. Realmente, outros estudos

apontam que durante a gestação ocorre o aumento da expressão de proteínas supressoras da sinalização de citocinas (ANDERSON et al., 2006; TANG; CUI; WANG, 2008; TRUJILLO et al., 2011), que atuam como importante mediador da retroalimentação negativa da sinalização da leptina, que será melhor abordado mais adiante.

2.6 Mecanismos intracelulares de regulação da sinalização da leptina

Inúmeros mecanismos intracelulares de regulação podem alterar a sinalização leptina-JAK/STAT. Para controle positivo da sinalização da leptina, um componente importante da regulação da ativação do LepR é a SHP2 (*tyrosine phosphatase containing Src Homology 2 domains* ou PTPN11). A SHP2 é um intermediário importante na sinalização de MAPK e ERK por combinar com o resíduo Tyr985 do LepR (BANKS et al., 2000; BJORBAEK et al., 2001). Ao se combinar com o resíduo Tyr985, a SHP2 promove a ligação de GRB-2 ao resíduo de tirosina fosforilado, que é necessário para grande parte da ativação de ERK durante a sinalização do LepR, sendo a ativação de ERK importante para mediar o acúmulo de RNAm de c-Fos (BANKS et al., 2000). Foi demonstrado em modelos animais que a deleção de SHP2 no prosencéfalo causa obesidade por acumular mais gordura devido à redução do gasto energético acompanhado por aumento de leptina e glicose sérica (ZHANG et al., 2004). O mesmo foi observado quando a deleção de SHP2 acontece de forma neuronal (KRAJEWASKA et al., 2008), apontando o SHP2 como um importante fator para o controle positivo da sensibilidade à leptina.

Adicionalmente, temos o SH2B1 (*Src homology 2 B adaptor protein 1*) que também funciona como um regulador positivo do LepR por estimular diretamente a atividade cinase de JAK2 (NISH et al., 2005). Existe a hipótese que o SH2B1 funciona como potencializador da sinalização de JAK2 por se combinar ao resíduo Tyr813 causando mudanças conformacionais que mantém o JAK2 em seu estado ativo (MAURES; KURZER; CARTER-SU, 2006). REN et. al. (2005) demonstraram em modelos knockout, que a deleção de SH2B1 resultava em severa resistência à leptina e obesidade, indicando o SH2B1 como um regulador positivo endógeno da sensibilidade à leptina. Mais tarde o mesmo grupo revelou que a sinalização do SH2B1 em LepR se

dá pela combinação da porção SH2 ao resíduo Tyr813 fosforilado, aumentando a atividade de JAK2 induzida pela leptina (LI et al, 2007).

Para controle negativo da sinalização da leptina, temos a proteína tirosina fosfatase 1B (PT1B), que possui efeito negativo por diminuir a fosforilação de JAK2 e consequentemente diminuir a sinalização promovida pela leptina (ZABOLOTNY et al., 2002). Inúmeros experimentos com deleção completa ou condicional de PTP1B mostram que a ausência desta proteína tem forte impacto no balanço energético e glicolítico, por diminuir o peso e composição corporal, aumentar a sensibilidade à leptina e insulina (BANNO et al., 2010; BENCE et al., 2006; ELCHBLY et al., 1999; KLAMAN et al., 2000; TSOU et al., 2012). Foi demonstrado que esta ação do PTP1B se dá pela desfosforilação o resíduo Tyr1007/1008 de JAK2 (MYERS et al., 2001).

A proteína tirosina fosfatase de células-T (TCPTP ou PTPN2) é uma PTP expressa ubiquamente e possui grande homologia estrutural com a PTP1B, também funcionando como um regulador negativo da sinalização da leptina. Realmente foi demonstrado que a deleção neuronal de PTPN2 causa um fenótipo metabólico importante, evidente com o aumento da sensibilidade à leptina e resistência ao desenvolvimento de obesidade induzida por dieta (LOH et al., 2011). Os mesmos autores ainda sugerem que a regulação negativa do PTPN2 na sensibilidade à leptina se faz pela desfosforilação do STAT3 no hipotálamo.

O receptor-type protein tyrosine phosphatase épsilon (PTPRE) funciona como outro regulador negativo da sinalização da leptina por se combinar ao resíduo Tyr695 de JAK2 aumentando a desfosforilação de JAK2 (ROUSSO-NOORI et al., 2011; TANUMA et al., 2000). ROUSSO-NOORI et al. (2011) mostraram que a deleção de PTPRE (e de sua forma solúvel) foi capaz de prevenir o ganho de peso e acúmulo de gordura induzido por dieta apenas em fêmeas por garantir maior gasto energético associado ao aumento da sensibilidade à leptina.

Dentre os mecanismos envolvidos no controle da sinalização da leptina, têm destaque os membros da família dos supressores de sinalização de citocinas (SOCS) para controle negativo da sinalização no hipotálamo. Os SOCS são estabelecidos como reguladores negativos da sinalização de citocinas via inibição da transdução do sinal JAK/STAT (YASUKAWA et al., 1999).

Em condição basal, os SOCS são expressos em um limiar relativamente baixo, mas quando estimulados por citocinas têm sua expressão fortemente aumentada (NAKA et al., 1997). No hipotálamo, após ligação da leptina ao seu receptor e ativação JAK/STAT, um dos genes alvo de regulação da transcrição é o SOCS3 (BJORBAEK et al., 1998). A regulação de feedback negativo promovida pelo SOCS na atividade das citocinas ocorre por interferir na sinalização do receptor por se combinar aos resíduos tirosina no domínio intracelular (KREBS; HILTON, 2003). Foi demonstrado que o SOCS3 tem papel importante na inibição da sinalização do LepR (BANKS et al., 2000) por: inibir a fosforilação de JAK2 e Tyr1138; combinar com o resíduo Tyr985 e gerar efeito inibitório; recrutar o sistema ubiquitina-transferase (BJORBAEK et al., 1999; DUNN et al., 2005; ZHANG et al., 1999).

2.7 SOCS3 e resistência à leptina

Uma vez que a expressão de SOCS3 encontra-se aumentada tanto no hipotálamo, quanto em tecidos periféricos de modelos de obesidade induzida por alimentação rica em gordura ou mesmo a obesidade associada à idade avançada, foi proposto que o SOCS3 seja o possível mediador da resistência à leptina (BJORBAEK et al., 1998, 1999; WANG et al., 2000, 2001). Neste quadro, o núcleo arqueado do hipotálamo foi descrito como região importante associada ao desenvolvimento da resistência à leptina induzida por dieta rica em gordura (MUNZBERG; FLIER; BJORBAEK, 2004).

Para estudar os mecanismos envolvidos na resistência à leptina, a ciência lança mão do advento de modelos experimentais geneticamente modificados. No entanto, para o estudo específico de SOCS3 há uma limitação drástica, pois a deleção em homozigose de SOCS3 (SOCS^{-/-}) é letal, e os animais não conseguem prosseguir no desenvolvimento embrionário (MARINE et al., 1999; ROBERTS et al., 2001).

No entanto, a participação de SOCS3 na resistência à leptina tem sido investigada utilizando-se o modelo de animais heterozigotos – SOCS3^{+/-} (HOWARD et al., 2004) e mais recentemente, na qual a deleção de SOCS3 acontece de modo tecido-específico, por exemplo, restrito a células neurais – Nes/Syn^{Cre}SOCS3^{flox/flox} (MORI et al., 2004), somente a células que expressam POMC – POMC^{Cre}SOCS3^{flox/flox} (KIEVIT et

al., 2006) ou ainda em uma região específica do SNC (VMH) – SF1^{Cre}SOCS3^{flox/flox} (ZHANG et al., 2008).

Animais SOCS3^{+/-} e Nes/Syn^{Cre}SOCS3^{flox/flox} são menos propensos a desenvolver obesidade e resistência à insulina induzidas por dieta rica em gordura e maior resposta de sinalização do LepR (HOWARD et al., 2004; MORI et al., 2004). Animais POMC^{Cre}SOCS3^{flox/flox} também são mais sensíveis à leptina, resistentes a deposição de gordura no fígado e possuem maior controle de sua glicemia (KIEVIT et al., 2006). Animais SF1^{Cre}SOCS3^{flox/flox} apresentam maior sensibilidade à leptina e melhora na homeostase glicêmica, com menor consumo alimentar mesmo quando expostos à dieta rica em gordura.

Em condição normal, a administração de leptina promove aumento transitório de STAT3 fosforilada e aumento da expressão de RNAm de POMC. Em animais Nes/Syn^{Cre}SOCS3^{flox/flox}, tanto a quantidade de STAT3 fosforilada quanto a expressão de RNAm de POMC perduram além do tempo observado em animais controle, com isso ocorre maior elevação na expressão de POMC (MORI et al., 2004). De mesma forma animais SF1^{Cre}SOCS3^{flox/flox} também apresentaram maior quantidade de STAT3 fosforilada após administração exógena de leptina (ZHANG et al., 2008). Estes resultados demonstram que o SOCS3 funciona como regulador negativo da sinalização de STAT3 no hipotálamo *in vivo*.

A partir destes estudos foi sugerido que os níveis de SOCS3 têm um papel fundamental na influência de dietas hiperlipídicas na sensibilidade da leptina, efeito este atribuído em grande parte por sua atuação no sistema nervoso central (SNC) (HOWARD et al., 2004; KIEVIT et al., 2006; MORI et al., 2004; MUNZBERG; FLIER; BJORBAEK, 2004).

Sabe-se que durante a gestação, a resistência à leptina vem acompanhada por aumento da expressão de RNAm de SOCS3 no hipotálamo (ANDERSON et al., 2006; TANG; CUI; WANG, 2008). Ainda, a expressão de RNAm de SOCS3 permanece elevada durante a lactação (ANDERSON et al., 2006). Porém, a maioria das investigações a respeito do papel do SOCS3 na resistência à leptina foram realizadas em modelos de obesidade induzido por dieta. Pouco se sabe a respeito do papel do SOCS3 e dos mecanismos moleculares que ocorrem durante a gestação.

2.8 SOCS3 e insulina

A literatura descreve a resistência à leptina como fator associado à obesidade (EL-HASCHIMI et al., 2000; SCARPACE; MATHENY; TUMER, 2001). Interessante ressaltar que existe uma interação significativa entre leptina e insulina no hipotálamo, para regulação da sensibilidade a insulina periférica e glicose sanguínea (HOWARD; FLIER, 2006). Assim, é plausível sugerir que durante a gestação a resistência à leptina e à insulina compartilham causas em comum, já que as vias de sinalização intracelular da leptina e insulina em neurônios hipotalâmicos apresentam convergência, ao menos parcial (DONATO JR. Et al., 2010; HILL et al., 2008; NISWENDER et al., 2001; XU et al., 2005).

O SOCS3 também diminui a sinalização do receptor de insulina contribuindo de forma importante na resistência à insulina (HOWARD; FLIER, 2006). Além disso, trabalhos mostraram que a concentração de leptina está mais elevada em mulheres com diabetes gestacional (VITORATOS et al., 2001; ATAWI et al., 2004; QIU et al., 2004). Em concordância, a obesidade ou a exposição crônica a dietas hipercalóricas – condições que aumentam a expressão do SOCS3 e o grau de resistência à leptina – favorecem o risco de diabetes gestacional (KATHLEEN et al., 2004; KING, 2006). Dessa forma, seria importante um melhor conhecimento a respeito dos mecanismos que induzem resistência à leptina e à insulina durante a gestação.

Portanto, as evidências apresentadas mostram que alterações metabólicas durante a gestação (hiperfagia, ganho de peso excessivo, marcante diminuição na sensibilidade aos hormônios leptina e insulina) são, de forma geral, similares às observadas nos casos de obesidade e DM2 induzido por dieta. Assim, o período gestacional é um interessante modelo no estudo destas patologias metabólicas. Além disso, essas alterações metabólicas podem comprometer a saúde da gestante e de seu descendente. Logo, o entendimento dos fatores causadores das alterações metabólicas durante a gestação não apenas pode contribuir na prevenção e tratamento das alterações metabólicas durante a gravidez, mas também pode trazer novas pistas a respeito do tratamento da obesidade e do DM2.

Alternativas terapêuticas eficientes para distúrbios metabólicos enfrentados por gestantes, como o ganho excessivo de peso corporal e o diabetes gestacional,

dependem do entendimento de suas causas neurais e moleculares. Além disso, a gestação pode ser estudada como um interessante modelo para o entendimento da etiologia da obesidade e do diabetes mellitus, principalmente por seu caráter transitório. Baseado nisso, o presente estudo visou compreender possíveis causas moleculares que promovem as alterações metabólicas observadas durante a gestação. Iniciamos esse trabalho com a hipótese de que a expressão aumentada de SOCS3 em células que expressam o receptor de leptina seja o fator responsável por estabelecer e manter a resistência à leptina e à insulina que ocorre durante o período gestacional. E com a confirmação de nossa hipótese, este trabalho tem o potencial de abrir a perspectiva para que drogas que atuem reduzindo a expressão de SOCS3 ou que inibam fatores responsáveis por aumentar o SOCS3 durante a gestação possam ser estudadas como tratamento medicamentoso em potencial de distúrbios metabólicos de gestantes.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi identificar o mecanismo molecular fundamental necessário para promover as alterações metabólicas observadas durante a gravidez.

Objetivos específicos: Buscamos no presente trabalho investigar, em camundongos fêmeas, a influência da deleção de SOCS3 especificamente em células que expressam LepR (SOCS3^{flox/flox}LepR^{Cre/Cre}):

- no ganho de peso e consumo alimentar durante o período gestacional e lactação;
- na composição corporal em estágios avançados da gestação e após desmame;
- nos níveis séricos de leptina, prolactina e insulina em estágios avançados da gestação;
- nas alterações da expressão gênica dos diversos componentes da sinalização da leptina no hipotálamo em estágios avançados da gestação;
- na sensibilidade à leptina durante o período gestacional;
- na resistência à insulina durante o período gestacional;
- 1. na homeostase glicêmica durante o período gestacional e em condição de diabetes gestacional.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos geneticamente modificados que foram cruzados por pelo menos quatro gerações com animais de fundo genético *C57BL-6* foram mantidos em biotério em condições ambientais padrões (12 h claro/ 12 h escuro; 22-25 °C; água e ração *ad libitum*). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (certificado 008/12/CEUA, protocolo registrado sob nº 012 nas fls. 03 do livro 03 para uso de animais de experimentação).

4.1 Determinação de genes que podem influenciar a sensibilidade central à leptina durante a gestação

Fêmeas controle (*C57BL-6*) foram colocadas em acasalamento com machos da mesma linhagem a partir da 10ª semana de vida. Foi determinado o dia 1 de gestação com a identificação do tampão vaginal. No 16º dia de gestação foi realizada eutanásia das fêmeas (decapitação), após período de 4 horas de privação alimentar. Simultaneamente, amostras de fêmeas nulíparas de mesma idade e no diestro foram coletadas.

Após eutanásia, os hipotálamos foram rapidamente coletados e armazenados (-80 °C), para posterior extração de RNA total, transcrição reversa e análise de expressão gênica por PCR em tempo-real (conforme descrito no item 4.12). Para dissecar o hipotálamo, foram definidos os seguintes limites: rostro-caudal, 1 mm anterior ao quiasma óptico e imediatamente posterior aos corpos mamilares; latero-lateral, definida pelo trato óptico; e superior, o limite dorsal do terceiro ventrículo. Os genes relacionados à resistência à leptina estudados foram: SOCS1, SOCS3, PTP1B, PTPN2, PTPN11 PTPR_ε e SH2B1.

4.2 Produção dos animais com deleção condicional do SOCS3

Foram utilizados camundongos em que a deleção de SOCS3 ocorre especificamente em células que expressam o LepR (SOCS3^{flox/flox} LepR^{Cre/Cre}). Para a produção dos camundongos *knockout* foi utilizada a tecnologia Cre/*loxP*: numa

linhagem de camundongos um gene derivado de bacteriófagos P1 (Cre recombinase) foi condicionado à expressão do gene *Lepr* (DEFALCO et al., 2001; SCOTT et al., 2009); outra linhagem de camundongos teve o gene *Socs3* flanqueado por sítios loxP (B6;129S4-Socs3tm1Ayo/J, The Jackson Laboratories). O cruzamento destas duas linhagens de camundongos gerou animais em que a Cre é expressa apenas em células que têm LepR. Dessa maneira, o gene *Socs3* é inativado apenas nas células que expressam o LepR. Para tal, foram realizados cruzamentos entre os animais $SOCS3^{flox/-}$ LepR^{Cre/Cre}. Como resultado destes cruzamentos (25% $SOCS3^{+/+}$ LepR^{Cre/Cre}; 25% $SOCS3^{flox/flox}$ LepR^{Cre/Cre}; 50% $SOCS3^{flox/+}$ LepR^{Cre/Cre}) obtivemos os animais controle ($SOCS3^{+/+}$) e *knockout* condicional ($SOCS3^{flox/flox}$ ou *SOCS3* KO), cuja homozigose foi confirmada mediante genotipagem.

A partir do 21º dia de vida, os animais foram desmamados, identificados e foi coletada amostra de epitélio caudal para genotipagem (protocolo descrito no item 4.11). O DNA foi extraído para posterior reação em cadeia da polimerase (PCR). O protocolo de extração e amplificação de DNA foi realizado conforme manual do fabricante (Sigma-Extract-N-Amp^{TM} Tissue PCR kit, Cat N°. XNAT2) com primers específicos para Cre recombinase e da região flanqueada do *SOCS3*. Todos os experimentos foram conduzidos de forma que os animais controle fossem oriundos da mesma ninhada que os animais com deleção.

4.3 Validação da deleção condicional do *SOCS3*

Para obter a confirmação da inativação do gene *SOCS3*, submetemos fêmeas não grávidas, nulíparas, dos grupos controle e *SOCS3* KO na 10ª semana de vida, a testes de sensibilidade à leptina.

Inicialmente foi realizado o teste de resistência a leptina (TRL). Para o TRL, as fêmeas receberam no primeiro dia administração subcutânea (s.c.) de tampão fosfato salino (PBS) às 16 h (2 h antes do ciclo escuro começar). O consumo alimentar e peso corporal foram mensurados após 4, 12 e 24 horas da administração do PBS. Após 1 dia de recuperação, deu-se início novamente a manipulação dos animais. Desta vez as fêmeas receberam administração (s.c.) de leptina (2,5 µg/g - Dr. A.F. Parlow - National Hormone and Peptide Program, National Institute of Diabetes and Digestive and

Kidney), e tiveram peso e consumo alimentar mensurados após os mesmos períodos mencionados anteriormente. Para análise dos resultados foi realizada diferença entre o consumo alimentar observado no dia em que as fêmeas receberam PBS e o dia em que receberam leptina.

Posteriormente ao TRL, procedemos com análises moleculares para avaliar a capacidade de a leptina em estimular o aumento da expressão gênica de SOCS3 hipotalâmico. Após 4 horas de privação alimentar, as mesmas fêmeas controle e SOCS3 KO (em diestro) foram subdivididas em dois grupos; o primeiro recebeu injeção s.c. de leptina (2,5 µg/g), enquanto o segundo serviu como controle do experimento, e recebeu injeção s.c. da mesma solução utilizada para diluição da leptina (PBS). Após três horas da administração da leptina ou PBS procedeu-se a eutanásia (decapitação) para rápida coleta do hipotálamo (conforme descrito no item 4.1) e análise de expressão gênica SOCS3 (melhor detalhado adiante no item 4.12).

4.4 Sistema de acasalamento

A partir da 11^a semana de vida as fêmeas controle e SOCS3 KO foram alocadas com machos de genética oposta: ♀controle x ♂SOCS3 KO e ♀SOCS3 KO x ♂controle. Esta medida garantiu que todos os filhotes oriundos destes cruzamentos apresentassem a mesma genética (SOCS3^{flox/+}LepR^{Cre/Cre}) (Figura 1). Do contrário, não poderíamos garantir que os efeitos observados nas análises de peso seriam atribuídas exclusivamente pela diferença genética das matrizes. O dia 1 de gestação foi considerado após detecção do acasalamento, por meio da observação do tampão vaginal.

Importante salientar que este sistema de acasalamento foi adotado sempre que utilizamos fêmeas gestantes nos experimentos seguintes. As fêmeas tiveram prazo máximo para acasalarem de 3 semanas, ou seja, até a 13^a semana de vida. Fêmeas que não acasalaram durante este período foram descartadas do experimento.

Figura 1 - Sistema de acasalamento.

4.5 Comprovação da deleção condicional do SOCS3 e ausência de mecanismos compensatórios durante a gestação

4.5.a Expressão de SOCS3 em fêmeas grávidas SOCS3 KO

Para comprovar que a deleção condicional de SOCS3 foi eficaz em prevenir o aumento da expressão hipotalâmica de SOCS3 normalmente observado em fêmeas gestantes, utilizamos fêmeas SOCS3 KO núlparas em diestro (10^a semana de vida) e grávidas (16^o dia de gestação) para comparação da expressão gênica de SOCS3 hipotalâmico (conforme descrito no item 4.12).

4.5.b Expressão de genes envolvidos na sensibilidade à leptina durante a gestação

Para verificação de possíveis mecanismos compensatórios desencadeados pela ausência de SOCS3, a expressão de diferentes genes hipotalâmicos envolvidos na sensibilidade à leptina foi analisada em fêmeas grávidas controle e SOCS3 KO (16^o dia de gestação, após 4 h de privação alimentar): SOCS1, PTP1B, PTPN2, PTPN11, PTPR ϵ , SH2B1 e LepR. A quantificação da expressão gênica foi realizada conforme descrito no item 4.12.

4.5.c *Expressão proteica de SOCS3 e pSTAT3 após administração de leptina em fêmeas grávidas*

Adicionalmente, para testar a resposta à administração aguda de leptina, outras fêmeas grávidas (16º dia de gestação) controle e SOCS3 KO passaram por um período de 4 horas de privação alimentar e receberam injeção s.c. de leptina (2,5 µg/g). Neste caso, a eutanásia dos animais (decapitação) foi realizada em diferentes tempos após a administração do hormônio: 1,5 h, 3 h, 4 h, 5 h e 6 h. Após eutanásia, os hipotálamos foram dissecados (da mesma forma como descrito anteriormente) e rapidamente coletados e processados para quantificação proteica de SOCS3 e pSTAT3 por *Western blot* (melhor detalhado no item 4.13). Foram utilizados anticorpos primários específicos contra SOCS3, GAPDH, pSTAT3^{Tyr705} e STAT3total.

4.6 **Alterações no balanço energético durante e após a gestação**

4.6.a *Consumo alimentar e peso corporal*

Fêmeas controle e SOCS3 KO tiveram consumo alimentar e peso corporal registrados longitudinalmente antes da gestação (período basal), durante a gestação e lactação e no período pós-desmame.

Durante o período basal, fêmeas controle e SOCS3 KO de 10 semanas de vida foram individualizadas para registro diário de peso corporal (g) e consumo alimentar (g/dia) durante sete dias. A partir da 11ª semana de vida as fêmeas foram alocadas com machos, e após detecção do tampão vaginal foram novamente separadas em gaiolas individuais. O consumo alimentar (g/dia) e o peso corporal (g) foram mensurados diariamente durante a gestação, lactação (21 dias) e após o desmame (21 dias). Uma vez que em estudos preliminares observamos forte interação entre número de filhotes por ninhada e consumo alimentar, o número de filhotes por ninhada foi normalizado para seis imediatamente após o parto.

Paralelamente ao grupo de fêmeas primíparas (fêmeas que passaram pelo período gestacional), fizemos o acompanhamento de peso corporal e consumo alimentar diariamente de fêmeas nulíparas (fêmeas que nunca foram gestantes) durante o mesmo período de tempo para a comparação entre as alterações metabólicas decorrentes da gravidez.

Em relação à análise do consumo alimentar optamos por fazer uma avaliação percentual, onde as alterações decorrentes da gestação, lactação e pós-desmame foram relacionadas ao dado coletado no período basal, garantindo assim o acompanhamento longitudinal individual.

4.6.b Determinação da adiposidade

Após eutanásia (decapitação) foi determinada a composição corporal de gordura (peso dos depósitos de gordura - periuterino, ovariano e retroperitoneal – mg) de cinco diferentes grupos de fêmeas controle e SOCS3 KO (8/grupo):

- Basal: fêmeas com 14 semanas de vida. São fêmeas não grávidas, porém de mesma idade que as fêmeas do grupo gestante (descrito a seguir), minimizando assim o efeito idade em relação à avaliação;
- Gestante: fêmeas no 16º dia de gestação. São fêmeas grávidas que apresentam em média 14 semanas de vida;
- Lactante: fêmeas no 14º dia de lactação. São fêmeas lactantes que apresentam em média 17 semanas de vida;
- Primípara: fêmeas, em média com 21 semanas de vida, que passaram pela gestação, lactação e um período de recuperação de 21 dias;
- Nulípara: fêmeas que nunca tiveram uma gestação, em média com 21 semanas de vida.

A amostragem de fêmeas fora do período de gestação ou lactação sempre foi realizada durante o segundo dia de diestro.

4.6.c Balanço energético de fêmeas privadas da lactação

Adicionalmente aos grupos supracitados, decidimos fazer análise do balanço energético (peso corporal, consumo alimentar e composição corporal) de fêmeas que foram privadas da lactação. Logo após o parto, as fêmeas foram separadas de seus filhotes impedindo que as mesmas amamentassem. Isso nos permitiu investigar se com a ausência da alta demanda energética da lactação as fêmeas manteriam o mesmo comportamento alimentar.

4.6.d Expressão de genes envolvidos no balanço energético

Além da composição corporal, fêmeas nas condições Gestante e Lactante também tiveram amostras de hipotálamo coletadas para análise de expressão de genes envolvidos com comportamento alimentar e balanço energético.

Após eutanásia (decapitação), os hipotálamos foram rapidamente coletados (conforme descrito anteriormente no item 4.1) e armazenados (-80 °C), para posterior extração de RNA total, transcrição reversa e análise de expressão gênica por PCR em tempo-real (conforme descrito no item 4.12). Os genes relacionados ao balanço energético estudados foram: POMC, CART, NPY, AgRP, ORX e MCH.

4.7 Índices reprodutivos e acompanhamento de peso da prole

A partir da 11ª semana de vida, fêmeas controle e SOCS3 KO foram alocadas com machos e com a detecção do tampão vaginal foi determinado o dia 1 de gestação. Com base no intervalo de tempo entre a data do tampão vaginal e o dia do parto, foi determinada a duração do período gestacional.

No dia do parto foi determinada a quantidade de filhotes nascidos (vivos ou mortos). E a partir do nascimento os filhotes tiveram peso corporal (g) individual mensurado. No segundo dia de vida, o número de filhotes por ninhada foi normalizado para seis, e o peso corporal foi registrado semanalmente até o dia do desmame que foi realizado com 21 dias de vida.

Outro grupo de fêmeas serviu para avaliação do peso das glândulas mamárias (g), secreção de prolactina e determinação do desenvolvimento embrionário. Para isso, foi realizada eutanásia (decapitação) de fêmeas grávidas no 16º dia da gestação. Após decapitação, o sangue foi coletado do tronco e o soro separado (por centrifugação) e armazenado (-80 °C) até o momento da análise. A determinação das concentrações de prolactina foi obtida por meio de ensaio enzimático de imunoabsorção (ELISA) (Mouse Prolactin ELISA Kit, Cat N° RAB0408 – Sigma-Aldrich, protocolo de acordo com especificações do fabricante). As glândulas mamárias foram dissecadas e pesadas (g), foi feita contagem de número de embriões e reabsorções embrionárias, e os embriões tiveram a massa corporal mensurada (g).

Ainda para o grupo de fêmeas lactantes, foi coletado sangue para determinação de prolactina circulante e mensurado peso da glândula mamária (g).

4.8 Determinação da sensibilidade à leptina durante a gestação

4.8.a Leptina circulante

Fêmeas grávidas (16º dia de gestação) e não grávidas (nulíparas, no diestro e de mesma idade) tiveram o sangue coletado (decapitação) após 4 horas de privação alimentar para avaliação das concentrações séricas de leptina.

Após decapitação, o sangue foi coletado do tronco e o soro separado (por centrifugação) e armazenado (-80 °C) até o momento da análise. A determinação das concentrações de leptina foi obtida por teste ELISA (Mouse Leptin ELISA kit, #90030 - Crystal Chem, protocolo de acordo com especificações do fabricante).

4.8.b Ensaio crônico de sensibilidade à leptina

Para realização deste experimento utilizamos o mesmo sistema de acasalamento descrito anteriormente (item 4.4). A partir da 11ª semana de vida, fêmeas dos grupos controle e SOCS3 KO foram alocadas com machos, e após detecção do tampão vaginal, que determinou o dia um da gestação, foram separadas em gaiolas individuais. O consumo alimentar (g/dia) e o peso corporal (g) foram mensurados diariamente durante a gestação. No 5º dia de gestação as fêmeas receberam implante subcutâneo de mini bomba-osmótica (Alzet, model #1002), preenchida com leptina recombinante de camundongo e fluxo de liberação de 0,5 µg leptina por hora. O implante foi realizado por meio de procedimento cirúrgico utilizando anestesia inalatória (Isoflurano, Cristália). Após o implante, continuou-se a aquisição dos dados (peso corporal e consumo alimentar) até o 16º dia de gestação, quando foi realizada eutanásia das fêmeas para avaliação do desempenho reprodutivo (número de fetos/reabsorções embrionárias) e determinação da adiposidade.

4.8.c Determinação da sensibilidade à leptina em áreas específicas do cérebro

Fêmeas grávidas, controle e SOCS3 KO, receberam injeção s.c. de leptina (2,5 µg/g) após 4 horas de privação alimentar. Após 3 horas da administração do hormônio,

os animais foram profundamente anestesiados (100 mg/Kg de Cloridrato de Cetamina e 20 mg/Kg de Cloridrato de Xylasina) e foi realizada perfusão transcardíaca (PBS + formalina 10%). Os cérebros foram pós-fixados em formalina 10% por 1 h a 4 °C e depois crioprotetidos em sacarose 30% em PBS a 4 °C por 12 h.

Inicialmente foi realizada microtomia (em micrótomo de congelação) e os cortes histológicos (30 µm) foram processados por imunohistoquímica (procedimento melhor detalhado no item 4.14) e incubados em anticorpo primário específico anti-pSTAT3^{Tyr705} (Anexo B) e submetidos a reação de imunoperoxidase. Os cortes histológicos foram montados em lâminas gelatinizadas, desidratados (banhos seriados em álcool), incubados em xilol e cobertos com meio de montagem DPX (Sigma) e lamínula.

As imagens foram capturadas em microscópio óptico Zeiss Axioimager A (Zeiss, Muencher, Alemanha) com câmera digital AxioCam HRc e objetiva de 10x. Foi padronizado adquirir todas as imagens sob as mesmas condições de exposição e intensidade de luz.

A contagem dos neurônios contendo imunoreatividade à pSTAT3 (pSTAT3-ir) foi realizada automaticamente utilizando o software Image J 1.42q (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) conforme previamente descrito (Nagaishi et al., 2014). Inicialmente foi realizada contagem automática do número de neurônios imunorreactivos ao pSTAT3 em cada área. Os limites de cada núcleo foram definidos usando um atlas do cérebro do camundongo (Paxinos e Franklin, 2001), com pSTAT3-ir como referência. A imagem foi então convertida para um limiar binário e foram seleccionadas apenas as células marcadas com pSTAT3 (marrom-escuro ou preto). O programa então apresentou automaticamente a contagem das células seleccionadas. Após este procedimento, como contra-prova, uma contagem manual foi realizada utilizando a ferramenta *Cell Counter* do programa *ImageJ*. A contagem dos neurônios pSTAT3-ir foi realizada em um lado representativo dos seguintes níveis: área pré-óptica medial (MPA), núcleo arqueado do hipotálamo (ARH), núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH), área hipotalâmica lateral (LHA), núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH), núcleo pré-mamilar ventral (PMV) e núcleo do trato solitário (NTS). Foi utilizado o programa Photoshop CS5 software (Adobe) para edição e construção da prancha de

imagens e somente nitidez, contraste e brilho foram ajustados para apresentação das figuras representativas.

4.9 Determinação da homeostase glicêmica durante a gestação

4.9.a Insulina e glucagon circulante

As mesmas amostras utilizadas na determinação da concentração de leptina circulante (item 4.8.a) serviram para a avaliação, por meio de ELISA, dos valores de insulina (Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit, #90080 - Crystal Chem, protocolo de acordo com especificações do fabricante) e glucagon séricos (Glucagon EIA kit, #RAB0202 – Sigma – Aldrich, protocolo de acordo com especificações do fabricante) apenas nas amostras de fêmeas grávidas.

4.9.b Teste de tolerância à glicose

Fêmeas dos grupos controle e SOCS3 KO (10/grupo) foram utilizadas para o teste de tolerância à glicose (TTG). Para o grupo Basal (fêmeas não grávidas e nulíparas) o TTG foi realizado na 10^a semana de vida. Na 11^a semana de vida, as fêmeas foram colocadas em acasalamento similar ao descrito anteriormente.

Para o grupo Gestação, o TTG foi realizado entre o 13^o e 15^o dia da gestação. No dia do teste as fêmeas permaneceram em privação alimentar durante 4 horas. Após período de jejum, os animais receberam glicose subcutânea (2 g/kg). Amostras de sangue caudal foram coletadas nos tempos 0 (basal, antes da administração de glicose), 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. A glicemia foi avaliada por glicosímetro portátil (One Touch Ultra® - Johnson & Johnson) visando à determinação das concentrações de glicose para o cálculo da área sob a curva de glicose sérica.

Ainda no grupo Gestação, foi realizado no 18^o dia de gestação um TTG para avaliarmos a capacidade de secreção de insulina. No dia do teste, as fêmeas permaneceram em privação alimentar durante 4 horas. Após período de jejum, os animais receberam glicose subcutânea (2 g/kg). Amostras de sangue caudal foram coletadas nos tempos 0 (basal, antes da administração de glicose), 3, 20 e 40 minutos após a administração de glicose. O sangue coletado em tubos passou por centrifugação

para separação do soro, que foi armazenado (-80 °C). A determinação das concentrações de insulina foi obtida por teste ELISA (Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit, Cat Nº 90080 - Crystal Chem, protocolo de acordo com especificações do fabricante).

4.9.c Teste de tolerância à insulina

As mesmas fêmeas utilizadas para realização do TTG, também passaram pelo teste de tolerância à insulina (TTI). Para o grupo Basal (fêmeas não grávidas) o TTI foi realizado na 10ª semana de vida. E para o grupo Gestação, o TTI foi realizado entre o 15º e 17º dia da gestação.

No dia do teste as fêmeas permaneceram em privação alimentar durante 3 horas. Após período de jejum, os animais receberam insulina subcutânea (1 UI/g). Amostras de sangue caudal foram coletadas nos tempos 0 (basal, antes da administração de insulina), 20, 40, 60, 90 e 120 minutos após a administração de insulina. A glicemia foi avaliada por glicosímetro portátil (One Touch Ultra® - Johnson & Johnson) visando à determinação das concentrações de glicose para o cálculo da área sob a curva relativa ao momento inicial (tempo 0).

4.9.d Controle glicêmico hipotalâmico

Utilizamos as mesmas amostras de fêmeas dos grupos controle e SOCS3 KO grávidas estudadas no item 4.5.b para quantificação da expressão hipotalâmica de genes (conforme descrito no item 4.12) importantes na sinalização central de insulina (PKCδ, PCKθ, ABCC8, ABCC9, KCNJ8 e KCNJ11 – PEDROSO et al., 2014) (primers utilizados estão disponíveis no ANEXO A)

4.9.e Ativação das vias de sinalização da insulina no fígado e músculo esquelético

Para avaliar se as alterações hipotalâmicas poderiam alterar a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos, após 4h de privação alimentar, fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas receberam administração s.c. de insulina (5 U/kg) e após 15 minutos foram sacrificadas (decapitação). O fígado e tecido muscular (gastrocnêmio branco e vermelho) foram rapidamente removidos e processados para análise proteica

por *Western blot* (descrito posteriormente no item 4.13). Foram utilizados anticorpos primários específicos contra resíduos fosforilados do receptor de insulina β (Tyr1162/1163), AKT (Ser473) e GAPDH.

4.10 Protocolo de indução do diabetes gestacional

Para melhor compreender os mecanismos envolvidos na resistência à insulina que se desenvolve durante a gestação, um novo grupo de animais experimentais foi utilizado para indução de um paradigma de diabetes gestacional.

Na 11^a semana de vida, fêmeas dos grupos controle e SOCS3 KO foram colocadas em acasalamento e o primeiro dia da gestação foi determinado após observação do tampão vaginal, similarmente ao descrito anteriormente. Neste experimento, o diabetes gestacional foi induzido por administração intraperitoneal de estreptozotocina (200 mg/kg, STZ -AMRESCO) no 5º dia de gestação, conforme experimentos realizados por STECULORUM e BOURET (2011). A diluição de STZ foi feita em tampão citrato (0,9 M, pH 4,5) e realizada imediatamente antes de sua administração.

Nos grupos experimentais resultantes (controle diabético e SOCS3 KO diabético) foi mensurada glicemia em condição *ad libitum* nos dias 1, 4, 7 e 13 da gestação. Similar ao descrito anteriormente no item 4.8.b, foi realizado TTG entre os dias 13 e 15 da gestação. No entanto, com uma quantidade menor de glicose (0,5 g glicose/kg).

Para garantir que a lesão pancreática foi efetiva e similar para ambos os grupos, foi realizada eutanásia (decapitação) das fêmeas no 16º dia de gestação e o sangue foi coletado e processado para análise da concentração plasmática de insulina (ELISA). Após eutanásia também foi feita avaliação do desenvolvimento embrionário com contagem do número de embriões e reabsorções embrionárias, bem como de sua massa.

4.11 Genotipagem

O tecido utilizado para realização da genotipagem foi composto de amostras de epitélio caudal. Para os procedimentos de extração e amplificação de DNA foi utilizado

o Sigma-Extract-N-Amp^{TM} Tissue PCR kit (#XNAT2O), procedimentos conforme manual do fabricante.

4.11.a Extração de DNA genômico

Para extração de DNA foram utilizados 100 µL de Extraction solution (Sigma – E7526) e 12,5 µL de Tissue preparation solution (Sigma – T3073) por amostra, ambos fornecidos pelo kit de maneira pronta para o uso. Em seguida, foi realizada breve centrifugação (22 °C, 10000 rpm por 1 min) para garantir que o epitélio caudal fosse completamente imerso na solução anterior. Posteriormente, a amostra passou pela fase de digestão (22 °C por 20 min seguido por mais 12 min a 94 °C) e neutralização (50 µL de Neutralization solution B - Sigma – N3910). Antes de proceder com a amplificação por PCR, as amostras permaneceram no mínimo por 1h a 4 °C para estabilização.

4.11.b Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA seguiram para amplificação para identificação das regiões mutadas utilizando primers específicos para a mutação LepR^{Cre} (5'-ACCTGTTCCACGCACAGTCACA -3'; 5'-AGCTGGCCAAATCTCAGAGCTGC -3'; 5'-TGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT -3'; 5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCAC -3') e para a mutação da região flanqueada do SOCS3 (F-5'-CGGGCAGGGGAAGAGACTGT-3'; R-5'-GGAGCCAGCGTGGATCTGC-3'). Para a PCR, foram utilizados 5µL de Red Extract-N-Amp PCR Ready Mix (Sigma – R4775), 2µL da amostra de DNA, 1,25 nM do primer específico e H₂O ultra-pura previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) para completar um volume final de 10 µL. O protocolo utilizado em termociclador para a PCR do LepRCre foi: desnaturação inicial de 94 °C por 3 min; 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 seg), anelamento (60 °C por 30 seg) e extensão (72 °C por 1 min); desnaturação final de 72 °C por 4 min. O protocolo utilizado em termociclador para a PCR da região flanqueada do SOCS3 foi: desnaturação inicial de 94 °C por 3 min; 40 ciclos de desnaturação (94 °C por 30 seg), anelamento (62 °C por 30 seg) e extensão (72 °C por 1 min); desnaturação final de 72 °C por 4 min.

4.11.c Eletroforese

As amostras de PCR passaram então por eletroforese em gel de agarose (2% - Amresco, #RA N605), a 0.12A por 1 h 30 min. O resultado do peso molecular das bandas de DNA geradas determinou se o animal carrega ou não a mutação. Para Lepr^{Cre} : uma única banda de 900 pb indica que o animal é selvagem; uma única banda de 213 pb indica que o animal carrega a mutação em homozigose; duas bandas, uma de 900 pb e outra de 213 pb indica que o animal carrega a mutação em heterozigose. Para $\text{SOCS3}^{\text{flox}}$: uma única banda de 272 pb indica que o animal é selvagem; uma única banda de 420 pb indica que o animal carrega a mutação em homozigose; duas bandas, uma de 272 pb e outra de 420 pb indica que o animal carrega a mutação em heterozigose.

Na Figura 2 está apresentada uma imagem representativa de gel de agarose obtida na genotipagem, onde é apresentado após o marcador de peso molecular dois exemplos de animais selvagens, seguidos por três animais do grupo controle e três do grupo SOCS3 KO .

Figura 2 - Imagem representativa de gel de agarose com as respectivas bandas de genotipagem: selvagem = $\text{SOCS3}^{+/+} \text{Lepr}^{+/+}$; controle = $\text{SOCS3}^{+/+} \text{Lepr}^{\text{Cre/Cre}}$; SOCS3 KO = $\text{SOCS3}^{\text{flox/flox}} \text{Lepr}^{\text{Cre/Cre}}$.

4.12 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

4.12.a Extração de RNA total

Todas as amostras coletadas tiveram RNA total extraído utilizando o protocolo do TRIzol® Reagent seguindo o manual do fabricante. As amostras foram retiradas do freezer -80 °C somente no momento da extração sendo sempre mantidas em gelo. A homogeneização das amostras foi realizada utilizando-se 1 mL de TRIzol® Reagent com auxílio de homogeneizador de tecidos (Polytron). A mistura resultante foi incubada por 5 min à temperatura ambiente e a seguir acrescidos 0,2 mL de clorofórmio (CHCl₃) para desproteinização (fase de separação). O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 rpm, 15 min, 4 °C), e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol (fase de precipitação), lavado com etanol 75% por duas vezes (fase de lavagem) e dissolvido com H₂O DEPC (fase de diluição). O RNA obtido foi quantificado no espectrofotômetro (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek®) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

4.12.b Transcrição Reversa

Inicialmente, 2 µg de cada amostra de RNA total foram tratadas com DNase I, RNase free (Roche, #776785). O uso da DNase teve por objetivo eliminar qualquer contaminação que as amostras pudessem ter com DNA genômico. Para a primeira etapa do tratamento com DNase foram acrescidos o volume predeterminado pela biofotometria de RNA total, 0,32 µL de DNase I previamente diluída (2 µL de DNase, 1µL de tampão e 7 µL de H₂O DEPC), 3,36 µL de MgCl₂ (Roche, #1699113) e foi completado com H₂O DEPC o volume final de 20 µL. Esta solução foi então levada ao termociclador: 37 °C por 30 min; 75 °C 10 min; 4 °C.

As amostras então foram submetidas à reação de transcrição reversa. Foram acrescidos à solução anterior: 20 µL de H₂O DEPC, 10 µL de DTT, 10 µL de primers randômicos (146 ng – pdN6 Roche, #1034731), 20 µL de dNTPmix (desoxirribonucleotídeos trifosfatados - No Cat. 10297-018, Invitrogen™), 1 µL da enzima transcriptase reversa (SuperScript II RTase, GIBICO, #18064-022) e 20 µL do tampão da enzima. Estes primers randômicos são na maioria das vezes hexâmeros de oligodesoxirribonucleotídeos que se combinam à fita simples de RNA para que a enzima

transcriptase reversa reconheça um sítio de início de transcrição. Os desoxirribonucleotídeos fosfatados dNTPs são os quatro nucleotídeos do DNA (Adenina, Citosina, Guanina e Timina): dATP (desoxiAdenosina Trifosfatada), dCTP (desoxiCitidina Trifosfatada), dGTP (desoxiGuanosina Trifosfatada) e dTTP (desoxiTimidina Trifosfatada). Novamente a solução foi levada ao termociclador: 25 °C por 10 min; 42 °C por 50 min; 72 °C por 10 min; 4 °C. Terminada a reação as amostras foram devidamente armazenadas a -20 °C.

4.12.c Escolha do gene constitutivo

O gene endógeno, ou constitutivo, é um gene expresso continuamente e em todas as células do organismo. Para o presente estudo foi utilizado um gene cuja expressão não se alterou com a condição de gravidez. Para isso foram utilizadas amostras (n=8/grupo) nas condições basal e gestação. Foram utilizadas amostras de hipotálamo e fígado separadamente para esta avaliação. Os genes constitutivos utilizados para o teste foram o gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH), ciclofilina A (Ppia), β -actina (Actb) e RNA ribossomal 18S (18S). Os primers utilizados estão disponíveis no ANEXO A.

Os resultados de Ct obtidos pela reação de PCR em tempo-real para os genes constitutivos foram analisados pelo software “geNorm VBA applet for Microsoft Excel”. Este programa determina o gene de referência mais estável dentre um grupo de genes testados para um mesmo grupo de amostras. Os princípios matemáticos utilizados para a construção deste software foram descritos por Vandesompele et al. (2002).

Após análise neste programa os genes testados que apresentaram menor variação foram Ppia e GAPDH no hipotálamo, e Ppia e Actb no fígado. Os genes escolhidos foram utilizados como genes endógenos, e a média geométrica destes foi determinada para quantificação de expressão gênica.

4.12.d Expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão do RNAm foi estimada mediante PCR quantitativo em tempo real. A técnica de PCR em tempo real é sensível e permite a detecção direta dos produtos da PCR durante a fase exponencial da reação, combinando amplificação e detecção em

cada ciclo. Para tal foi utilizada a técnica de coloração “SYBR Green” que segue o princípio FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) que emite sinal de fluorescência quando ligadas ao DNA dupla fita, utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®). Além do SYBR Green foi utilizada a tecnologia TaqMan (TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems®), que permite maior especificidade da reação utilizando o mesmo princípio de FRET, porém o sinal de fluorescência é emitido quando a sonda específica do gene estudado é hidrolisada. Para cada reação foram padronizados os volumes dos reagentes conforme o manual do fabricante. Para TaqMan: 6,25 µL MasterMix; 0,35 µL primer; 4,4 µL H₂O DEPC; 1,5 µL amostras. Para SYBR: 6,25 µL MasterMix; 1,5 µL primer; 3,25 µL H₂O DEPC; 1,5 µL amostras.

Os primers utilizados para estimar a expressão gênica estão listados no ANEXO A com os respectivos tamanhos (em pares de bases) de cada produto de PCR (amplicon). Os primers foram desenhados de modo a garantir especificidade da molécula estudada, além da qualidade do próprio par de primers selecionado. A posição dos primers utilizados neste estudo foram desenhados de forma a garantir que na sequência do amplicon existisse pelo menos um intron (região específica de DNA genômico que não faz parte da sequência estudada de RNAm).

Em todas as reações foram realizadas desnaturações iniciais a 95 °C por 5 min, seguidas dos ciclos de desnaturação (95 °C, 30 s), anelamento (60 °C, 30 s) e extensão (72 °C, 30 s), e quando utilizado SYBR Green, seguindo para a curva de dissociação (95° por 15 segundos e 60 ° por 1 minuto). As reações foram realizadas em equipamento próprio para PCR em tempo real (7500™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems®). E a quantificação de expressão gênica foi realizada por $2^{\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.13 Western Blot

4.13.a Extração de proteínas

Após eutanásia, o hipotálamo, fígado e músculo foram rapidamente coletados e imediatamente homogeneizados em tampão RIPA (RIPA buffer, Sigma) contendo coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (1:1000, Sigma). Foi realizada

centrifugação (14000 RPM, 4 °C por 20 minutos) para coleta do material sobrenadante. Para determinação da concentração de proteínas totais foi utilizado kit comercialmente disponível (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific).

4.13.b Eletroforese e transferência

As amostras (50 µg de proteína total - 10% de SDS-PAGE) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Protein Gel Solutions). Finalmente foi realizada transferência para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, #162-0115). As membranas passaram por bloqueio em 5% de albumina sérica bovina (BSA) e incubadas 12h a 4°C em anticorpos primários específicos (1:1000): pSTAT3^{Tyr705}; STAT3; SOCS3, pIR, pAKT e GAPDH (ANEXO B). Posteriormente, as membranas foram incubadas por 45 minutos em anticorpo secundário (1:10000, IRDye 800CW, Li-COR 926-32211). As proteínas foram detectadas por quimiluminescência e analisadas utilizando o equipamento Li-COR Odyssey system (Li-COR). A normalização para SOCS3, pIR e pAKT foi feita pelo GAPDH, e a de pSTAT3 pelo STAT3 total.

4.14 Imunohistoquímica

Corte histológicos de 30 µm foram inicialmente submetidos a lavagens em potássio PBS (0,02 M, pH 7,4 - KPBS); pré-tratamento em peróxido de hidrogênio (0,3%) e NaOH (1%) por 20 min; lavagens em KPBS; incubação de 10 min em glicina (0,3%) diluída em KPBS; lavagens em KPBS; incubação de 10 min em dodecil sulfato de sódio (0,3% - SDS) diluído em KPBS; bloqueio em soro (3% soro normal de burro) por 1 h; incubação em anticorpo primário anti-pSTAT3^{Tyr705} (1:1.000, Cell Signaling) por 48 h; lavagens em KPBS; incubação em anticorpo secundário conjugado a biotina (1:1.000, Jackson Laboratories) por 1 h; lavagens em KPBS; incubação no complexo avidina-biotina (1:500, Vector Labs) por 1h; lavagens em KPBS. Por fim os tecidos foram submetidos à reação de imunoperoxidase por 3-5 min (diaminobenzidine tetrahydrochloride/DAB Sigma, peróxido de hidrogênio 0,03% em tampão acetado 0,1 M, pH 6,0) utilizando sulfato de níquel (0,25%) para realçar a marcação.

4.15 Fluxograma

A seguir está apresentado um resumo dos experimentos e em que momento da fase reprodutiva estes foram realizados.

Figura 3 - Fluxograma dos experimentos realizados ao longo da idade reprodutiva de fêmeas controle e SOCS3 KO.

4.16 Forma de análise dos resultados

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão médio. A análise estatística de parte dos dados foi realizada pelo Teste *t-Student*. Para análise dos resultados que envolviam dois fatores, por exemplo, a expressão hipotalâmica de SOCS3 após administração de leptina em fêmeas grávidas foi realizado ANOVA de dois fatores seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para o acompanhamento longitudinal de peso, consumo alimentar e glicemia foram realizados ANOVA fatorial, para medidas repetidas no tempo, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Em todos os ensaios estatísticos o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o software Prism 5 for Windows (GraphPad Prism software Inc.) para realização dos cálculos.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação dos genes que podem influenciar a resistência à leptina durante a gestação

Com o objetivo de investigar possíveis mecanismos moleculares que estão envolvidos com a resistência à leptina no hipotálamo de fêmeas grávidas, e por conseguinte poderiam estar relacionados com o aumento do consumo alimentar e peso corporal durante a gestação, investigamos, no 16º dia de gestação, a expressão de diferentes transcritos sabidamente envolvidos na modulação da sensibilidade à leptina. Apenas o SOCS3 estava aumentando no hipotálamo de fêmeas grávidas (controle = $1,00 \pm 0,09$ vs. SOCS3 KO = $1,36 \pm 0,13$; $p=0,0377$) dentre os diversos genes analisados (SOCS1 $p=0,3918$, PTP1B $p=0,5544$, PTPN2 $p=0,1238$, PTPN11 $p=0,2917$, PTPRE $p=0,9339$, SH2B1 $p=0,5598$) (Figura 4).

Figura 4 - Expressão de genes hipotalâmicos envolvidos na sensibilidade à leptina. Comparação entre fêmeas nulíparas e grávidas (n=8 animais/grupo).

*Diferença significativa $p < 0,05$

5.2 Validação da deleção condicional do SOCS3

Com o objetivo de confirmar se a deleção de SOCS3, especificamente em células que expressam LepR, aumenta a sensibilidade à leptina, realizamos em fêmeas controle e SOCS3 KO não grávidas (na 10ª semana de vida) o teste de tolerância a

leptina (TTL). Este teste permite avaliar a sensibilidade aos efeitos anorexígenos agudos causados pela administração periférica de leptina.

Após 4 horas da administração da leptina observou-se redução do consumo alimentar em relação ao dia em que os animais receberam apenas solução veículo (PBS). Essa resposta representou redução de 45% do consumo alimentar em ambos os grupos ($p=0,9541$). Após 12 horas da administração de leptina ainda não foi observada diferença significativa dentre os grupos experimentais ($p=0,0800$). Mas após o período de 24 horas foi observada maior resposta nas fêmeas SOCS3 KO (controle= $32,14\pm1,65\%$ vs. SOCS3 KO= $39,12\pm2,15\%$; $p=0,0203$) (Figura 5).

Figura 5 - Redução do consumo alimentar (%) após administração (s.c.) de leptina ($2,5 \mu\text{g/g}$) ($n=10$ animais/grupo).

Para confirmar a eficácia da deleção condicional do SOCS3, foi realizado tratamento agudo de injeção (s.c.) de leptina nas mesmas fêmeas não grávidas controle e SOCS3 KO. Ensaio de quantificação gênica indicaram que após administração de leptina, as fêmeas controle exibiram marcante aumento na expressão de RNAm de SOCS3 ($1,00\pm0,22$ vs. $2,35\pm0,21$; $p=0,0013$). Por outro lado, a administração do hormônio não promoveu alteração nas fêmeas SOCS3 KO ($1,00\pm0,12$ vs. $0,65\pm0,12$; $p=0,0692$) mantendo valor similar ao encontrado sem a administração do hormônio (Figura 6).

Figura 6 - Expressão relativa de SOCS3 hipotalâmico após administração subcutânea de leptina em fêmeas não grávidas (n=6 animais/grupo).

*Diferença significativa $p < 0,05$

5.3 Comprovação da deleção condicional do SOCS3 e ausência de mecanismos compensatórios durante a gestação

5.3.a Expressão de SOCS3 em fêmeas grávidas SOCS3 KO

Além das alterações basais (fêmeas não grávidas) encontradas entre fêmeas controle e SOCS3 KO, o principal objetivo do presente estudo foi avaliar a deleção condicional de SOCS3 durante a gestação. Inicialmente, verificamos a eficácia da deleção condicional em anular o aumento da expressão hipotalâmica de SOCS3 decorrente da gestação (descrita anteriormente no item 5.1). Novamente realizamos quantificação da expressão gênica (PCR em tempo real) de SOCS3 no hipotálamo de fêmeas grávidas e não grávidas de animais SOCS3 KO, e não encontramos alteração ($p=0,7975$) (Figura 7 A).

Figura 7 - Expressão de RNAm para SOCS3 em fêmeas nulíparas e grávidas KO condicional (A); expressão de genes hipotalâmicos envolvidos na sensibilidade à leptina. Comparação entre fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (B) (n=8 animais/grupo).

5.3.b Expressão de genes envolvidos na sensibilidade à leptina durante a gestação

Para avaliar se a deleção condicional promoveu algum mecanismo compensatório, dada à falta de SOCS3, foi investigada a expressão gênica de outros transcritos envolvidos na modulação da sensibilidade à leptina. A análise da quantificação gênica mostrou que fêmeas grávidas SOCS3 KO apresentaram os mesmo valores observados nas fêmeas controle: SOCS1, $p=0,5597$; PTP1B, $p=0,0714$; PTPN2, $p=0,2717$; PTPN11, $p=0,2130$; PTPR ϵ , $p=0,1400$; SH2B1, $p=0,2677$; LepR, $p=0,8638$ (Figura 7 B).

5.3.c Expressão proteica de SOCS3 e pSTAT3 após administração de leptina em fêmeas grávidas

Além da avaliação gênica, foram realizados ensaios de *Western blot* em fêmeas grávidas (16º dia de gestação) controle e SOCS3 KO para testar a resposta à administração aguda de leptina. Os resultados apresentados indicam haver aumento da expressão proteica de SOCS3 hipotalâmico de forma tempo dependente após a administração de leptina. Fêmeas controle exibiram aumento gradativo da expressão de

SOCS3, com maior magnitude após 3 horas da administração de leptina (PBS=1,00±0,14 vs. 3h Lep=1,57±0,06; p=0,0213), seguido de declínio da expressão proteica após 6h da administração do hormônio. Por outro lado, em animais SOCS3 KO nenhuma alteração na expressão proteica de SOCS3 foi observada nos diferentes tempos estudados após administração de leptina (Figura 8).

Figura 8 - Expressão proteica hipotalâmica de SOCS3 após administração subcutânea de leptina em fêmeas grávidas (n=3 animais/grupo).

Para avaliar a sensibilidade hipotalâmica à leptina, também foi realizada a quantificação de pSTAT3 (Figura 9). Após administração de leptina, ocorreu aumento marcante de STAT3 em seu estado fosforilado em ambos os grupos. Pode ser observado em animais controle que este aumento já é evidente após 1 hora e 30 minutos da administração do hormônio (PSB=1,00±0,14 vs. 1,5h=6,07±0,32; p=0,0001), mas ao passar do tempo ocorre declínio gradativo, e mesmo após 6 horas da administração da leptina ainda pôde ser observado aumento de pSTAT3 (PSB=1,00±0,14 vs. 6h=3,26±0,55; p=0,0164). Já os animais SOCS3 KO apresentaram efeito mais prolongado. Apesar dos animais controle e SOCS3 KO apresentarem mesma magnitude de resposta após 1 hora e 30 minutos (controle=6,07±0,32 vs. SOCS3 KO=5,62±0,28; p=0,3484) e 6 horas da administração da leptina

(controle= $3,26 \pm 0,55$ vs. SOCS3 KO= $3,31 \pm 0,58$; $p=0,9486$), após 3 horas da administração do hormônio as fêmeas SOCS3 KO exibiram maiores valores de STAT3 em seu estado fosforilado (controle = $4,20 \pm 0,41$ vs. SOCS3 KO = $5,77 \pm 0,23$; $p=0,0289$).

Figura 9 - Expressão proteica hipotalâmica de P-STAT3 após administração subcutânea de leptina em fêmeas grávidas (n=3 animais/grupo).

5.4 Alterações no balanço energético durante a gestação e lactação

Já que foi observada ausência da hiper-expressão de SOCS3 hipotalâmico durante a gestação, acreditamos que a deleção condicional de SOCS3 possa influenciar nas mudanças tipicamente observadas no balanço energético durante a gestação. Para tal avaliação, realizamos o acompanhamento longitudinal de fêmeas controle e SOCS3 KO durante a idade reprodutiva.

5.4.a Consumo alimentar e peso corporal

Animais controle apresentaram aumento progressivo no consumo alimentar durante a gestação e ainda mais pronunciado durante a lactação. Os animais SOCS3 KO mantiveram o consumo alimentar significativamente menor a partir do 5º dia de gestação em diante até o final da lactação. Após o desmame, o consumo alimentar voltou a valores próximos ao basal em ambos os grupos (controle e SOCS3 KO) (Figura 10).

Figura 10- Consumo alimentar longitudinal (% do período basal): durante os períodos de gestação, lactação e após o desmame (recuperação) (n=20-30 animais/grupo).

Com relação ao peso corporal, observamos que durante o período basal (10^a semana de vida) ambos os grupos apresentaram valores similares. As fêmeas grávidas do grupo controle progressivamente apresentaram aumento do peso corporal no decorrer da gestação. Porém esse ganho de peso foi parcialmente prevenido em fêmeas SOCS3 KO. A partir do 6º dia de gestação em diante, por toda a lactação e período pós desmame as fêmeas controle e SOCS3 KO passaram a apresentar diferença significativa no peso corporal, sendo as SOCS3 KO mais leves que os animais controle (Figura 11).

Figura 11- Peso corporal (g) durante os períodos basal, gestação e após o desmame (recuperação) (n=20-30 animais/grupo).

Surpreendentemente, quando foi comparado o peso corporal de fêmeas nulíparas e primíparas (de mesma idade), pudemos observar que o simples fato de a

fêmea já ter passado por uma única gestação lhe garante ser mais pesada que uma fêmea que nunca passou pela gestação (Figura 12 A). Este fenômeno foi observado em ambos os grupos, porém com menor intensidade em fêmeas SOCS3 KO (controle = $26,45 \pm 0,46$ vs. SOCS3 KO = $25,21 \pm 0,38$; $p=0,0489$) (Figura 12 B).

Figura 12 - Acompanhamento do peso corporal (g) (A) e peso corporal médio (g) (B) de fêmeas primíparas após o desmame e nulíparas de mesma idade (n=12 animais/grupo).

*Diferente do respectivo grupo nulípara; #Diferente do grupo controle; $p<0,05$

5.4.b Determinação da adiposidade

Para verificar se o menor ganho de peso nas fêmeas SOCS3 KO foi causado pelo menor acúmulo de massa gorda, mensuramos diversos depósitos de gordura ao longo do experimento. Observamos que a inativação do SOCS3 reduziu expressivamente o acúmulo de gordura corporal que ocorre durante a gestação (Figura 13). Em termos de comparação, os animais do grupo controle ganharam 3 a 4 vezes mais gordura na gestação do que as fêmeas SOCS3 KO. Dessa forma, as fêmeas KO condicional apresentavam, no 16º dia de gestação, uma adiposidade absoluta semelhante à observada em fêmeas controle não-grávidas.

Figura 13 - Composição corporal de fêmeas nas condições Basal, Gestação e Lactação, controle e SOCS3 KO. Adiposidade (g) dos diferentes depósitos de gordura: coxim periuterino (A), coxim periovariano (B) e coxim retroperitoneal (C) (n=12 animais/grupo).

Na lactação, também observamos menor quantidade de gordura corporal nas fêmeas SOCS3 KO, em comparação aos animais do grupo controle (Figura 13). A redução da deposição de gordura durante o período gestacional e a grande demanda energética da lactação fez com que o acúmulo de gordura nos territórios analisados fossem praticamente inexistentes nas fêmeas KO condicional durante a lactação. De qualquer forma pode ser observado em ambos os grupos que durante o período de lactação ocorre forte diminuição dos depósitos de gordura.

Quando observamos fêmeas nulíparas e primíparas com a mesma idade, observamos que a deleção condicional do SOCS3 preveniu a retenção de gordura após o período gestacional (Figura 14).

Figura 14 - Composição corporal de fêmeas nulíparas e primíparas, controle e SOCS3 KO. Adiposidade (g) dos diferentes depósitos de gordura: peri-uterino, peri-ovariana e retroperitoneal (RP). Os valores percentuais indicam a diferença dentre as fêmeas primíparas (n=12 animais/grupo).

5.4.c Balanço energético de fêmeas privadas da lactação

Foi realizado o balanço energético de fêmeas que foram privadas da lactação (logo após o parto as fêmeas foram separadas de seus filhotes impedindo que as mesmas amamentassem). Verificou-se que, com a ausência da alta demanda energética da lactação, imediatamente após o parto as fêmeas retornam os valores de consumo alimentar a níveis basais, em torno de 5 g de ração por dia, enquanto as fêmeas que permaneceram com seus filhotes aumentam o consumo alimentar exponencialmente até atingirem valores de 14 g por dia de consumo alimentar no 13º dia após o parto (Figura 15 A). O peso corporal das fêmeas que foram privadas da lactação também diminui significativamente, e já no 3º dia após o parto se encontrou estável o redor de 24g (Figura 15 B), enquanto as fêmeas lactantes ganharam peso com o passar do tempo salvo diferença entre os grupos controle e SOCS3 KO já descrito anteriormente. Além disso, pôde-se observar que independente da lactação as fêmeas tendem a reduzir o acúmulo de gordura decorrente da gestação (Figura 15 C).

Figura 15 - Consumo alimentar (A), peso (B) e composição corporal (C) pós-parto de fêmeas controle e SOCS3 KO lactantes e não lactantes.

*não lactante diferente do respectivo grupo grávida; #não lactante diferente do respectivo grupo lactante; $p < 0,05$

5.4.d Expressão de genes envolvidos no balanço energético

Para verificar quais genes hipotalâmicos envolvidos no balanço energético estariam relacionados às alterações no padrão de consumo alimentar decorrente da gestação e lactação, realizamos a expressão gênica de POMC, CART, NPY, AgRP,

ORX e MCH no hipotálamo de fêmeas controle em três diferentes momentos: basal, gestação (16º dia) e lactação (14º dia).

Nas fêmeas grávidas, foram observadas apenas uma redução na expressão de NPY (basal= $1,00 \pm 0,08$ vs. gestante= $0,57 \pm 0,09$, $p=0,0048$) e aumento do AgRP (basal= $1,00 \pm 0,11$ vs. gestante= $2,11 \pm 0,21$, $p=0,0003$), enquanto os demais componentes permaneceram similares aos valores encontrados em situação basal (POMC, $p=0,5969$; CART, $p=0,1882$; ORX, $p=0,3573$ e MCH, $p=0,2529$) (Figura 14). Já durante a lactação foi observada maior variação, com redução de POMC (basal= $1,00 \pm 0,07$ vs. lactante= $0,56 \pm 0,06$, $p=0,0003$), CART (basal= $1,00 \pm 0,06$ vs. lactante= $0,78 \pm 0,07$, $p=0,0418$), NPY (basal= $1,00 \pm 0,08$ vs. lactante= $0,49 \pm 0,08$, $p=0,0007$) e ORX (basal= $1,00 \pm 0,09$ vs. lactante= $0,70 \pm 0,08$, $p=0,0198$) e aumento do AgRP (basal= $1,00 \pm 0,11$ vs. lactante= $1,67 \pm 0,16$, $p=0,0032$), sendo que o MCH foi o único gene que permaneceu similar aos valores observados em situação basal ($p=0,3239$) (Figura 16).

Figura 16 - Expressão de genes hipotalâmicos envolvidos no balanço energético (POMC, CART, NPY, AgRP, ORX e MCH) de fêmeas controle nas três diferentes condições do experimento: basal, gestante e lactante (n=8 animais/grupo).

Com o intuito de determinar quais genes estariam relacionados à redução do consumo alimentar observado nas fêmeas SOCS3 KO durante a gestação, quando comparadas com as fêmeas do grupo controle, realizamos a comparação dos mesmos genes hipotalâmicos estudados anteriormente (POMC, CART, NPY, AgRP, ORX e MCH). Foi observada em fêmeas SOCS3 KO redução da expressão gênica de POMC (controle= $1,00 \pm 0,17$ vs. SOCS3 KO= $0,60 \pm 0,07$; $p=0,0436$) e CART (controle= $1,00 \pm 0,10$

vs. SOCS3 KO=0,65±0,05; $p=0,0099$), enquanto NPY ($p=0,9515$), AgRP ($p=0,5080$), ORX ($p=0,1363$) e MCH (0,0830) apresentaram valores similares ao observado nas fêmeas grávidas do grupo controle (Figura 17).

Figura 17 - Expressão de genes hipotalâmicos envolvidos no balanço energético (POMC, CART, NPY, AgRP, ORX e MCH) de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (16º dia de gestação) (n=8 animais/grupo).

*Diferença significativa $p<0,05$

Com o objetivo de determinar quais genes estariam relacionados à redução do consumo alimentar de fêmeas SOCS3 KO durante a lactação, realizamos a comparação dos mesmos genes hipotalâmicos estudados anteriormente (POMC, CART, NPY, AgRP, ORX e MCH). E não foi observada diferença para nenhum dos genes analisados, que apresentaram valores similares ao observado nas fêmeas lactantes do grupo controle: POMC ($p=0,5035$); CART ($p=0,8592$); NPY ($p=0,7879$); AgRP ($p=0,7417$); ORX ($p=0,7695$) e MCH ($p=0,2062$) (Figura 18).

Figura 18 - Expressão de genes hipotalâmicos envolvidos no balanço energético (POMC, CART, NPY, AgRP, ORX e MCH) de fêmeas controle e SOCS3 KO lactantes (14º dia da lactação) (n=8 animais/grupo).

5.5 Índices reprodutivos e acompanhamento de peso da prole

Cabe ressaltar que os cruzamentos foram planejados a fim de que os filhotes nascidos apresentassem o mesmo genótipo em ambos os grupos experimentais (todos os filhotes eram heterozigotos para a mutação $SOCS3^{fllox}$). Feita a detecção do tampão vaginal e registrado o dia do parto, pôde ser calculado o tempo de gestação. Pôde ser observado pequeno, porém significativo aumento na duração da gestação das fêmeas $SOCS3$ KO, que apresentaram em média um dia a mais para o parto (controle= $18,50 \pm 0,12$ vs. $SOCS3$ KO= $19,00 \pm 0,11$, $p=0,0036$) (Figura 19 A). Contudo, as fêmeas $SOCS3$ KO apresentaram menor número de filhotes nas ninhadas ao nascimento (controle= $8,50 \pm 0,27$ vs. $SOCS3$ KO= $6,39 \pm 0,39$, $p<0,0001$), que pode ser explicado pelo menor número de embriões no 16º dia da gestação (controle= $8,66 \pm 0,35$ vs. $SOCS3$ KO= $6,75 \pm 0,62$, $p=0,0133$) (Figura 19 B), acompanhado por maior número de reabsorções embrionárias observada no grupo $SOCS3$ KO (controle= $0,33 \pm 0,14$ vs. $SOCS3$ KO= $1,92 \pm 0,53$, $p=0,0085$) (Figura 19 B).

Figura 19 - Tempo e gestação (dias) para fêmeas controle e $SOCS3$ KO (A); número de embriões e reabsorções embrionárias observados no 16º dia de gestação de fêmeas controle e $SOCS3$ KO (B).

(A)*Diferente do grupo controle; $p<0,05$

(B)*Diferente do respectivo grupo grávida; #Diferente do grupo controle; $p<0,05$

Ainda, foi avaliado o peso dos filhotes em diferentes idades e observamos que o peso embrionário (no 16º dia de gestação) ($p=0,3334$), após o nascimento ($p=0,1302$) e no 7º dia de vida ($p=0,1125$) não diferiu significativamente entre os grupos experimentais (Figura 20). Contudo, filhotes nascidos de mães $SOCS3$ KO apresentaram menor peso corporal no 14º (controle= $6,70 \pm 0,13$ vs. $SOCS3$ KO= $5,83 \pm 0,10$, $p<0,0001$) e no 21º dia de vida (controle= $8,44 \pm 0,14$ vs. $SOCS3$

KO=7,55±0,22, $p=0,0015$), comparado aos filhotes nascidos de mães do grupo controle (Figura 20).

Figura 20 - Peso corporal (por ninhada) da prole de fêmeas controle e SOCS3 KO em diferentes etapas do desenvolvimento (embrionário e lactente).

Além do desenvolvimento dos filhotes, os tecidos mamários (o que inclui as glândulas mamárias juntamente com o adipócito ao redor dela) de fêmeas controle e SOCS3 KO foram coletadas e pesadas (g). Apesar de claramente haver aumento do tecido mamário durante o período de lactação, pôde ser observado menor peso desse tecido nas fêmeas SOCS3 KO durante a gestação (16º dia) (controle=0,1285±0,0052 g vs. SOCS3 KO=0,0902±0,0032 g, $p<0,0001$) e lactação (14º dia) (controle=0,2514±0,0159 g vs. SOCS3 KO=0,2023±0,0096 g, $p=0,0149$) com relação ao grupo controle (Figura 21 A). Adicionalmente mensuramos a prolactina circulante e observou-se marcante redução nas fêmeas SOCS3 KO, principalmente no período de lactação (Figura 21 B). Durante a gestação foi observada redução da prolactina circulante nas fêmeas SOCS3 KO (controle=50,20±8,36 pg/mL vs. SOCS3 KO=13,89±4,76 pg/mL, $p=0,0024$). Enquanto as fêmeas controle mostraram aumento significativo de 2,8 vezes na secreção de prolactina durante a lactação (gestação=50,20±8,36 pg/mL vs. lactação=138,60±32,35 pg/mL, $p=0,0137$), as fêmeas SOCS3 KO não apresentaram diferença com relação ao seu respectivo grupo gestante ($p=0,2213$), valores estes que nem atingiram aqueles observados durante a gestação em fêmeas controle.

Figura 21 - peso da glândula mamária (g) (A) e concentração da prolactina circulante (pg/mL) (B) das fêmeas controle e SOCS3 KO em diferentes momentos (gestação e lactação).

*Diferente do respectivo grupo gestação; #Diferente do grupo controle; $p < 0,05$

5.6 Determinação da sensibilidade à leptina durante a gestação

Como foi determinado previamente que a deleção condicional de SOCS3 foi eficiente em aumentar a sensibilidade à leptina em fêmeas não grávidas, e adicionalmente foi observada importante influência desta condição na determinação do acúmulo de gordura e consumo alimentar durante a gestação, acreditamos que as fêmeas SOCS3 KO possam apresentar maior sensibilidade à leptina mesmo durante a gestação, período este caracterizado pelo desenvolvimento de um quadro transitório de resistência à leptina. Para comprovar esta hipótese, realizamos diversos ensaios para avaliar a sensibilidade à leptina nas fêmeas grávidas.

5.6.a Leptina circulante

Primeiramente foi realizada análise de leptina circulante (ELISA). As fêmeas SOCS3 KO apresentaram menor concentração plasmática de leptina em relação às fêmeas controle durante a gestação (controle = $14,32 \pm 2,28$ vs. SOCS3 KO = $4,35 \pm 0,82$; $p = 0,0011$) (Figura 22). Além disso, pudemos observar que a gestação foi capaz de aumentar em dez vezes a leptina circulante nos animais controle ($1,38 \pm 0,57$ vs. $14,32 \pm 2,28$; $p = 0,0004$) enquanto que não houve diferença entre fêmeas grávidas e não grávidas do grupo KO condicional ($5,31 \pm 0,95$ vs. $4,35 \pm 0,82$; $p = 0,4588$).

Figura 22 - Concentração de leptina plasmática (ng/mL) de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (16º dia de gestação) e não grávidas (basal) (n=8 animais/grupo)

*Diferença significativa $p < 0,05$

5.6.b. Ensaio crônico de sensibilidade a leptina durante a gravidez

Para avaliar a sensibilidade à leptina ao longo da gestação, foram implantadas mini-bombas osmóticas (s.c.) contendo leptina no 5º dia de gestação. Esta metodologia possibilitou a avaliação da sensibilidade à leptina de forma longitudinal nas fêmeas estudadas.

Logo após o implante da mini-bomba osmótica foi observada redução significativa tanto do ganho de peso corporal quanto do consumo alimentar em ambos os grupos (controle e SOCS3 KO) (Figura 23 A-D). Contudo, ao final do ensaio (16º dia de gestação), o grupo controle apresentou os mesmos valores de ganho de peso que animais controle que não receberam infusão contínua de leptina ao longo da gestação ($11,33 \pm 0,33$ vs. $10,35 \pm 0,43$; $p = 0,0836$) (Figura 24 A). Por outro lado, as fêmeas SOCS3 KO mantiveram redução do ganho de peso gestacional ao longo do tratamento com leptina ($8,52 \pm 0,41$ vs. $5,12 \pm 0,71$; $p = 0,0002$) (Figura 24 A).

Figura 23 - Ganho de peso (g) (A-B) e consumo alimentar (C-D) ao longo da gestação com infusão crônica de leptina (seta indica o momento do implante da mini-bomba osmótica) (n=8-22 animais/grupo).

Figura 24 - Ganho de peso gestacional (g) (A) e consumo alimentar (%) [variação percentual entre o início (1°-5° dia) e fim (14°-16° dia) da gestação] (B) de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas com e sem infusão crônica de leptina (n=8-22 animais/grupo).

O tratamento com leptina foi eficaz em reduzir o consumo alimentar em ambos os grupos ao final da gestação (14^o-16^o dias), porém o efeito anorexígeno da leptina foi mais robusto nas fêmeas SOCS3 KO (controle = 24,73±7,50 vs. SOCS3 KO = 1,27±5,95; p=0,0206) prevenindo completamente o aumento do consumo alimentar característico durante este período gestacional (Figura 24 B).

Adicionalmente aos dados de peso corporal e consumo alimentar, também foi mensurada a deposição de gordura nos mesmos territórios avaliados anteriormente, e pudemos observar que o tratamento com leptina nas fêmeas SOCS3 KO esgotou as reservas de gordura corporais (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição corporal de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas com infusão crônica de leptina. Adiposidade (g) dos diferentes depósitos de gordura: peri-uterino, peri-ovariano e retroperitoneal (RP) (n=12 animais/grupo).

	peri-uterino	peri-ovariano	retroperitoneal
Controle	0.02398 ± 0.00289	0.00678 ± 0.00086	0.00544 ± 0.00101
SOCS3 KO	0.00279 ± 0.00078*	0.00083 ± 0.00052*	0.00036 ± 0.00018*

*Diferença significativa p<0,05

Quando as fêmeas foram submetidas ao teste crônico de sensibilidade à leptina, observamos que a diferença entre o número de filhotes/reabsorções embrionárias se manteve comparado aos grupos que não receberam a mini-bomba osmótica, maior número de embriões no grupo controle e maior número de reabsorções embrionárias no grupo SOCS3 KO (controle: 9,5 embriões e 0,2 reabsorções; SOCS3 KO: 6,0 embriões e 2,8 reabsorções) (Figura 25).

Figura 25 - número de embriões e reabsorções embrionárias observados no 16º dia de gestação de fêmeas controle e SOCS3 KO submetidas a infusão crônica de leptina (a partir do 5º dia de gestação).

*Diferente do respectivo grupo grávida; #Diferente do grupo controle; $p < 0,05$

5.6.c Determinação da sensibilidade à leptina em áreas específicas do cérebro

Foi realizado um teste agudo de sensibilidade a leptina para verificar a ativação da sinalização de STAT3 em diferentes regiões do cérebro. Este experimento permitiu verificar quais áreas centrais permaneceram sensíveis à leptina durante a gestação.

Foi realizada quantificação de células imunorreativas ao pSTAT3 e não foram observadas diferenças entre os grupos controle e SOCS3 KO nas seguintes áreas: MPA ($p=0,3048$), LHA ($p=0,6167$), DMH ($p=0,4601$) e NTS ($p=0,9782$) (Figura 24). Por outro lado, foi encontrada maior número de células imunorreativas ao pSTAT3 nos animais SOCS3 KO no ARH (controle= $72,25 \pm 2,95$ vs. SOCS3 KO= $116,2 \pm 8,32$; $p=0,0028$), VMH (controle= $118,30 \pm 6,93$ vs. SOCS3 KO= $166,20 \pm 7,42$; $p=0,0011$) e PMV (controle= $169,70 \pm 19,48$ vs. SOCS3 KO= $261,80 \pm 8,09$; $p=0,0029$) (Figura 26).

Figura 26 - Ativação de STAT3 após 3h da administração de leptina em fêmeas grávidas, controle e SOCS3 KO, em diferentes núcleos encefálicos. MPA; ARH; VMH; LHA; DMH; PMV e NTS (n=5-6 animais/grupo).

*Diferença significativa $p < 0,05$

A seguir está apresentada prancha de imagem com micrografia representativa das regiões analisadas (Figura 27).

Figura 27 - Fotomicrografias representativas da distribuição de células imunorreativas a pSTAT3 (pSTAT3-ir) após administração s.c. de leptina (2,5 µg/g). Abreviações: MPA, área pré-optica medial; ovlt: órgão vascular da lâmina terminal; oc: quiasma óptico; VMH: núcleo ventro-medial do hipotálamo; ARH, núcleo arqueado do hipotálamo; 3v: terceiro ventrículo; LHA: área hipotalâmica lateral; DMH: núcleo dorso-medial do hipotálamo; PMV: núcleo pré-mamilar ventral; f: fornix; NTS: núcleo do trato solitário; AP: área postrema; cc: canal central; 12N: núcleo hipoglosso. Barra de escala = 100 µm.

5.7 Determinação da homeostase glicêmica durante a gestação

Simultaneamente ao quadro de resistência à leptina que se instala durante a gestação, ocorre aumento da resistência à insulina de forma transitória. Como o SOCS3 funciona como feedback negativo tanto da sinalização de leptina quanto de insulina, e como foi demonstrada que a deleção condicional de SOCS3 pode aumentar a sensibilidade à leptina, é nossa hipótese que a deleção condicional do SOCS3 também possa contribuir com o aumento da sensibilidade à insulina durante a gestação.

5.7.a Insulina e glucagon circulante

Determinamos a concentração sérica de insulina (ELISA), porém não encontramos diferenças significativas entre os grupos nas condições basal e gestação (Figura 28). Quanto à secreção de glucagon durante a gestação, encontramos uma tendência ($p=0,0749$) das fêmeas SOCS3 KO apresentarem menores valores.

Figura 28 - Concentração de insulina sérica (ng/mL) de fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas e não grávidas (nulíparas) (A) e glucagon sérico (ng/mL) de fêmeas grávidas ($n=8$ animais/grupo).

5.7.b Teste de tolerância à glicose

Os testes de tolerância à glicose revelaram que em situação basal (quando as fêmeas não estão grávidas) animais controle e SOCS3 KO responderam da mesma forma à administração de glicose (Figura 29 A). Já no início do teste (tempo 0), os animais controle e SOCS3 KO apresentaram os mesmos valores de glicemia ($105,3 \pm 5,3$ mg/dL vs. $99,0 \pm 5,3$ mg/dL; $p=0,4191$). Após 20 minutos da administração de

glicose houve aumento significativo da glicemia em ambos os grupos (controle=322,0±24,5 mg/dL vs. SOCS3 KO=287,4±24,3 mg/dL; $p=0,3411$). Após este pico, ocorreu redução gradativa da glicemia até o tempo 120 minutos, quando os valores de glicemia observados em ambos os grupos foram os mesmos daqueles no início do teste. Finalmente, o cálculo da AUC revelou que houve resposta similar entre as fêmeas do grupo controle e SOCS3 KO (22030±895 vs. 22330±1249; $p=0,8457$) (Figura 29 C). Por outro lado, quando o organismo é colocado em uma situação de desafio (gravidez), as fêmeas SOCS3 KO apresentaram maior tolerância à glicose. Apesar das fêmeas controle e SOCS3 KO durante a gravidez apresentarem os mesmos valores de glicemia no início do teste (95,14±4,34 mg/dL vs. 94,00±2,36 mg/dL; $p=0,8081$), o grupo SOCS3 KO apresentou menores valores de glicemia nos tempos 40min (controle=236,4±16,5 mg/dL vs. SOCS3 KO=179,2±8,5 mg/dL; $p=0,0027$) e 60min (controle=160,1±12,3 mg/dL vs. SOCS3 KO=130,7±4,7 mg/dL; $p=0,0209$) (Figura 29 B). Através do cálculo de AUC pôde ser observado, que a tolerância à glicose em fêmeas SOCS3 KO foi ainda melhor durante a gestação em comparação ao período basal (basal=22330±1249 vs. grávida=18510±587; $p=0,0041$) (Figura 29 C).

Figura 29 - Testes de tolerância à glicose (tempo 0 = momento da administração de glicose 2g/kg) de fêmeas controle e SOCS3 KO não grávidas (A) e grávidas (B). Resultado global da área sob a curva (C) ($n=10-16$ animais/grupo).

(B)*Diferença significativa $p<0,05$

(C)*Diferente do respectivo grupo basal; #Diferente do grupo controle; $p<0,05$

A avaliação da secreção de insulina ao longo de um TTG revelou que as fêmeas grávidas SOCS3 KO precisam secretar menor quantidade de insulina para manter uma tolerância à glicose melhor que a encontrada em fêmeas controle grávidas (Figura 30).

Logo após o início de teste, com 3 minutos da administração de glicose, ocorreu um pico na secreção de insulina que foi similar em ambos os grupos (controle= $0,901 \pm 0,157$ ng/mL vs. SOCS3 KO= $0,585 \pm 0,050$ ng/mL; $p=0,0681$). Porém, decorridos 20 minutos da administração de glicose a secreção de insulina nas fêmeas SOCS3 KO foi significativamente menor (controle= $0,566 \pm 0,073$ ng/mL vs. SOCS3 KO= $0,370 \pm 0,033$ ng/mL; $p=0,0291$). Estes resultados indicam que fêmeas SOCS3 KO são mais sensíveis à insulina que fêmeas controle durante a gestação.

Figura 30 - Secreção de insulina (ng/mL) após administração de glicose (tempo 0 = momento da administração de glicose 2g/kg) em fêmeas grávidas controle e SOCS3 KO (n=6 animais/grupo).

5.7.c Teste de tolerância à insulina

Os testes de tolerância à insulina (TTI) revelaram que fêmeas, tanto grávidas quanto não grávidas, SOCS3 KO são mais sensíveis à insulina (

31 A-B). Assim como no TTG, a glicemia inicial (tempo 0) foi similar em ambos os grupos (controle e SOCS3 KO) tanto durante o período basal quanto durante a gestação (~100 mg/dL). Após administração de insulina, ocorreu redução gradativa da glicemia, com menores valores observados após 60 minutos do início do teste. A partir deste momento, a glicemia começou a retornar a valores iniciais. Contudo, o valor observado após 120 minutos da administração de insulina ainda foi inferior que aquele observado no início do teste. Durante o TTI as fêmeas SOCS3 KO não grávidas (basal) apresentaram menores valores de glicemia a partir de 40min após a administração de insulina (controle= $54,00 \pm 2,07$ mg/dL vs. SOCS3 KO= $41,10 \pm 3,94$ mg/dL; $p=0,0096$) até 120 minutos (controle= $73,80 \pm 3,66$ mg/dL vs. SOCS3 KO= $48,30 \pm 6,91$ mg/dL; $p=0,0044$). E quando grávidas, essa diferença foi ainda mais evidente uma vez que foi

observada redução no grupo SOCS3 KO a partir de 20min (controle=65,00±4,20 mg/dL vs. SOCS3 KO=53,29±2,94 mg/dL; $p=0,347$) e durante todo o período do teste (120min). Além disso, através do cálculo da AUC, foi observado que o simples fato de as fêmeas estarem grávidas as tornam resistentes à insulina em ambos os grupos (controle: basal=7512±508 vs. grávida=8791±299, $p=0,0372$; SOCS3 KO: basal=5738±759 vs. grávida=7315±336, $p=0,0390$) (Figura 31C). Mesmo assim, as fêmeas SOCS3 KO grávidas continuaram mais sensíveis à insulina que fêmeas controle (8791±299 vs. 7315±336; $p=0,0028$) (Figura 31 B-C).

Figura 31 - Testes de tolerância à insulina (tempo 0 = momento da administração de insulina 1 U/kg) de fêmeas controle e SOCS3 KO não grávidas (A) e grávidas (B). Resultado global da área sob a curva (C) ($n=10-16$ animais/grupo).

5.7.d Controle glicêmico hipotalâmico

A homeostase glicêmica modulada pelos neurônios hipotalâmicos requer a atividade dos canais K_{ATP} e sofre influência de isoformas específicas de PKC. Dentre os componentes analisados, pudemos verificar que houve diminuição da expressão de PKC θ (controle = 1,00±0,02 vs. SOCS3 KO = 0,86±0,03; $p=0,0044$) e o aumento na expressão da subunidade SUR2 de canais K_{ATP} (controle = 1,00±0,11 vs. SOCS3 KO = 1,59±0,20; $p=0,0230$) em fêmeas SOCS3 KO grávidas (Figura 32).

Figura 32 - Expressão hipotalâmica de genes importantes na sinalização central de insulina (n=8 animais/grupo).

5.7.e Sinalização de insulina no fígado e músculo esquelético

Para investigar se as alterações observadas a nível hipotalâmico afetaram a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos, fêmeas grávidas receberam estímulo agudo para investigar a sinalização de insulina no fígado e tecido muscular.

A administração de insulina foi eficiente em aumentar a fosforilação de IR e AKT no fígado de forma similar em ambos os grupos (Figura 33 A-C). Após administração de insulina, houve aumento de 80% de pIR e 417% de pAKT no fígado de fêmeas grávidas do grupo controle e SOCS3 KO.

Figura 33 - Expressão proteica hepática de pIR (B) e pAKT (C) após administração subcutânea de insulina em fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (n=4 animais/grupo).

No músculo, a administração de insulina também foi eficiente em aumentar a fosforilação de IR e AKT em ambos os grupos (Figura 34 A-C). No entanto, fêmeas SOCS3 KO apresentaram maiores valores de pIR que as controle ($1,92 \pm 0,17$ vs. $2,87 \pm 0,30$; $p=0,0360$) (Figura 34 B).

Figura 34 - Expressão proteica no tecido muscular esquelético de pIR (B) e pAKT (C) após administração subcutânea de insulina em fêmeas controle e SOCS3 KO grávidas (n=4 animais/grupo).

*Diferente do respectivo grupo basal; #Diferente do grupo controle; $p < 0,05$

5.8 Paradigma do diabetes gestacional

Realizamos experimentos para avaliar se a inativação do SOCS3 em células que expressam o LepR pode prevenir o desenvolvimento de diabetes gestacional em fêmeas tratadas com estreptozotocina (STZ, i.p., 200 mg/kg) no 5º dia de gestação, conforme protocolo experimental previamente publicado (STECULORUM; BOURET, 2011).

Após o protocolo da indução do diabetes gestacional, várias das fêmeas que tiveram o tampão vaginal identificado (portanto foram consideradas grávidas) apresentaram perda gestacional em ambos os grupos, sendo mais severa nas fêmeas SOCS3 KO (controle=26% vs. SOCS3 KO=62%). Destas fêmeas que tiveram perda gestacional, observamos valores de glicemia acima de 300 mg/dL (Figura 35 A), sendo que não foi observada prevenção do desenvolvimento do diabetes nas fêmeas SOCS3 KO (Figura 35 B), que apresentaram valores similares aos observados no grupo controle até durante o TTG ($p=0,3743$) (Figura 35 C-D).

Figura 35 - Concentração de glicose circulante (mg/dL) de fêmeas controle e SOCS3 KO não grávidas 8 dias após o tratamento com STZ (200 mg/kg) (A) e acompanhamento longitudinal da glicemia após o tratamento com STZ (B); Testes de tolerância à glicose (tempo 0 = momento da administração de glicose 0,5g/kg) de fêmeas controle e SOCS3 KO não grávidas tratadas com STZ (C) e resultado da área sob a curva (AUC) (D).

Das fêmeas que levaram a gestação à diante, após o tratamento com STZ, foi observado menor aumento da glicemia nas fêmeas SOCS3 KO ao longo da gestação, em comparação as fêmeas controle (Figura 36 A). Sendo que as fêmeas controle atingiram glicemia acima de 200 mg/dL, indicando a instalação do diabetes gestacional.

Figura 36 - Acompanhamento longitudinal da glicemia (A), concentração de insulina circulante (ng/mL) (B), testes de tolerância à glicose (tempo 0 = momento da administração de glicose 0,5g/kg) (C) e respectivo cálculo de área sob a curva (AUC) (D) de fêmeas controle e SOCS3 KO tratadas com STZ (200 mg/kg) no 5º dia de gestação (n=8-20 animais/grupo).

*Diferença significativa $p < 0,05$; n.s. não significante

Apesar do efeito observado na glicemia diferir entre os grupos, a análise da concentração de insulina circulante revelou que o tratamento com STZ foi similar em ambos os grupos de fêmeas grávidas ($\sim 0,3$ ng/mL) (Figura 36 B).

Além disso, a tolerância à glicose continuou melhor nas fêmeas SOCS3 KO mesmo após tratamento com STZ (Figura 36 C). Fêmeas controle e SOCS3 KO iniciaram o TTG com mesmo valor de glicemia ($216,6 \pm 19,7$ vs. $166,3 \pm 35,0$; $p=0,1993$), e apresentaram mesmo pico após 20 minutos da administração de glicose ($336,9 \pm 23,6$ vs. $280,5 \pm 43,6$; $p=0,2346$). As fêmeas SOCS3 KO apresentaram menores valores de glicemia a partir de 40 minutos ($303,0 \pm 27,8$ vs. $172,7 \pm 31,9$; $p=0,0170$) até o final do teste ($249,6 \pm 21,8$ vs. $151,6 \pm 25,0$; $p=0,0161$).

Além dos dados de glicemia, no 16º dia de gestação foi avaliado o desenvolvimento embrionário, e foi observado que quando os animais foram submetidos ao paradigma do diabetes gestacional não houve diferença no número de filhotes/reabsorções embrionárias dentre os grupos controle e SOCS3 KO (Figura 37).

Figura 37 - número de embriões e reabsorções embrionárias observados no 16º dia de gestação de fêmeas controle e SOCS3 KO tratadas com STZ (200 mg/kg no 5º dia de gestação).

*Diferente do respectivo grupo embriões; #Diferente do grupo controle; $p < 0,05$

6 DISCUSSÃO

Em circunstâncias normais, o aumento da ingestão alimentar, adiposidade e resistência à insulina durante a gravidez possivelmente garantem melhores condições para o desenvolvimento da prole. No entanto, a deposição de massa gorda no longo prazo e a retenção de peso no período pós-parto é um importante fator de risco para a obesidade na população feminina (NEHRING et al., 2011). Além disso, o aparecimento do diabetes gestacional aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 mais tarde na vida (NORMAN; REYNOLDS, 2011; SARWER et al, 2006; STECULORUM; BOURET, 2011). Portanto, desequilíbrios metabólicos durante a gestação têm impacto negativo sobre a saúde da mulher. Notavelmente, as alterações metabólicas observadas durante a gravidez se assemelham àqueles causadas por dietas ricas em gordura. Assim, a gravidez é um modelo interessante de obesidade transitória e resistência à insulina. No entanto, embora o nosso conhecimento sobre as causas moleculares de obesidade induzida por dieta tenha melhorado significativamente nos últimos anos (MORRIS; RUI, 2009), muito pouco se sabe sobre os mecanismos responsáveis por orquestrar mudanças metabólicas durante a gestação.

A gravidez é acompanhada de alterações hormonais marcantes, incluindo altos níveis circulantes de estrogênio, progesterona, leptina, gonadotrofina coriônica, prolactina, lactogênio placentário e GH (AUGUSTINE et al., 2008). Existem várias evidências que indicam que alguns desses hormônios ou até mesmo a combinação deles atuam no cérebro para produzir mudanças nos circuitos neuronais envolvidos na regulação do balanço energético (AGOSTINHO; GRATTAN, 2008; LADYMAN et al, 2010; NAGAISHI et al, 2014). Por exemplo, a infusão de prolactina central promove resistência à leptina em ratas pseudogravídas (AGOSTINHO; GRATTAN, 2008).

Várias proteínas foram identificadas como capazes de induzir a resistência à leptina e cuja expressão está alterada no hipotálamo de animais obesos (MORRIS; RUI, 2009). Estas proteínas incluem componentes da família das SOCS, algumas proteínas adaptadoras e proteínas fosfatases-tirosina (PTP). Analisamos a expressão destas proteínas no hipotálamo de fêmeas grávidas em comparação com nulíparas. Notavelmente, o único componente alterado foi o SOCS3, considerado o principal

membro da família SOCS capaz de inibir a sinalização LepR (BJORBAEK et al, 1999; KREBS; HILTON, 2001). Esse resultado indica que o SOCS3 é um importante candidato na determinação da resistência à leptina durante a gestação. A maioria dos hormônios gestacionais pode induzir a expressão SOCS3, incluindo estradiol (STEYN et al., 2008), a leptina (BJORBAEK et al., 1999), a prolactina (STEYN et al., 2008) e o GH (KREBS; HILTON, 2001). Portanto, o SOCS3 é, possivelmente, uma proteína integrativa recrutada por múltiplos sinais responsável por induzir alterações metabólicas durante a gravidez.

Sabe-se que ocorre aumento da expressão de SOCS3 no hipotálamo de animais obesos e que sua deleção central aumenta a sensibilidade à leptina em animais obesos induzidos por dieta (BRIANCON et al, 2010; MORI et al, 2004; PEDROSO et al, 2014). Portanto, testamos a hipótese de que a ação do SOCS3 sobre células que expressam o LepR seja um mecanismo chave no desencadeamento das alterações metabólicas durante a gestação.

Para determinar se o SOCS3 desempenha um papel na resistência à leptina e nas alterações metabólicas durante a gravidez, produzimos camundongos portadores de deleção condicional no gene SOCS3, especificamente em células que expressam o LepR. Uma vez que a proteína SOCS3 inibe a sinalização do LepR (BJORBAEK et al., 1999), demonstramos que fêmeas SOCS3 KO nulíparas apresentam maior sensibilidade à leptina. Esta maior sensibilidade foi comprovada através do menor consumo alimentar observado após administração subcutânea de leptina em fêmeas SOCS3 KO, que se deu provavelmente pela ausência da expressão de RNAm de SOCS3 no hipotálamo destes animais.

O resultado apresentado, além de garantir que o estímulo periférico promovido pela leptina é incapaz de promover aumento da expressão do SOCS3 hipotalâmico em animais com a deleção condicional, também indica que o aumento de SOCS3 hipotalâmico observado nas fêmeas do grupo controle depende do aumento da secreção de leptina periférica para sinalização central exclusivamente em células responsivas à leptina (que expressam o LepR).

Diversos autores haviam demonstrado anteriormente aumento da expressão de SOCS3 hipotalâmico em fêmeas grávidas (ANDERSON et al., 2006; TANG; CUI;

WANG, 2008; TRUJILLO et al., 2011), corroborando com nossos resultados aqui apresentados. Como o principal objetivo do presente estudo foi avaliar a deleção condicional de SOCS3 durante a gestação, inicialmente verificamos a eficácia da deleção condicional em anular o aumento da expressão hipotalâmica de SOCS3 decorrente da gestação. Além de termos comprovado a eficácia da deleção com similaridade na expressão de SOCS3 hipotalâmico de fêmeas SOCS3 KO nulíparas e grávidas, este resultado indica que o aumento da expressão de SOCS3 hipotalâmico durante a gestação é um fenômeno que ocorre de forma restrita a neurônios responsivos a leptina.

São inúmeros os mecanismos intracelulares de regulação que podem alterar a sinalização da leptina. Da mesma forma que o SOCS3 atua de forma negativa na regulação da sinalização da leptina (BANKS et al., 2000; KREBS; HILTON, 2003; YASUKAWA et al., 1999), outros importantes mecanismos de regulação negativa coexistem, como PTP1B (ZABOLOTNY et al., 2002), PTPN2 (LOH et al., 2011) e PTPR ϵ (ROUSSO-NOORI et al., 2011; TANUMA et al., 2000). Então para garantir que não houvessem mecanismos compensatórios para contornar a ausência de SOCS3 em células que expressam o LepR, paralelamente ao estudo da expressão de SOCS3 hipotalâmico, realizamos análise da expressão gênica de diversos outros componentes envolvidos na sinalização da leptina (SOCS1, PTP1B, PTPN2, PTPN11, PTPR ϵ , SH2B1 e LepR) em fêmeas grávidas controle e SOCS3 KO. Os resultados indicaram que durante a gestação não houve alteração de nenhum dos genes avaliados e que, portanto, não foram observados mecanismos compensatórios.

BATES et al. (2003) apontam a fosforilação do STAT3 como um importante passo após a ativação do LepR pelo qual a leptina dá seu efeito no balanço energético. Além disso, o aumento na expressão de SOCS3 tem sido indicado como um importante mecanismo de feed back negativo da ativação do LepR (BANKS et al., 2000), principalmente por funcionar como regulador negativo da sinalização de STAT3 no hipotálamo *in vivo* (MORI et al., 2004). Em ensaio de administração (s.c.) de leptina em diferentes períodos temporais em fêmeas grávidas SOCS3 KO, pudemos observar maior valor de pSTAT3 após 3 horas da administração do hormônio, que foi provavelmente causado pela ausência de SOCS3 hipotalâmico neste mesmo momento.

Assim, esses dados indicam que mesmo após estímulo (injeção s.c. de leptina) as fêmeas SOCS3 KO também não são capazes de produzir a proteína SOCS3. Estes resultados indicam que a falta de SOCS3 (feedback negativo natural do LepR) permite que a ativação do LepR seja mais pronunciada, sugerindo que a deleção de SOCS3 especificamente em células que expressam LepR possa ter garantido maior sensibilidade à leptina mesmo em fêmeas grávidas.

Durante a gravidez, os animais aumentam sua ingestão de calorias não só para satisfazer as necessidades energéticas dos fetos, mas também para acumular a gordura como um reservatório de energia para lactação (LADYMAN et al, 2010; SARWER et al, 2006). No presente trabalho mostramos que a inativação de SOCS3, em células que expressam o LepR, garantiu menor consumo alimentar e menor ganho de peso gestacional, que foi associado a uma menor deposição de gordura durante este período.

Notavelmente as fêmeas lactantes apresentam peso corporal elevado que não foi correlacionado a maior deposição de gordura. Durante a lactação ocorre uma alta demanda metabólica para a produção de leite e são recrutados múltiplos mecanismos hormonais visando à conservação de nutrientes para a lactopoeise e alterações no controle central do metabolismo que facilitam o aumento do consumo alimentar (WOODSIDE, 2014). Sendo assim, o maior peso corporal observado nas fêmeas lactantes, não foi devido à deposição de gordura, mas sim pelo desenvolvimento do tecido mamário e maior enchimento gástrico (dados observados durante a dissecação dos animais).

A gravidez é considerada um importante fator de risco para a obesidade em mulheres (NEHRING et al., 2011). Inúmeros estudos encontraram evidências de que o ganho de peso excessivo durante a gestação está relacionado à maior retenção de peso pós-parto em curto e longo prazo (KAC et al., 2004; ROONEY; SCHAUBERGER, 2002; LINNE et al., 2004; VESCO et al., 2009). No presente trabalho, mostramos que a deleção condicional de SOCS3 contribuiu para prevenir a retenção de peso pós-parto. Porém, mesmo com esta prevenção, também observamos que o fato de a fêmea ter passado por uma gestação já lhe garantia maior peso corporal. Durante a gestação ocorre uma série de alterações hormonais e de sinalização central que podem alterar

permanentemente o corpo da mulher. Estudos de SJOEHOLM et al. (2011) mostraram em ratas que após o período de gestação as fêmeas passam a responder de forma mais intensa à administração de prolactina (i.c.v.), por meio da marcação com pSTAT5, em múltiplas áreas hipotalâmicas envolvidas no balanço energético e reprodução.

Algumas das alterações que ocorrem na sinalização peptidérgica central durante o período gestacional já foram descritas anteriormente, como o aumento da expressão dos peptídeos orexígenos NPY e AGRP (GARCIA et al., 2003; ROCHA et al., 2003; TRUJILLO et al., 2011), paralelo à diminuição de α -MSH e POMC (KHORRAM; DEPALATIS; MCCANN, 1984; TRUJILLO et al., 2011). No presente trabalho encontramos aumento marcante na expressão de AgRP acompanhado de redução de NPY no hipotálamo de fêmeas controle grávidas. Essa discrepância de resultado, entre o observado e o encontrado na literatura, pode ser devido a diferença de linhagem e fundo genético do modelo animal estudado. Mas acreditamos que o aumento na expressão de AgRP possa ter contribuído significativamente no aumento do consumo alimentar, peso corporal e deposição de gordura das gestantes. Sabe-se que, durante a gestação, ocorre transitoriamente um quadro de resistência tanto à leptina quanto à insulina (LADYMAN et al., 2010; NORMAN; REYNOLDS, 2011). Como a sinalização de ambos os hormônios é necessária para inibir a atividade dos neurônios AgRP e desencadear a resposta de diminuição do consumo alimentar (KÖNNER et al., 2007; VAN DE WALL et al. 2008), acreditamos que o deficit de sinalização destes hormônios possa ter contribuído com o aumento de sua atividade levando ao aumento do consumo alimentar nas fêmeas grávidas.

Durante a lactação também já foram estudados quais os componentes envolvidos no balanço energético estariam relacionados com o aumento marcante do consumo alimentar. MALABU et al. (1994) e CROWLEY et al. (2007) mostraram em ratas lactantes que o aumento na expressão de NPY e AgRP hipotalâmico estaria associado ao aumento do consumo alimentar durante este período. Estudos de CUI, TANG e WANG (2011) apresentam que a lactação também é acompanhada por aumento da expressão de NPY e AgRP no hipotálamo de roedores (*Lasiopodomys brandtii*) e diminuição de POMC sem alteração na expressão de CART. No presente trabalho pudemos observar redução de POMC e CART, condizente com o aumento do

consumo alimentar, já que estão presentes em neurônios sabidamente anorexígenos (SCHWARTZ et al., 2000). Mais uma vez observamos aumento na expressão de AgRP com redução de NPY. E houve também diminuição na expressão de ORX, contradizendo os resultados encontrados por BROGAN, GROVE e SMITH (2000) que não observaram alteração na expressão de ORX hipotalâmico de ratas lactantes. Apesar do padrão de expressão dos neuropeptídeos não ir de encontro com o já descrito na literatura, acreditamos que o balanço destas modificações tenham contribuído no aumento do consumo alimentar das fêmeas lactantes.

Uma questão importante a ser ressaltada ao tentarmos explicar as alterações na expressão gênica dos transcritos analisados é que a presença ou ausência de RNAm não reflete necessariamente a funcionalidade daquele neurônio. Por exemplo, DONATO et al. (2011) mostraram que apesar da expressão de GnRH estar aumentada em neurônios do PMV, após a reativação de LepR, sua função está comprometida, pois estes mesmos neurônios na verdade estão acumulando GnRH por um déficit na liberação desse neurotransmissor. Seguindo a mesma linha de raciocínio, DONATO et al. (2013) também mostraram que a lesão no PMV promovia aumento tônico na expressão de GnRH, levando a um comprometimento do eixo reprodutivo.

Passamos a investigar a expressão dos genes hipotalâmicos que podem ter contribuído com a redução no consumo alimentar, menor ganho de peso e deposição de gordura observados nas fêmeas SOCS3 KO grávidas. E foi observada diminuição da expressão de POMC e CART. GAMBER et al. (2012) mostraram em modelos de obesidade induzida por dieta, que o aumento da expressão de LepR em neurônios POMC contribui com o aumento de ganho de peso, deposição de gordura e aumento no consumo alimentar devido ao aumento da expressão de SOCS3 e redução da ativação de STAT3 induzida por leptina. Como as fêmeas SOCS3 KO grávidas, além de apresentarem ausência de expressão de SOCS3 em células que possuem o LepR, também apresentavam melhor resposta à ação da leptina, como visto anteriormente na expressão hipotalâmica de pSTAT3, acreditamos que a melhor atividade do LepR de forma geral (no hipotálamo) garantiu melhor sensibilidade à leptina e preveniu o aumento da expressão de forma restrita nos neurônios POMC. Outra provável explicação para a redução na expressão de POMC de fêmeas SOCS3 KO grávidas

esteja relacionado com os níveis de leptina circulante (que será melhor abordado mais a diante). COWLEY et al. (2001) mostraram por estudos eletrofisiológicos que a ação direta da leptina em neurônios POMC é de aumentar a frequência de potenciais de ação. Já que as fêmeas SOCS3 KO grávidas não apresentaram aumento na concentração plasmática de leptina, pode ser que o estímulo nos neurônios POMC tenha sido menos intenso quando comparado às fêmeas controle. Além disso, dados do nosso próprio grupo e outros (HAGAN et al., 1999; PEDROSO et al., 2014; SILVA et al., 2014; ZIOTOPOULOU et al., 2000) mostraram que situações que predispõe à obesidade ocorre aumento da expressão do RNAm de POMC. Este mecanismo pode estar associado a um mecanismo de feed back negativo do corpo na tentativa de contrapor uma situação em que o ganho de peso seja favorável como, por exemplo, a exposição à dieta rica em gordura ou a ausência de estradiol (PEDROSO et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Apesar de termos observado diferença tanto no consumo alimentar quanto na massa gorda de fêmeas controle e SOCS3 KO lactantes, não encontramos diferença no padrão de expressão dos genes analisados. Este resultado poderia ser justificado por maior gasto energético (temperatura corporal, maior atividade ambulatoria), porém este tipo de alteração não poderia ser detectado pela expressão dos genes hipotalâmicos que decidimos analisar.

Na literatura há grande controvérsia quanto à contribuição da lactação na perda de peso pós-parto. Diversos autores não verificaram maior perda de peso ou gordura corporal entre mães que amamentaram, quando comparadas às que alimentaram seus filhos com formulados lácteos (BREWER et al., 1989; POTTER et al., 1991; SCHAUBERGER et al., 1992). Em contrapartida, outros estudos observaram efeito protetor da lactação sobre a retenção de peso pós-parto (BAKER et al., 2008; DEWEY et al., 1993; JANNEY et al., 1997; OHLIN; ROSSNER, 1990). Tendo como expectativa de que a amamentação contribuisse com a redução do peso pós-parto, avaliamos o peso, consumo alimentar e adiposidade de fêmeas que logo após o parto foram privadas de amamentar. Observamos que, mesmo na ausência de maior demanda energética destinada à produção de leite, as fêmeas tendem a retomar o peso original, mantendo o consumo alimentar similar ao observado em situação basal, com

diminuição do peso corporal e adiposidade. Nota-se que apesar das fêmeas privadas de lactação apresentarem maiores valores de adiposidade que as fêmeas lactantes, comprovando assim a contribuição da alta demanda energética da lactação com a redução do tecido originalmente armazenado durante a gestação, elas apresentam menores valores de adiposidade que as fêmeas grávidas. Este resultado coloca em evidência que independente do gasto energético durante a lactação, após a gestação as fêmeas tendem a retornar ao peso inicial, perdendo a massa gorda acumulada durante a gestação.

Estas observações corroboram com a teoria do *set point* de peso corporal, em que o indivíduo tem identificado um peso corporal ideal e que após um breve período de alteração do peso ele tende a retomar o peso original (SPEAKMAN et al., 2011). Supõe-se que o nível pré-determinado de gordura corporal é mantido em equilíbrio pela regulação de múltiplos parâmetros biológicos, incluindo fatores genéticos, equilíbrio de nutrientes, gasto de energia, sinalização neuroendócrina e fatores ambientais (HARRIS, 1990). A teoria do *set point* também se aplica aos resultados encontrados quanto ao peso corporal de fêmeas nulíparas vs. primíparas. Ao longo do processo evolutivo o ser humano foi protegido da perda de peso corporal, tornando a utilização de alimento altamente eficaz principalmente em períodos que ocorria privação de alimento (LEIBEL; ROSENBAUM; HIRSCH, 1995), o que tornou o homem de hoje mais susceptível a acumular massa gorda quando a oferta de alimento é farta. Com o aumento de massa gorda o *set point* original pode ser modificado para um patamar mais elevado de peso corporal contribuindo com o acúmulo de gordura com o passar do tempo (CORNIER, 2011; FARIAS; CUEVAS; RODRIGUEZ, 2011). Deste modo, as fêmeas que passaram pelo período de gestação e conseqüentemente acumularam gordura durante um período importante de tempo, podem ter sofrido alteração no *set point* pré-gestacional, contribuindo com o acúmulo de massa gorda e retenção de peso pós-parto.

Sabe-se que a expressão do LepR não é restrita a áreas hipotalâmicas, e se dá em tecidos do aparelho reprodutivo como ovários, útero, placenta e testículos (EL-HETNAWY; IOFFE; DYM, 2000; HERRID; O'SHEA; MCFARLANE, 2008; ISHIKAWA et al., 2007; KARLSSON et al., 1997; MANTZOS et al., 2011). E no presente estudo não

observamos alterações significativas que pudessem indicar prejuízo ou melhora na fertilidade dos animais SOCS3 KO utilizados, tanto fêmeas quanto machos.

No ovário, o LepR está presente nos oócitos, células do cúmulus, granulosa, teca e do corpo lúteo (MATSUOKA et al., 1999; RUIZ-CORTÉS et al., 2000; SMOLINSKA et al., 2007). A leptina participa na oogênese, maturação do oócito, desenvolvimento folicular, ovulação e desenvolvimento embrionário inicial (CRAIG et al., 2004; DUGGAL et al., 2000; KIKUCHI et al., 2000; KITAWAKI et al., 1999; VAN TOL et al., 2008). Apesar de não termos verificado diretamente a função ovariana das fêmeas SOCS3 KO, observamos o mesmo número de conceptos comparado ao grupo controle, indicando que não houve prejuízo ou melhora no processo ovulatório, caso o SOCS3 tenha sido inativado nessas células.

No útero, o LepR está presente no endométrio e colo uterino (SOSA et al., 2010). Parece que a leptina é importante na implantação e formação inicial do embrião. RAMOS et al. (2005) mostraram que a aplicação do antagonista de leptina no corno uterino é capaz de prevenir completamente a implantação dos embriões. MALIK et al. (2001) também demonstraram a necessidade da sinalização da leptina para implantação e progressão da gestação. Neste estudo, os autores administraram leptina em fêmeas ob/ob e verificaram restabelecimento da fertilidade e, surpreendentemente, que a administração do hormônio poderia ser interrompida a partir do 6º dia de gestação sem promover perda gestacional. Da mesma forma que a falta de leptina está relacionada à infertilidade (GARCIA-GALIANO et al., 2014; PÉREZ-PÉREZ et al., 2015), o excesso deste hormônio também tem sido relacionado aos casos de infertilidade observado em mulheres obesas (COMNINOS; JAYASENA; DHILLO, 2014; FAROOQ; LUTFULLAH; AHMED, 2014; PANTASRI; NORMAN, 2014).

Durante o desenvolvimento embrionário a placenta participa de forma importante no aporte de nutrientes, oxigênio e glicose. E a leptina placentária parece desempenhar papel importante na conexão materno-fetal, modulando o transporte de nutrientes, particularmente de aminoácidos e lipídeos, contribuindo para as exigências nutricionais do feto (FORHEAD; FOWDEN, 2009). Por outro lado, a leptina funciona com um fator pró-inflamatório no tecido adiposo, podendo contribuir com a inflamação placentária em mulheres obesas, já que estas apresentam excesso de leptina

circulante, o que leva a produção de citocinas pró-inflamatórias no estroma placentário e consequentemente promove dano e disfunção placentária (TESIER; FERRARO; GRUSLIN, 2013; VAZQUEZ; ROMERO-RUIZ; TENA-SEMPERE, 2015). No presente estudo pudemos constatar que o número de filhotes viáveis nas fêmeas do grupo controle foi maior que nas fêmeas SOCS3 KO. Portanto esta observação pode indicar prejuízo no desenvolvimento placentário e comprometimento no aporte de nutrientes para o embrião, conferindo um maior número de reabsorções embrionárias observadas nas fêmeas SOCS3 KO.

Outro estudo interessante avaliou o potencial da leptina em atuar como fator de crescimento em células neoplásicas endometriais, e foi demonstrado que o desenvolvimento de epitélio endometriótico é estimulado por leptina via STAT3 (OH et al, 2013). Como anteriormente vimos maior ativação de STAT3 induzida pela leptina nas fêmeas SOCS3 KO, uma possibilidade é de que estas fêmeas possam ter desenvolvido endometriose branda, contribuindo no maior número de reabsorções embrionárias.

Independente do desenvolvimento placentário ou endometriose que salientamos anteriormente, queremos chamar a atenção para o fato mais importante do estudo: a deleção condicional de SOCS3, a princípio, ocorreu em fêmeas saudáveis, o que pode ter levado ao prejuízo durante o desenvolvimento embrionário e/ou placentação. Ao longo da evolução, o SOCS3 pode ter surgido como um mecanismo importante para viabilizar o balanço energético durante a gestação de uma fêmea saudável contribuindo com o sucesso do desenvolvimento embrionário. Uma vez que a fêmea se encontra em condições adequadas de nutrição e composição corporal, é esperado que o aumento da expressão hipotalâmica de SOCS3 contribua positivamente com o aumento da resistência à leptina decorrente da gestação, necessária para suprir a alta demanda energética durante este período. Contudo, é no ambiente obesogênico em que vivemos que o aumento da expressão de SOCS3 parece contribuir de forma negativa no ganho de peso excessivo e até o desenvolvimento do diabetes gestacional. Desta forma, a deleção condicional de SOCS3 em fêmeas saudáveis veio acompanhada por comprometimento reprodutivo, evidente com menor número de filhotes e maior número de reabsorções embrionárias

observados nas fêmeas SOCS3 KO. Ou seja, ao retirarmos um importante componente envolvido nas adaptações metabólicas da gestação de uma fêmea saudável, possivelmente prejudicamos os mecanismos adaptativos do desenvolvimento embrionário, favorecendo a viabilidade de um número menor de embriões.

Com o menor número de embriões viáveis, as fêmeas SOCS3 KO apresentaram maior tempo gestacional. Inúmeros são os mecanismos responsáveis por coordenar o trabalho de parto a termo, como contratilidade do miométrio e relaxamento do colo uterino sincronizados com a atuação de diversos hormônios como hormônio liberador de corticotrofina, estrógeno, progesterona, prostaglandina e ocitocina (KOTA ET AL, 2013; MESIANO; WELSH, 2007). Estudos realizados em humanos mostraram que após o parto natural ocorre grande aumento na concentração plasmática de leptina e expressão gênica placentária, quando comparadas a mulheres que passaram por cesariana (NAUMAH et al., 2004). Estes achados apontam a importância da leptina no processo natural do parto, mas não justificam termos encontrado aumento do período gestacional nas fêmeas SOCS3 KO. Adicionalmente, outros estudos também realizados em humanos demonstraram haver correlação direta com o tempo do trabalho de parto e a concentração plasmática de leptina no cordão umbilical (JO et al., 2005), colocando em questionamento os cuidados com as mulheres obesas, já que a ação da leptina iria em oposição aos efeitos da ocitocina durante o parto (WUNTAKAL; KALER; HOLLINGWORTH, 2013).

Apesar da diferença observada no número de filhotes viáveis por ninhada, o peso corporal dos filhotes das fêmeas controle e SOCS3 KO foi similar desde a fase embrionária até o 7º dia de vida. A partir do 14º dia de vida passamos a observar menor peso corporal nas ninhadas oriundas de fêmeas SOCS3 KO. Inicialmente, acreditávamos que a redução de peso corporal observada nestes filhotes era devido a uma produção ineficiente de leite, já que foi observado menor peso da glândula mamária e menores valores de prolactina circulantes nas fêmeas SOCS3 KO. Porém os filhotes começaram a apresentar diferença de peso somente a partir do 14º dia de vida, que é o período marcante onde os animais iniciam a alimentação com a dieta sólida (ração). No entanto, foi durante este mesmo período que observamos maior aumento no consumo alimentar e peso corporal das fêmeas, mostrando a alta demanda

energética necessária para a produção de leite, que certamente era maior que no início da lactação. Acreditamos que pelo fato de termos reduzido o número de filhotes por ninhada (6), nós apenas atrasamos a observação do déficit de ganho de peso dos filhotes. Uma possibilidade é de que se tivéssemos deixado cada fêmea com um número maior de filhotes (por exemplo, 10 animais), poderíamos identificar precocemente o déficit na produção de leite nas fêmeas SOCS3 KO, causado pela menor ingestão alimentar.

A resistência à leptina é uma característica fundamental que predispõe os animais à obesidade (BRIANCON et al, 2010;. MORI et al, 2004.). Com base na função do SOCS3 na modulação da sinalização do LepR (BJORBAEK et al., 1999), nós sugerimos que o mecanismo molecular responsável pela prevenção da hiperfagia e acúmulo de gordura durante a gravidez em fêmeas SOCS3 KO seja o aumento da sensibilidade à leptina.

A característica marcante do quadro de resistência à leptina, tanto em obesos quanto em grávidas, é o aumento da concentração plasmática de leptina (AHIMA, 2008; MIRSA; STRAUGHEN; TRUDEAU, 2013). Foi observado no presente estudo que, apesar de termos encontrado o aumento clássico de leptina circulante em fêmeas controle grávidas, as fêmeas SOCS3 KO não apresentaram hiperleptinemia. Este resultado sugere que a expressão de SOCS3 em células que expressam o LepR é essencial para aumentar os níveis circulantes de leptina decorrente da gestação.

Além da ausência de aumento de leptina plasmática, pudemos observar que as fêmeas SOCS3 KO apresentaram menor consumo alimentar e menor ganho de peso quando submetidas ao tratamento crônico com infusão de leptina periféricamente. Este resultado indicou maior sensibilidade à leptina nestas fêmeas durante o período gestacional. Apesar da gestação ser caracterizada pelo desenvolvimento de um quadro transitório de resistência à leptina (LADYMAN; GRATTAN, 2004; RYAN; O'SULLIVAN; SKYLER, 1985), sabidamente este não está presente durante toda a gestação. SZCZEPANKIEWICZ et al. (2006) mostraram que o aumento de leptina circulante se inicia na segunda metade da gestação em ratas. Além disso, estudos realizados em humanos mostraram que o aumento da leptina se dá a partir da 10ª semana de gestação, mas que seu pico ocorre entre as semanas 20-30 (SATTAR et al., 1998). Dito

isso, podemos justificar a redução no consumo alimentar, e consequente redução do ganho de peso gestacional, observada após os primeiros dias da implantação da minipumb tanto das fêmeas controle quanto das SOCS3 KO, período em que as fêmeas estavam em estágios iniciais da gestação. Mostrando assim, que as fêmeas ainda são sensíveis à leptina em estágios iniciais da gestação.

Apesar das fêmeas SOCS3 KO terem apresentado resposta mais expressiva, com total ausência do aumento no consumo alimentar durante o período de gestação, as fêmeas controle mostraram uma pequena redução do consumo alimentar, que foi acompanhada por uma menor deposição de gordura, quando comparadas as fêmeas que não receberam infusão de leptina. Estes resultados são facilmente compreendidos, uma vez que a gestação não é caracterizada por total ausência da sensibilidade à leptina, e sim um quadro de resistência. Deixando em aberto a possibilidade das fêmeas controle ainda serem, de forma menos intensa, responsivas à ação de uma sobrecarga de leptina.

Quando avaliamos quais áreas centrais (hipotalâmicas e do tronco encefálico) poderiam justificar a maior sensibilidade à leptina observada nas fêmeas grávidas SOCS3 KO durante o ensaio crônico, pudemos constatar que nos núcleos ARH e VMH houve uma melhor capacidade de resposta à leptina. Estes núcleos hipotalâmicos estão relacionados com a regulação do balanço energético, e são áreas propensas a desenvolver resistência à leptina induzida por dietas ricas em gordura (ENRIORI et al, 2011; MÜNZBERG et al, 2004) e também durante a gestação (LADYMAN et al, 2012; LADYMAN; GRATTAN, 2005). Deste modo podemos sugerir que a resistência à leptina decorrente da gestação esteja relacionada ao aumento da expressão de SOCS3 especificamente em células que expressam o LepR nos núcleos ARH e VMH.

Também encontramos maior ativação de neurônios do PMV de fêmeas SOCS3 KO. O PMV é uma área hipotalâmica relacionada ao controle do ciclo estral e secreção de LH, tendo papel importante na maturação sexual e fertilidade (DONATO et al., 2009 e 2011b; DONATO; ELIAS, 2011). Estudos anteriores não observaram resistência à leptina nesta região hipotalâmica durante a gestação (NAGAISHI et al. 2014). Deste modo, acreditamos que a maior sensibilidade à leptina no PMV de fêmeas SOCS3 KO

possa ter lhes conferido alterações no tempo de desenvolvimento sexual, porém são necessários outros estudos para comprovar essa hipótese.

Além da resistência à leptina, sabe-se que a gravidez leva ao desenvolvimento da resistência à insulina (NORMAN; REYNOLDS, 2011). O controle glicêmico central se dá em áreas hipotalâmicas também envolvidas no balanço energético como no ARH (MORTON; SCHWARTZ, 2011; XU; ELMQUIST; FUKUDA, 2011). Inúmeros estudos já demonstraram haver uma interação entre o receptor de insulina e leptina, tendo o SOCS3 como um fator comum da sinalização intracelular com controle de retroalimentação negativa para ambos os receptores (HOWARD E FLIER, 2006). Deste modo, acreditamos que ao abolirmos a expressão de SOCS3 em células que expressam o LepR, também influenciaremos a sinalização promovida pela insulina, ao menos nessa população específica de células.

O quadro de resistência à insulina decorrente da gestação vem acompanhado por aumento da secreção de insulina (BARBOUR et al., 2007). Isto porque durante a gestação ocorre progressivamente hiperplasia das ilhotas pancreáticas responsáveis pela secreção desse hormônio na tentativa de contrapor a resistência à insulina que se instala durante este período (BUCHANAN et al., 2007). AMARAL et al. (2004) mostraram inclusive que um dos mecanismos responsáveis por promover a hiperplasia das ilhotas pancreáticas, bem como a sensibilidade à glicose durante a gestação, ocorre via o receptor de prolactina. No presente estudo, no entanto, não observamos aumento na concentração de insulina, nem nas fêmeas controle nem nas SOCS3 KO, pelo menos quando consideramos os níveis basais de insulina.

Também fizemos avaliação da concentração sérica de glucagon que, apesar de não ser estatisticamente diferente, apresentou forte tendência em ser menor nas fêmeas grávidas SOCS3 KO. MARROQUÍ et al. (2010) demonstraram a importância da leptina (via LepR) em células α -pancreáticas na diminuição da expressão de RNAm de glucagon via STAT3. TUDURI et al. (2009) também já haviam demonstrado anteriormente a ação da leptina diretamente em células α -pancreáticas, participando na hiperpolarização destas células e contribuindo com a redução da secreção de glucagon. Portanto, o fato de termos encontrado uma tendência de haver redução na produção de glucagon nas fêmeas SOCS3 KO pode estar relacionado à maior sensibilidade à leptina

em células α -pancreáticas. Interessantemente, os mesmos autores mostraram posteriormente que, apesar de a leptina exercer seu papel na secreção de glucagon, a ausência de seu receptor especificamente em células α -pancreáticas ($Gcg^{Cre}LepR^{flox}$) não impede a melhora na homeostase glicêmica de indivíduos com diabetes tipo 1 tratados com leptina (TUDURI et al., 2014). Estes estudos demonstram que, apesar de termos utilizado um animal que apresenta a deleção de SOCS3 em células que expressam o LepR, até periféricamente, a sinalização central da leptina deve exercer um papel fundamental na determinação da homeostase glicêmica.

Quando avaliamos a tolerância à glicose, não encontramos diferença entre as fêmeas controle e SOCS3 KO em situação Basal. Mas quando o mesmo teste foi realizado durante o período gestacional, foi observada maior tolerância à glicose nas fêmeas SOCS3 KO. E em teste posterior, foi constatado que estas mesmas fêmeas conseguiam manter níveis glicêmicos inferiores que as fêmeas controle secretando menor quantidade de insulina, sugerindo maior sensibilidade à insulina nas fêmeas SOCS3 KO grávidas, que também foi posteriormente comprovado no TTI. Deste modo, no presente estudo mostramos que a deleção de SOCS3 em células que expressam o LepR conferiu às fêmeas grávidas maior sensibilidade à insulina. Em estudos anteriores foi demonstrada a participação de neurônios POMC no controle glicêmico (BERGLUND et al., 2012; HUO et al., 2009). Sabendo-se que existe grande colocalização de LepR em neurônios POMC, acreditamos que a deleção de SOCS3, principalmente nesta população de neurônios, possa ter contribuído com a melhora do controle glicêmico observado nas fêmeas SOCS3 KO grávidas.

Sabe-se que a sinalização central da leptina modula a sensibilidade à insulina também em tecidos periféricos (BENOIT et al., 2009; BRIANCON et al., 2010; MIKI et al., 2001; PEDROSO et al., 2014.), e que a regulação da homeostase glicêmica pelos neurônios do hipotálamo requer a atividade dos canais K_{ATP} e é afetado por isoformas específicas da proteína quinase C (PKC) (BENOIT et al., 2009; CABOU et al., 2011; MIKI et al., 2001). Nossos dados mostraram redução da expressão da isoforma θ da PKC, que foi relacionada à redução da sensibilidade à insulina em trabalhos de BENOIT et al. (2009) e PEDROSO et al. (2014). BENOIT et al. (2009) observaram que o aumento na expressão de PKC θ hipotalâmico na membrana celular estaria envolvido

na sinalização da insulina e, adicionalmente, demonstraram que a deleção de PKC θ especificamente no ARH era eficiente em promover o aumento da sensibilidade à insulina. Em outro trabalho de nosso próprio grupo de estudo, também foi observado que a redução na expressão de PKC θ hipotalâmico vem acompanhada por maior sensibilidade à insulina em animais consumindo dieta rica em gordura (PEDROSO et al., 2014). Portanto, este é um mecanismo que pode ter contribuído com a maior sensibilidade à insulina central em fêmeas SOCS3 KO grávidas. Com relação aos canais K_{ATP}, no presente trabalho foi observado aumento na expressão da subunidade SUR2. Estudos de MIKI et al. (2001) mostraram a importância dos canais K_{ATP} no hipotálamo de camundongos. Ao deletarem a subunidade Kir6.2 exclusivamente no VMH, estes autores observaram completa perda na secreção de glucagon, e a incapacidade de sentir os níveis de glicose por estes neurônios se demonstrou extremamente importante para o controle glicêmico. Da mesma forma como anteriormente, PEDROSO et al. (2014) observaram o mesmo padrão de expressão gênica do presente trabalho em animais sem SOCS3 em células que expressam o LepR, expostos à dieta rica em gordura. Desta forma, podemos admitir que fêmeas SOCS3 KO grávidas possuem maior sensibilidade à leptina a nível hipotalâmico, o que pode ter contribuído com o aumento da sensibilidade à insulina sistêmica observada anteriormente. Parte desse efeito, pode ter ocorrido devido à uma maior capacidade dos neurônios em detectar variações nos níveis de glicose por meio dos canais K_{ATP}.

Além disso, estudos mostraram que a hiperpolarização de neurônios hipotalâmicos em resposta à leptina ou insulina é dependente dos canais K_{ATP}, e está envolvida na redução do consumo alimentar, ou seja, quanto maior a expressão deste canal menor o consumo alimentar em resposta à leptina ou insulina (OIU, 2014; SPANSWICK, 2000). Portanto, este é mais um mecanismo que pode ter contribuído com o menor consumo alimentar observado nas fêmeas SOCS3 KO.

Nossos dados indicam que as alterações na expressão de SOCS3 hipotalâmico durante a gravidez é responsável por induzir a resistência à insulina durante este período. E que estes efeitos envolvem mudanças na expressão de canal K_{ATP} e PKC θ no hipotálamo, levando a uma melhor capacidade de resposta à insulina no músculo esquelético. Realmente trabalhos anteriores já haviam demonstrado que não ocorre

resistência à insulina no tecido hepático, por outro lado, tem sido demonstrado que a gestação vem acompanhada por menor sensibilidade à insulina no músculo esquelético (CATALANO et al., 1992; CONNOLLY et al., 2007; GONZALEZ et al., 2002). Desta forma, foi bastante interessante termos encontrado maior responsividade à insulina somente no tecido muscular de fêmeas SOCS3 KO, indicando que o tecido que sabidamente desenvolve resistência à insulina durante a gestação está protegido nas fêmeas SOCS3 KO.

Trabalhos anteriores que investigaram as áreas hipotalâmicas envolvidas no controle glicêmico relacionaram o VMH como uma área importante na determinação da sensibilidade à insulina no tecido muscular esquelético (MINOKOSHI; HAQUE; SHIMAZU, 1999; MINOKOSHI; OKANO; SHIMAZU, 1994; TODA et al., 2013). MINOKOSHI, HAQUE e SHIMAZU (1999) mostraram que a infusão de leptina diretamente no VMH era capaz de aumentar a utilização de glicose pelo músculo esquelético, principalmente pelos músculos sóleo e gastrocnêmio, os mesmos músculos analisados no presente trabalho. Desta forma, podemos imaginar que o aumento da sensibilidade à leptina, observada anteriormente no VMH das fêmeas SOCS3 KO grávidas, também possa ter contribuído com a melhor sensibilidade à insulina observada no músculo esquelético, por meio de uma alça de regulação central.

Como mencionado anteriormente, além das alterações hormonais, a gestação vem acompanhada por uma adaptação na sensibilidade e secreção de insulina (BUCHANAN; XIANG, 2005), que possui grande importância na determinação da homeostase glicêmica da gestante. Um dos fatores que eventualmente contribuem para falhas neste controle são defeitos nas células β pancreáticas que não conseguem garantir a secreção de insulina necessária para este período, visto que esta precisa estar elevada para compensar o típico aumento da resistência à insulina (BUCHANAN, 2001; KAUTZKY-WILLER et al., 1997; RYAN et al., 1995). Deste modo, a forma de se estudar o diabetes gestacional que optamos por fazer foi promover a morte das células β pancreáticas (STECULORUM; BOURET, 2011).

Ao analisarmos as fêmeas que levaram a gestação à diante, além de termos observados menores valores de glicemia que as fêmeas não grávidas (que pode ser justificado pela hiperplasia das células β das ilhotas pancreáticas decorrente da

gestação – BUCHANAN; XIANG, 2005), pudemos constatar que a deleção condicional de SOCS3 foi um fator determinante na prevenção do desenvolvimento do diabetes, onde as fêmeas SOCS3 KO apresentaram valores inferiores de glicemia basal e maior tolerância à glicose. Estes resultados foram acompanhados por valores similares de secreção de insulina, indicando que o tratamento com STZ foi similar em ambos os grupos e que, mesmo produzindo a mesma quantidade de insulina que uma fêmea com diabetes gestacional, as fêmeas SOCS3 KO conseguem manter o controle glicêmico adequado.

Durante a revisão de literatura do presente trabalho já mencionamos a importância da obesidade na atualidade. E obviamente que a prevalência do diabetes gestacional vem aumentando proporcionalmente conforme a população feminina se torna mais obesa (CHU et al., 2007; IMOH; OCHEKE, 2014). Um dos complicadores que está presente nesta população é o aumento da ocorrência de abortos e abortos recorrentes (LIM; MAHMOOD, 2014; TALMOR; DUNPHY, 2014). Porém o mecanismo responsável por esta alteração ainda não está claro. Quando realizamos o paradigma do diabetes durante o período de gestação, também observamos grande percentual de perda gestacional independente do grupo experimental (controle=26% vs. SOCS3 KO=62%). Anteriormente, em fêmeas SOCS3 KO não tratadas com STZ, apresentaram maior número de reabsorções embrionárias que as fêmeas controle, e após o tratamento com STZ as fêmeas SOCS3 KO também apresentaram maior percentual de perdas gestacionais que as fêmeas controle, deixando ainda mais claro a dificuldade das fêmeas SOCS3 KO em manter o embrião.

Com relação às reabsorções embrionárias, após o tratamento com STZ o grupo controle passou a apresentar valores similares que aqueles encontrados nas fêmeas SOCS3 KO. Mais uma vez fica evidente que o aparecimento do SOCS3 no âmbito evolutivo contribui de forma positiva no balanço energético gestacional de forma a garantir um desenvolvimento embrionário adequado. Nestes experimentos pudemos notar que quando submetemos as fêmeas controle a um desafio (no caso o diabetes gestacional) encontramos o mesmo comprometimento na manutenção da gestação (número de embriões viáveis vs número de reabsorções embrionárias). Ou seja, em condições em que as fêmeas são saudáveis o aumento hipotalâmico na expressão de

SOCS3 é desejável, mas em condições “patológicas” (como foi o caso do diabetes gestacional), essa adaptação evolutiva agrava o desbalanço metabólico prejudicando a progressão da gestação.

Quando as fêmeas foram tratadas com STZ, mas não levaram à gestação a diante, pudemos constatar que a deleção condicional de SOCS3 pouco interferiu no desenvolvimento do diabetes, uma vez que as fêmeas apresentaram mesmos valores de glicemia e tolerância à glicose. Nesses casos, acreditamos que induzimos uma situação de diabetes mellitus do tipo 1, ao invés de diabetes gestacional. Nesse sentido, parece claro que a deleção de SOCS3 especificamente em células que expressam o LepR teria pouco efeito na prevenção da hiperglicemia em situações de diabetes tipo 1. Uma vez que estudos anteriores (MORI et al., 2007) mostraram que a deleção de SOCS3 especificamente em células β das ilhotas pancreáticas pode sim contribuir com a prevenção do desenvolvimento do diabetes do tipo 1 induzido por STZ, nossos dados podem indicar que não houve deleção de SOCS3 em células β . Ainda, em outros estudos (REZENDE et al., 2012) foi apresentado que o efeito protetor antiapoptótico do Fator Neurotrófico Ciliar (ciliary neurotrophic factor – CNTF) em células β também tratadas com STZ é dependente de SOCS3.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo identificou pela primeira vez, um mecanismo molecular chave responsável pela indução de alterações metabólicas observadas durante a gravidez. Nós demonstramos que camundongas grávidas apresentaram maior expressão SOCS3 no hipotálamo. E que a supressão de SOCS3 de células expressando LepR impede a hiperfagia induzida pela gravidez, a acúmulo de massa gorda e resistência à insulina, restaurando a sensibilidade à leptina. Notavelmente, as camundongas SOCS3 KO estão protegidas contra o diabetes gestacional.

Estes achados podem ter implicações importantes. A primeira é que as alterações metabólicas durante a gestação não são mera consequência das demandas energéticas do embrião/feto(s), mas são minuciosamente reguladas a fim de promover as melhores condições nutricionais fetais. Além disso, uma vez que as alterações hormonais típicas da gravidez não podem ser modificadas sem causar consequências indesejadas, a identificação de SOCS3 como uma proteína comum responsável por induzir alterações metabólicas promovidas pela gestação pode ajudar no desenvolvimento de terapias mais específicas e bem-sucedidas com o objetivo de prevenir e tratar doenças metabólicas durante a gravidez. Ressalta-se que não há terapia específica no tratamento de doenças metabólicas na gestação. Ademais, esse conhecimento também poderá contribuir no entendimento da fisiopatologia da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2, visto as similares entre o metabolismo de gestantes e de obesos e diabéticos

Os resultados da presente tese resultaram na publicação do seguinte artigo científico (Anexo C):

ZAMPIERI, THAIS T.; RAMOS-LOBO, ÂNGELA; FURIGO, ISADORA C.; PEDROSO, JOÃO A. B.; BUONFIGLIO, DANIELLA, C.; DONATO, JOSÉ JR. SOCS3 effects on leptin receptor-expressing cells orchestrate metabolic changes during pregnancy. *Molecular Metabolism*, v. 4, n. 3, p. 237-245, 2015.

8 ATIVIDADES COMPLEMENTARES

Paralelamente ao trabalho de doutorado, foram desenvolvidos trabalhos complementares que geraram os seguintes artigos:

BOHLEN, TABATA M. [†], SILVEIRA, MARINA A. [†], **ZAMPIERI, THAIS T.** [†], FRAZÃO, RENATA, DONATO, JOSÉ JR. Effects of leptin sensitivity in the timing of puberty of female mice. *Hormones and Behavior*. Sob revisão.

PEDROSO, JOÃO A. B., **ZAMPIERI, THAIS T.**, DONATO, JOSÉ JR. Reviewing the effects of L-leucine supplementation in the regulation of food intake, energy balance and glucose homeostasis. *Nutrients*. Sob revisão.

ZAMPIERI, THAIS T., PEDROSO, JOÃO A. B., FURIGO, ISADORA C., TIRAPEGUI, JULIO, DONATO, JOSÉ JR. Oral Leucine Supplementation Is Sensed by the Brain but neither Reduces Food Intake nor Induces an Anorectic Pattern of Gene Expression in the Hypothalamus. *Plos One*. v.8, p.e84094, 2013. PMID: 24349566

ZAMPIERI, THAIS T.[†], TORRES-LEAL, FRANCISCO[†], CAMPAÑA, AMANDA, LIMA, FABIO, DONATO, JOSÉ JR. I-Leucine Supplementation Worsens the Adiposity of Already Obese Rats by Promoting a Hypothalamic Pattern of Gene Expression that Favors Fat Accumulation. *Nutrients (Basel)*. v.6, p.1364-1373, 2014. PMID: 24699194

SILVA, REGINA P.[†], **ZAMPIERI, THAIS T.**[†], PEDROSO, JOÃO A. B., NAGAISHI, V.S., RAMOS-LOBO, ANGELA M., FURIGO, ISADORA, C., CÂMARA, NIELS O., FRAZÃO, RENATA, DONATO, JOSÉ JR. Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice. *Endocrinology*. 2014 PMID: 25144922.

NAGAISHI, VANESSA S., CARDINALI, LAIS I., **ZAMPIERI, THAIS T.**, FURIGO, ISADORA C., METZGER, M., DONATO, JOSÉ JR. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neuroscience*. v.259, p.71-83, 2014. PMID: 24316468

[†] Estes autores dividem a primeira autoria do trabalho.

REFERÊNCIAS*

- AHIMA, R. S. Revisiting leptin's role in obesity and weight loss. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 7, p. 2380–2383, 2008.
- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Leptin. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 62, p. 413-437, 2000.
- AMARAL, M. E. C.; CUNHA, D. A.; ANHÊ, G. F.; UENO, M.; CARNEIRO, E. M.; VELLOSO, L. A.; BORDIN, S.; BOSCHERO, A. C. Participation of Prolactin receptors and PI3-kinase and MAPK pathways in the increase of pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. **J. of Endocrinol.**, v.183, p. 455-467, 2004.
- ANDERSON, G. M.; BEIJER, P.; BANG, A. S.; FENWICK, M. A.; BUNN, S. J.; GRATTAN, D. R. Suppression of prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5b signaling and induction of suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat during late pregnancy and lactation. **Endocrinol.**, v. 147, p. 4996-5005, 2006.
- ATAWI, F. A.; WARSY, A. S.; BABAY, Z.; ADDAR, M. Leptin concentration during different stages of pregnancy. **Clin. Exp. Obstet. Gynecol.**, v. 31, p. 211-216, 2004.
- AUGUSTINE, R. A.; GRATTAN, D. R. Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1049-1055, 2008.
- AUGUSTINE, R. A.; LADYMAN, S. R.; GRATTAN, D. R. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. **J. Physiol.**, v. 586, n. 2, p. 387-397, 2008.
- BANKS, A. S.; DAVIS, S. M.; BATES, S. H.; MYERS, M. G. JR. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. **J. of Biol. Chem.**, v. 275, n. 19, p. 14563-14572, 2000.
- BANKS, W. A. The blood-brain barrier as a cause of obesity. **Curr. Pharm. Des.**, v. 14, n. 16, p. 1606-1614, 2008.
- BANNO, R.; ZIMMER, D.; DE JONGHE, B. C.; ATIENZA, M.; RAK, K.; YANG, W.; BENCE, K. K. PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. **J. of Clin. Invest.**, v. 1230, n. 3, p. 720-734, 2010.

---

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARBOUR, L. A.; MCCURDY, C. E.; HERNANDEZ, T. L.; KIRWAN, J. P.; CATALANO, P. M.; FRIEDMAN, J. E. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, Suppl. 2, p. S112-S119, 2007.

BATES, S. H.; STEARNS, W. H.; DUNDON, T. A.; SCHUBERT, M.; TSO, A. W.; WANG, Y.; BANKS, A. S.; LAVERY, H. J.; HAQ, A. K.; MARATOS-FLIER, E.; NEEL, B. G.; SCHWARTZ, M. W.; MYERS, M. G. JR. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. **Nature**, v. 421, p. 856-859, 2003.

BELL, A. W.; BAUMAN, D. E. Adaptations of glucose metabolism during pregnancy and lactation. **J. Mam. Gland Biol. Neopl.**, v. 2, p. 265-278, 1997.

BENCE, K. K.; DELIBEGOVIC, M.; XUE, B.; GORGUN, C. Z.; HOTAMISLIGIL, G. S.; NEEL, B. G.; KAHN, B. B. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. **Nature Med.**, v. 12, n. 8, p. 917-924, 2006.

BENOIT, S. C.; KEMP, C. J.; ELIAS, C. F.; ABPLANALP, W.; HERMAN, J. P.; MIGRENNE, S.; LEFEVRE, A. L.; CRUCIANI-GUGLIELMACCI, C.; MAGNAN, C.; YU, F.; et al. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. **J. Clin. Invest.**, v. 119, p. 2577-2589, 2009.

BERGLUND, E. D.; VIANNA, C. R.; DONATO, J. JR.; KIM, M. H.; CHUANG, J. C.; LEE, C. E.; LAUZON, D. A.; LIN, P.; BRULE, L. J.; SCOTT, M. M.; COPPARI, R.; ELMQUIST, J. K. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n. 3, p. 1000-1009, 2012.

BJØRBAEK, C.; BUCHHOLZ, R. M.; DAVIS, S. M.; BATES, S. H.; PIERROZ, D. D.; GU, H.; NEEL, B. G.; MYERS, M. G. JR.; FLIER, J. S. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. **J. of Biol. Chem.**, v. 276, n. 7, p. 4747-4755, 2001.

BJØRBAEK, C.; EL-HASCHIMI, K.; FRANTZ, J. D.; FLIER, J. S. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 30059-30065, 1999.

BJØRBAEK, C.; ELMQUIST, J. K.; FRANTZ, J. D.; SHOELSON, S. E.; FLIER, J. S. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. **Mol. Cell.**, v. 1, n. 4, p. 619-625, 1998.

BREWER, M. M.; BATES, M. R.; VANNOY, L. P. Postpartum changes in maternal weight and body fat depots in lactation vs non-lactating women. **Am. J. of Clin. Nutr.**, v. 49, p. 259-265, 1989.

BRIANCON, N.; MC NAY, D. E.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J. S. Combined neural inactivation of suppressor of cytokine signaling-3 and protein-tyrosine phosphatase-1B reveals additive, synergistic, and factor-specific roles in the regulation of body energy balance. **Diabetes**, v. 59, p. 3074-3084, 2010.

BROGAN, R. S.; GROVE, K. L.; SMITH, M. S. Differential regulation of leptin receptor but not orexin in the hypothalamus of the lactating rat. **J. Neuroendocrinol.**, v. 12, n. 11, p. 1077-1086, 2000.

BUCHANAN, T. A.; XIANG, A.; KJOS, S. L.; WATANABE, R. What is gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30, Suppl 2, p. S105-S111, 2007.

CABOU, C.; VACHOUX, C.; CAMPISTRON, G.; DRUCKER, D. J.; BURCELIN, R. Brain GLP-1 Signaling Regulates Femoral Artery Blood Flow and Insulin Sensitivity Through Hypothalamic PKC- δ . **Diabetes**, v. 60, p. 2245-2256, 2011.

CATALANO, P. M.; TYZBIR, E. D.; WOLFE, R. R.; ROMAN, N. M.; AMINI, S. B.; SIMS, E. A. Longitudinal changes in basal hepatic glucose production and suppression during insulin infusion in normal pregnant women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 167, p. 913-919, 1992.

CHEN, P.; SMITH, M. S. Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin. **Endocrinol.**, v. 145, p. 823-829, 2004.

COMNINOS, A. N.; JAYASENA, C. N.; DHILLO, W. S. The relationship between gut and adipose hormones, and reproduction. **Hum. Reprod. Update.**, v. 20, n. 2, p. 153-174, 2014.

CONNOLLY, C. C.; PAPA, T.; SMITH, M. S.; LACY, D. B.; WILLIAMS, P. E.; MOORE, M. C. Hepatic and muscle insulin action during late pregnancy in the dog. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, p. R447-R452, 2007.

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, n. 5, p. 292-295, 1996.

CORNIER, M. A. Is your brain to blame for weight regain? **Physiol. Behav.**, v. 104, n. 4, p. 608-612, 2011.

COWLEY, M. A.; SMART, J. L.; RUBINSTEIN, M.; CERDÁN, M. G.; DIANO, S.; HORVATH, T. L.; CONE, R. D.; LOW, M. J. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 480-484, 2001.

CRAIG, J.; ZHU, H.; DYCE, P. W.; PETRIK, J.; LI, J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 5355-5363, 2004.

CROWLEY, W. R.; RAMOZ, G.; TORTO, R.; KEEFE, K. A.; WANG, J. J.; KALRA, S. P. Neuroendocrine actions and regulation of hypothalamic neuropeptide Y during lactation. **Peptides**, v. 28, n. 2, p. 447-452, 2007.

CUI, Y.; HUANG, L.; ELEFTERIOU, F.; YANG, G.; SHELTON, J. M.; GILES, J. E.; OZ, O. K.; POURBAHRAMI, T.; LU, C. Y.; RICHARDSON, J. A.; KARSENTY, G.; LI, C. Essential role of STAT3 in body weight and glucose homeostasis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, p. 258-269, 2004.

DEFALCO, J.; TOMISHIMA, M.; LIU, H.; ZHAO, C.; CAI, X.; MARTH, J. D.; ENQUIST, L.; FRIEDMAN, J. M. Virus-Assisted Mapping of Neural Inputs to a Feeding Center in the Hypothalamus. **Science**, v. 291, p. 2608-2613, 2001.

DEWEY, K. G.; HEINING, M. J.; NOMMSEN, L. A. Maternal weight-loss patterns during prolonged lactation. **Am. J. of Clin. Nutri.**, v. 58, p. 162-166, 1993.

DONATO, J. JR.; CRAVO, R. M.; FRAZÃO, R.; ELIAS, C. F. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. **Neuroendocrinology**, v. 93, n. 1, p. 9-18, 2011a.

DONATO, J. JR.; ELIAS, C. F. The ventral premammillary nucleus links metabolic cues and reproduction. **Front. Endocrinol. (Lausanne)**, v. 2, p. 57, 2011.

DONATO, J. JR.; FRAZÃO, R.; ELIAS, C. F. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. **Arq. Br. de Endocrinol. e Metab.**, v. 54, p. 591-602, 2010.

DONATO, J. JR.; SILVA, R. J.; SITA, L. V.; LEE, S.; LEE, C.; LACCHINI, S.; BITTENCOURT, J. C.; FRANCI, C. R.; CANTERAS, N. S.; ELIAS, C. F. The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. **J. Neurosci.**, v. 29, n. 16, p. 5240-5250, 2009.

DONATO, J. JR.; LEE, C.; RATRA, D. V.; FRANCI, C. R.; CANTERAS, N. S.; ELIAS, C. F. Lesions of the ventral premammillary nucleus disrupt the dynamic changes in Kiss1 and GnRH expression characteristic of the proestrus-estrus transition. **Neuroscience**, v. 241, p. 67-79, 2013.

DONATO, J. JR.; CRAVO, R. M.; FRAZÃO, R.; GAUTRON, L.; SCOTT, M. M.; LACHEY, J.; CASTRO, I. A.; MARGATHO, L. O.; LEE, S.; LEE, C. RICHARDSON, J. A., FRIEDMAN, J., CHUA, S. JR., COPPARI, R., ZIGMAN, J. M.; ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 1, p. 355-368, 2011b.

DUGGAL, P. S.; VAN DER HOEK, K. H.; MILNER, C. R.; RYAN, N. K.; ARMSTRONG, D. T.; MAGOFFIN, D. A.; NORMAN, R. J. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. **Endocrinology**, v. 141, n. 6 p. 1971-1976, 2000.

DUNN, S. L.; BATES, S. H.; CHEN, Z.; SEIFERT, M.; MYERS, M. G. JR. Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. **Mol. Endocrinol.**, v. 19, p. 925-938, 2005.

ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, W.; COLLINS, S.; LOY, A. L.; NORMANDIN, D.; CHENG, A.; HIMMS-HAGEN, J.; CHAN, C. C.; RAMACHANDRAN, C.; GRESSER, M. J.; TREMBLAY, M. L.; KENNEDY, B. P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1544-1548, 1999.

EL-HASCHIMI, K.; PIERROZ, D. D.; HILEMAN, S. M.; BJORBAEK, C.; FLIER, J. S. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 1827-1832, 2000.

EL-HEFNAWY, T.; IOFFE, S.; DYM, M. Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2624-2630, 2000.

ELMQUIST, J. K.; BJØRBAEK, C.; AHIMA, R. S.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 395, n. 4, p. 535-547, 1998.

ELMQUIST, J. K.; COPPARI, R.; BALTHASAR, N.; ICHINOSE, M.; LOWELL, B. B. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. **J. Comp. Neurol.**, v. 493, n. 1, p. 63-71, 2005.

ENRIORI, P. J.; SINNAYAH, P.; SIMONDS, S. E.; GARCIA RUDAZ, C.; COWLEY, M. A. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. **J. Neurosc.**, v. 31, p. 12189-12197, 2011.

FARIAS, M. M.; CUEVAS, A. M.; RODRIGUEZ, F. Set-point theory and obesity. **Metab. Syndr. Relat. Disord.**, v. 9, n. 2, p. 85-89, 2011.

FAROOQ, R.; LUTFULLAH, S.; AHMED, M. Serum leptin levels in obese infertile men and women. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 27, n. 1, p. 67-71, 2014.

FORHEAD, A. J.; FOWDEN, A. L. The hungry fetus? Role of leptin as a nutritional signal before birth. **J. Physiol.**, v. 587, n. 6, p. 1145-1152, 2009.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763-770, 1998.

GABBE, S. G.; GRAVES, C. R. Management of diabetes mellitus complicating pregnancy. **Obstet. Gynecol.**, v. 102, n. 4, p. 857-868, 2003.

GAMBER, K. M.; HUO, L.; HA, S.; HAIRSTON, J. E.; GREELEY, S.; BJØRBAEK, C. Over-expression of leptin receptors in hypothalamic POMC neurons increases susceptibility to diet-induced obesity. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30485, 2012.

GARCIA, M. C.; LOPEZ, M.; GUALILLO, O.; SEOANE, L. M.; DIEGUEZ, C.; SENARIS, R. M. Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. **FASEB J.**, v. 17, p. 1392-1400, 2003.

GARCIA-GALIANO, D.; ALLEN, S. J.; ELIAS, C. F. Role of the adipocyte-derived hormone leptin in reproductive control. **Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.**, v. 19, n. 3, p. 141-149, 2014.

GONZALEZ, C. G.; ALONSO, A.; BALBIN, M.; DIAZ, F.; FERNANDEZ, S.; PATTERSON, A. M. Effects of pregnancy on insulin receptor in liver, skeletal muscle and adipose tissue of rats. **Gynecol. Endocrinol.**, v. 16, p. 193-205, 2002.

GRATTAN, D. R.; LADYMAN, S. R.; AUGUSTINE, R. A. Homonal induction of leptin resistance during pregnancy. **Physiol. Behav.**, v. 91, p. 366-374, 2007.

GRATTAN, D. R.; STEYN, F. J.; KOKAY, I. C.; ANDERSON, G. M.; BUNN, S. J. Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion. **J. Neuroendocrinol.**, v. 20, p. 497-507, 2008.

HAGAN, M. M.; RUSHING, P. A.; SCHWARTZ, M. W.; YAGALOFF, K. A.; BURN, P.; WOODS, S. C.; SEELEY, R. J. Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 2362-2367, 1999.

HÂKANSSON, M. L.; BROWN, H.; GHILARDI, N.; SKODA, R. C.; MEISTER, B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. **J. Neurosci.**, v. 18, n. 1, p. 559-572, 1998.

HANLEY, B.; DIJANE, J.; FEWTRELL, M.; GRYNBERG, A.; HUMMEL, S.; JUNIEN, C.; KOLETZKO, B.; LEWIS, S.; RENZ, H.; SYMONDS, M.; GROS, M.; HARTHOORN, L.; MACE, K.; SAMUELS, F.; VAN DER BEEK, E. M. Metabolic imprinting, programming and epigenetics - a review of present priorities and future opportunities. **Br. J. Nutr.**, v. 104, Suppl 1, p. S1-S25, 2010.

HARRIS, R. B. Role of set-point theory in regulation of body weight. **FASEB J.**, v. 4, n. 15, p. 3310-3318, 1990.

HERRID, M.; O'SHEA, T.; MCFARLANE, JR. Ontogeny of leptin and its receptor expression in mouse testis during the postnatal period. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 75, n. 5, p. 874-880, 2008.

HILL, J. W.; WILLIAMS, K. W.; YE, C.; LUO, J.; BALTHASAR, N.; COPPARI, R.; COWLEY, M. A.; CANTLEY, L. C.; LOWELL, B. B.; ELMQUIST, J. K. Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 1796-1805, 2008.

HOWARD, J. K.; CAVE, B. J.; OKSANEN, L. J.; TZAMELI, I.; BJORBAEK, C.; FLIER, J. S. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. **Nat. Med.**, v. 10, p. 734-738, 2004.

HOWARD, J. K.; FLIER, J. S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **TRENDS in Endocrinol. and Metab.**, v. 17, n. 9, p. 365-371, 2006.

HUO, L.; GAMBER, K.; GREELEY, S.; SILVA, J.; HUNTOON, N.; LENG, X. H.; BJØRBAEK, C. Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons. **Cell. Metab.**, v. 9, n. 6, p. 537-547, 2009.

ISHIKAWA, T.; FUJIOKA, H.; ISHIMURA, T.; TAKENAKA, A.; FUJISAWA, M. Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. **Andrology**, v. 39, n. 1, p. 22-27, 2007.

JANNEY, C. A.; ZHANG, D.; SOWERS, M. Lactation and weight retention. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 66, p. 1116-1124, 1997.

JIAN-GUO, C.; GANG-BING, T.; DE-HUA, W. Hypothalamic neuropeptides, not leptin sensitivity, contributes to the hyperphagia in lactating Brandt's voles, *Lasiopodomys brandtii*. **J. Exper. Biol.**, v. 214, p. 2242-2247, 2011.

JO, H. H.; HWANG, S. J.; KIM, M. R.; KIM, J. H.; LEW, Y. O.; LIM, Y. T.; LIM, E. J.; KIM, J. H. Correlation between the duration of labor and leptin concentration in cord blood. **Korean J. Obstet. Gynecol.**, v. 48, n. 3, p. 709-715, 2005.

JOHNSTONE, L. E.; HIGUCHI, T. Food intake and leptin during pregnancy and lactation. **Prog. Brain Res.**, v. 133, p. 215-227, 2001.

KABIRU, W.; RAYNOR, B. D. Obstetric outcomes associated with increase in BMI category during pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 191, n. 3, p. 928-932, 2004.

KAC, G.; BENICIO, M. H.; VELÁSQUEZ-MELENDÉZ, G.; VALENTE, J. G.; STRUCHINER, C. J. Breastfeeding and postpartum weight retention in a cohort of Brazilian woman. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 3, p. 487-493, 2004.

KARLSSON, C.; LINDELL, K.; SVENSSON, E.; BERGH, C.; LIND, P.; BILLIG, H.; CARLSSON, L. M.; CARLSSON, B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 12, p. 4144-4148, 1997.

KATHLEEN, H.; SILVIA, C.; LUCILLA, P.; ASSCHE, F. A. V. Diet-induced obesity in the rat: A model for gestational diabetes mellitus. **Am. J. Obst. and Gynecol.**, v. 190, p. 858-865, 2004.

KHORRAM, O.; DEPALATIS, L. R.; MCCANN, S. M. Changes in hypothalamic and pituitary content of immunoreactive alpha-melanocyte-stimulating hormone during the gestational and postpartum periods in the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 177, p. 318-326, 1984.

KIEVIT, P.; HOWARD, J. K.; BADMAN, M. K.; BALTHASAR, N.; COPPARI, R.; MORI, H.; LEE, C. E.; ELMQUIST, J. K.; YOSHIMURA, A.; FLIER, J. S. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. **Cell Metab.**, v. 2, p. 123-132, 2006.

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. **Biol. Reprod.**, v. 65, n. 1, p. 66-71, 2001.

KING, J. C. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 26, p. 271-291, 2006.

KITAWAKI, J.; KUSUKI, I.; KOSHIBA, H.; TSUKAMOTO, K.; HONJO, H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 5, n. 8, p. 708-713, 1999.

KLAMAN, L. D.; BOSS, O.; PERONI, O. D.; KIM, J. K.; MARTINO, J. L.; ZABOLOTNY, J. M.; MOGHAL, N.; LUBKIN, M.; KIM, Y. B.; SHARPE, A. H.; STRICKER-KRONGRAD, A.; SHULMAN, G. I.; NEEL, B. G.; KAHN, B. B. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, n. 15, p. 5479-5489, 2000.

KÖNNER, A. C.; JANOSCHEK, R.; PLUM, L.; JORDAN, S. D.; ROTHER, E.; MA, X.; XU, C.; ENRIORI, P.; HAMPEL, B.; BARSH, G. S.; KAHN, C. R.; COWLEY, M. A.; ASHCROFT, F. M.; BRÜNING, J. C. Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. **Cell. Metab.**, v. 5, n. 6, p. 438-449, 2007.

KOTA, S. K.; GAYATRI, K.; JAMMULA, S.; KOTA, S. K.; KRISHNA, S. V.; MEHER, L. K.; MODI, K. D. Endocrinology of parturition. **Indian J. Endocrinol. Metab.**, v. 17, n. 1, p. 50-59, 2013.

KRAJEWASKA, M.; BANARES, S.; ZHANG, E. E.; HUANG, X.; SCADENG, M.; JHALA, U. S.; FENG, G. S.; KRAJEWSKI, S. Development of diabetes in mice with neuronal deletion of Shp2 tyrosine phosphatase. **Am. J. Pathol.**, v. 172, n. 5, p. 1312-1324, 2008.

KREBS, D. L.; HILTON, D. J. A new role for SOCS in insulin action. **Sci. STKE**, v. 169, p. PE6, 2003.

KREBS, D. L.; HILTON, D. J. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. **Stem Cells**, v. 19, p. 378-387, 2001.

KRISHNAMOORTHY, U.; SCHRAM, C. M.; HILL, S. R. Maternal obesity in pregnancy: is it time for meaningful research to inform preventive and management strategies? **B.J.O.G.**, v. 113, p. 1134-1140, 2006.

LADYMAN, S. R. Leptin resistance during pregnancy in the rat. **J. Neuroendocrinol.**, v. 20, p. 269-277, 2008.

LADYMAN, S. R.; AUGUSTINE, R. A.; GRATTAN, D. R. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. **J. Neuroendocrinol.**, v. 22, p. 805-817, 2010.

LADYMAN, S. R.; FIELDWICK, D. M.; GRATTAN, D. R. Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse. **Reproduction**, v. 144, p. 83-90, 2012.

LADYMAN, S. R.; GRATTAN, D. R. Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy. **Endocrinology**, v. 145, p. 3704-3711, 2004.

LADYMAN, S. R.; GRATTAN, D. R. Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. **Endocrinology**, v. 146, p. 3868-3874, 2005.

LEIBEL, R. L.; ROSENBAUM, M.; HIRSCH, J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 10, p. 621-628, 1995.

LEONARD, W. J.; O'SHEA, J. J. Jaks and STATs: biological implications. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 293-322, 1998.

LI, G.; LIU, X.; ZHU, H.; HUANG, L.; LIU, Y.; MA, C.; QIN, C. Insulin Resistance in Insulin-Resistant and Diabetic Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Is Associated with Abnormal Hepatic Expression of Genes Involved in Lipid and Glucose Metabolism. **Compar. Med.**, v. 59, n. 5, p. 449-458, 2009.

LI, Z.; CECCARINI, G.; EISENSTEIN, M.; TAN, K.; FRIEDMAN, J. M. Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor. **Mol. Metab.**, v. 2, n. 4, p. 364-375, 2013.

LI, Z.; ZHOU, Y.; CARTER-SU, C.; MYERS, M. G. JR.; RUI, L. SH2B1 enhances leptin signaling by both Janus kinase 2 Tyr813 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, n. 9, p. 2270-2281, 2007.

LINNE, Y.; BARCKELING, B.; RÖSSNER, S. Long term weight development after pregnancy. **Obes. Rev.**, v. 3, p. 75-83, 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOH, K.; FUKUSHIMA, A.; ZHANG, X.; GALIC, S.; BRIGGS, D.; ENRIORI, P. J.; SIMONDS, S.; WIEDE, F.; REICHENBACH, A.; HAUSER, C.; SIMS, N. A.; BENCE, K. K.; ZHANG, S.; ZHANG, Z. Y.; KAHN, B. B.; NEEL, B. G.; ANDREWS, Z. B.; COWLEY, M. A.; TIGANIS, T. Elevated hypothalamic TCPTP in obesity contributes to cellular leptin resistance. **Cell Metab.**, v. 14, n. 5, p. 684-699, 2011.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R. E.; LEE, G. H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S.; et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nat. Med.**, v. 1, n. 11, p. 1155-1161, 1995.

MALABU, U. H.; KILPATRICK, A.; WARE, M.; VERNON, R. G.; WILLIAMS, G. Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of lactating rats: possible relationship to hyperphagia and adaptive changes in energy balance. **Peptides**, v. 15, n. 1, p. 83-87, 1994.

MALIK, N. M.; CARTER, N. D.; MURRAY, J. F.; SCARAMUZZI, R. J.; WILSON, C. A.; STOCK, M. J. Leptin requirement for conception, implantation, and gestation in the mouse. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5198-5202, 2001.

MAMUN, A. A.; KINARIVALA, M.; O'CALLAGHAN, M. J.; WILLIAMS, G. M.; NAJMAN, J. M.; CALLAWAY, L. K. Associations of excess weight gain during pregnancy with long-term maternal overweight and obesity: evidence from 21 y postpartum follow-up. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 91, p. 1336-1341, 2010.

MANTZOS, F.; VANAKARA, P.; SAMARA, S.; WOZNIAK, G.; KOLLIA, P.; MESSINIS, I.; HATZITHEOFILOU, C. Leptin receptor expression in neoplastic and normal ovarian and endometrial tissue. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v. 32, n. 1, p. 84-86, 2011.

MARINE, J. C.; MCKAY, C.; WANG, D.; TOPHAM, D. J.; PARGANAS, E.; NAKAJIMA, H.; PENDEVILLE, H.; YASUKAWA, H.; SASAKI, A.; YOSHIMURA, A.; IHLE, J. N. SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. **Cell**, v. 98, n. 5, p. 617-627, 1999.

MARROQUÍ, L.; VIEIRA, E.; GONZALEZ, A.; NADAL, A.; QUESADA, I. Leptin downregulates expression of the gene encoding glucagon in alphaTC1-9 cells and mouse islets. **Diabetology**, v. 54, n. 4, p. 843-51, 2011.

MARTIN, A. M.; BERGER, H.; NISENBAUM, R.; LAUSMAN, A. Y.; MACGARVIE, S.; CRERAR, C.; RAY, J. G. Abdominal visceral adiposity in the first trimester predicts glucose intolerance in later pregnancy. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1308-1310, 2009.

MATSUOKA, T.; TAHARA, M.; YOKOI, T.; MASUMOTO, N.; TAKEDA, T.; YAMAGUCHI, M.; TASAKA, K.; KURACHI, H.; MURATA, Y. Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 256, n. 3, p. 480-484, 1999.

MAURES, T. J.; KURZER, J. H.; CARTER-SU, C. SH2B1 (SH2-B) and JAK2: a multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. **Trends Endocrinol. and Metab.**, v. 18, n. 1, p. 38-45, 2007.

MERCER, J. G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L. M.; LAWRENCE, C. B.; HANNAH, L. T.; TRAYHURN, P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant

(Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Lett.**, v. 387, n. 2-3, p. 113-116, 1996.

MESIANO, S.; WELSH, T. N. Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition. **Semin. Cell. Dev. Biol.**, v. 18, n. 3, p. 321-331, 2007.

MIKI, T.; LISS, B.; MINAMI, K.; SHIUCHI, T.; SARAYA, A.; KASHIMA, Y.; HORIUCHI, M.; ASHCROFT, F.; MINOKOSHI, Y.; ROEPER, J., et al. ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. **Nature Neurosc.**, v. 4, p. 507-512, 2001

MINOKOSHI, Y.; HAQUE, M. S.; SHIMAZU, T. Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. **Diabetes**, v. 48, n. 2, p. 287-291, 1999.

MINOKOSHI, Y.; OKANO, Y.; SHIMAZU, T. Regulatory mechanism of the ventromedial hypothalamus in enhancing glucose uptake in skeletal muscles. **Brain. Res.**, v. 649, n. 1-2, p. 343-347, 1994.

MISRA, V. K.; STRAUGHEN, J. K.; TRUDEAU, S. Maternal serum leptin during pregnancy and infant birth weight: the influence of maternal overweight and obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 5, p. 1064-1069, 2013.

MORI, H.; HANADA, T.; AKI, D.; MASHIMA, R.; NISHINAKAMURA, H.; TORISU, T.; CHIEN, K. R.; YASUKAWA, H. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. **Nature Med.**, v. 10, p. 739-743, 2004.

MORI, H.; SHICHITA, T.; YU, Q.; YOSHIDA, R.; HASHIMOTO, M.; OKAMOTO, F.; TORISU, T.; NAKAYA, M.; KOBAYASHI, T.; TAKAESU, G.; YOSHIMURA, A. Suppression of SOCS3 expression in the pancreatic beta-cell leads to resistance to type 1 diabetes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 359, n. 4, p. 952-958, 2007.

MORRIS, D. L.; AND RUI, L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 297, p. E1247-E1259, 2009.

MORRISON, C. D.; MORTON, G. J.; NISWENDER, K. D.; GELLING, R. W.; SCHWARTZ, M. W. Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 289, p. E1051-E1057, 2005.

MORRISON, C. D.; MORTON, G. J.; NISWENDER, K. D.; GELLING, R. W.; SCHWARTZ, M. W. Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 289, n. 6, p. E1051-E1057, 2005.

MORTON, G. J.; GELLING, R. W.; NISWENDER, K. D.; MORRISON, C. D.; RHODES, C. J.; SCHWARTZ, M. W. Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-

OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. **Cell. Metab.**, v. 2, p. 411-420, 2005.

MORTON, G. J.; SCHWARTZ, M. W. Leptin and the CNS Control of Glucose Metabolism. **Physiol. Rev.**, v. 91, n. 2, p. 389-411, 2011.

MOUNZIH, K.; QIU, J.; EWART-TOLAND, A.; CHEHAB, F. F. Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. **Endocrinology**, v. 139, p. 5259-5262, 1998.

MUNZBERG, H.; FLIER, J. S.; BJØRBAEK, C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. **Endocrinology**, v. 145, p. 4880-4889, 2004.

MUNZBERG, H.; MYERS, M. G. JR. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nat. Neurosci.**, v. 8, p. 566-570, 2005.

MYERS, M. P.; ANDERSEN, J. N.; CHENG, A.; TREMBLAY, M. L.; HORVATH, C. M.; PARISIEN, J. P.; SALMEEN, A.; BARFORD, D.; TONKS, N. K. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 51, p. 47771-47774, 2001.

NAGAISHI, V. S.; CARDINALI, L. I.; ZAMPIERI, T. T.; FURIGO, I. C.; METZGER, M.; DONATO, J. JR. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. **Neuroscience**, v. 259, p. 71-83, 2014.

NAKA, T.; NARAZAKI, M.; HIRATA, M.; MATSUMOTO, T.; MINAMOTO, S.; AONO, A.; NISHIMOTO, N.; KAJITA, T.; TAGA, T.; YOSHIZAKI, K.; AKIRA, S.; KISHIMOTO, T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. **Nature**, v. 387, p. 924-929, 1997.

NEHRING, I.; SCHMOLL, S.; BEYERLEIN, A.; HAUNER, H.; VON KRIES, R. Gestational weight gain and long-term postpartum weight retention: a meta-analysis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 94, p. 1225-1231, 2011.

NISHI, M.; WERNER, E. D.; OH, B. C.; FRANTZ, J. D.; DHE-PAGANON, S.; HANSEN, L.; et al. Kinase activation through dimerization by human SH2-B. **Mol. Cell. Biol.**, v. 25, n. 7, p. 2607-2621, 2005.

NISWENDER, K. D.; MORTON, G. J.; STEARNS, W. H.; RHODES, C. J.; MYERS, M. G. JR.; SCHWARTZ, M. W. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. **Nature**, v. 413, p. 794-795, 2001.

NORMAN, J. E.; REYNOLDS, R. M. The consequences of obesity and excess weight gain in pregnancy. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 70, n. 4, p. 450-456, 2011.

NUAMAH, M. A.; YURA, S.; SAGAWA, N.; ITOH, H.; MISE, H.; KORITA, D.; KAKUI, K.; TAKEMURA, M.; OGAWA, Y.; NAKAO, K.; FUJII, S. Significant increase in maternal

plasma leptin concentration in induced delivery: a possible contribution of pro-inflammatory cytokines to placental leptin secretion. **Endocr. J.**, v. 51, n. 2, p. 177-187, 2004.

NUCCI, L. B.; SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; FUCHS, S. C.; FLECK, E. T.; BRITTO, M. M. S. Nutritional status of pregnant women: prevalence and associated pregnancy outcomes. **Rev. Saúde Pública**, v. 35, n. 6, p. 502-507, 2001.

O'SULLIVAN, J. B. The Boston Gestational Diabetes Studies: Review and Perspectives. In: SUTHERLAND, H. W. et al. **Carbohydrate Metabolism in Pregnancy and the Newborn IV**, Berlin: Springer-Verlag, 1989. p. 287-294.

O'BRIEN, T. E.; RAY, J. G.; CHAN, W. S. Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. **Epidemiology**, v. 14, n. 3, p. 368-374, 2003.

OH, H. K.; CHOI, Y. S.; YANG, Y. I.; KIM, J. H.; LEUNG, P. C.; CHOI, J. H. Leptin receptor is induced in endometriosis and leptin stimulates the growth of endometriotic epithelial cells through the JAK2/STAT3 and ERK pathways. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 19, n. 3, p. 160-168, 2013.

OHLIN, A.; ROSSNER, S. Maternal body weight development after pregnancy. **Int. J. Obes.**, v. 14, p. 159-173, 1990.

PANTASRI, T.; NORMAN, R. J. The effects of being overweight and obese on female reproduction: a review. **Gynecol. Endocrinol.**, v. 30, n. 2, p. 90-94, 2014.

PEDROSO, J. A.; BUONFIGLIO, D. C.; CARDINALI, L. I.; FURIGO, I. C.; RAMOS-LOBO, A. M.; TIRAPEGUI, J.; ELIAS, C. F.; DONATO, J. JR. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. **Mol. Metab.**, v. 3, p. 608-618, 2014.

PÉREZ-PÉREZ, A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; MAYMÓ, J.; DUEÑAS, J. L.; VARONE, C.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Role of leptin in female reproduction. **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 53, n. 1, p. 15-28, 2015.

POTTER, S.; HANNUM, S.; MCFARLIN, B.; ESSEX-SORLIE, D.; CAMPBELL, E.; TRUPIN, S. Does infant feeding method influence maternal postpartum weight loss? **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 91, p. 441-446, 1991.

QIU, C.; WILLIAMS, M. A.; VADACHKORIA, S.; FREDERICK, I. O.; LUTHY, D. A. Increased maternal plasma leptin in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus. **Obstet. Gynecol.**, v. 103, p. 519-525, 2004.

RAMOS, M. P.; RUEDA, B. R.; LEAVIS, P. C.; GONZALEZ, R. R. Leptin serves as an upstream activator of an obligatory signaling cascade in the embryo-implantation process. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 694-701, 2005.

REN, D.; LI, M.; DUAN, C.; RUI, L. Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice. **Cell Metab.**, v. 2, p. 95-104, 2005.

REZENDE, L. F.; SANTOS, G. J.; CARNEIRO, E. M.; BOSCHERO, A. C. Ciliary neurotrophic factor protects mice against streptozotocin-induced type 1 diabetes through SOCS3: the role of STAT1/STAT3 ratio in β -cell death. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 50, p. 41628-41639, 2012.

ROBERTS, A. W.; ROBB, L.; RAKAR, S.; HARTLEY, L.; CLUSE, L.; NICOLA, N. A.; METCALF, D.; HILTON, D. J.; ALEXANDER, W. S. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 9324-9329, 2001.

ROCHA, M.; BING, C.; WILLIAMS, G.; PUERTA, M. Pregnancy-induced hyperphagia is associated with increased gene expression of hypothalamic agouti-related peptide in rats. **Regul. Pept.**, v. 114, p. 159-165, 2003.

RODE, L.; NILAS, L.; WØJDEMAN, K.; TABOR, A. Obesity-related complications in Danish single cephalic term pregnancies. **Obstet. Gynecol.**, v. 105, n. 3, p. 537-542, 2005.

ROONEY, B. L.; SCHAUBERGER, C. W. Excess pregnancy weight gain and long-term obesity: One decade later. **Obstet. Gynecol.**, v. 100, n. 2, p. 245-252, 2002.

ROUSSO-NOORI, L.; KNOBLER, H.; LEVY-APTER, E.; KUPERMAN, Y.; NEUFELD-COHEN, A.; KESHET, Y.; AKEPATI, V. R.; KLINGHOFFER, R. A.; CHEN, A.; ELSON, A. Protein tyrosine phosphatase epsilon affects body weight by downregulating leptin signaling in a phosphorylation-dependent manner. **Cell Metab.**, v. 13, n. 5, p. 562-72, 2011.

RUIZ-CORTÉS, Z. T.; MEN, T.; PALIN, M. F.; DOWNEY, B. R.; LACROIX, D. A.; MURPHY, B. D. Porcine leptin receptor: molecular structure and expression in the ovary. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 56, n. 4, p. 465-474, 2000.

RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J.; INGRAM, C. D. Brain preparations for maternity-adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation: An overview. **Prog. Brain Res.**, v. 133, p. 1-38, 2001.

RYAN, E. A.; O'SULLIVAN, M. J.; SKYLER, J. S. Insulin action during pregnancy. Studies with the euglycemic clamp technique. **Diabetes**, v. 34, p. 380-389, 1985.

SARWER, D. B.; ALLISON, K. C.; GIBBONS, L. M.; MARKOWITZ, J. T.; NELSON, D. B. Pregnancy and obesity: a review and a agenda for future research. **J. Wom. Health**, v. 15, p. 720-733, 2006.

SATTAR, N.; GREER, I. A.; PIRWANI, I.; GIBSON, J.; WALLACE, A. M. Leptin levels in pregnancy: marker for fat accumulation and mobilization? **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 77, n. 3, p. 278-283, 1998.

SCARPACE, P.; MATHENY, M.; TUMER, N. Hypothalamic leptin resistance is associated with impaired leptin signal transduction in aged obese rats. **Neuroscience**, v. 104, p. 1111-1117, 2001.

SCHAUBERGER, C. H.; ROONEY, B. L.; BRIMER, L. M. Factors that influence weight loss in the puerperium. **Obs. and Gynecol.**, v. 79, p. 424-429, 1992.

SCHIEVE, L. A.; COGSWELL, M. E.; SCANLON, K. S. Trends in pregnancy weight gain within and outside ranges recommended by the Institute of Medicine in a WIC population. **Matern. Child. Health J.**, v. 2, n. 2, p. 111-116, 1998.

SCHMITT, N. M.; NICHOLSON, W. K.; SCHMITT, J. The association of pregnancy and the development of obesity - results of a systematic review and meta-analysis on the natural history of postpartum weight retention. **Int. J. Obes. (Lond.)**, v. 31, n. 11, p. 1642-1651, 2007.

SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J.; CAMPFIELD, L. A.; BURN, P.; BASKIN, D. G. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. **J. Clin. Invest.**, v. 98, n. 5, p. 1101-1106, 1996.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D. JR.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-671, 2000.

SCOTT, M. M.; LACHEY, J. L.; STERNSON, S. M.; LEE, C. E.; ELIAS, C. F.; FRIEDMAN, J. M.; ELMQUIST, J. K. Leptin targets in the mouse brain. **J. Comp. Neurol.**, v. 514, p. 518-532, 2009.

SEBIRE, N. J.; JOLLY, M.; HARRIS, J. P.; WADSWORTH, J.; JOFFE, M.; BEARD, R. W.; REGAN, L.; ROBINSON, S. Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 25, n. 8, p. 1175-1182, 2001.

SEEBER, R. M.; SMITH, J. T.; WADDELL, B. J. Plasma leptin-binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat. **Biol. Reprod.**, v. 66, n. 6, p. 1762-1767, 2002.

SJOEHOLM, A.; BRIDGES, R. S.; GRATTAN, D. R.; ANDERSON, G. M. Region-, neuron-, and signaling pathway-specific increases in prolactin responsiveness in reproductively experienced female rats. **Endocrinology**, v. 152, n. 5, p. 1979-1988, 2011.

SMOLINSKA, N.; KAMINSKI, T.; SIAWRYS, G.; PRZALA, J. Long form of leptin receptor gene and protein expression in the porcine ovary during the estrous cycle and early pregnancy. **Reprod. Biol.**, v. 7, n. 1, p. 17-39, 2007.

SOSA, C.; CARRIQUIRY, M.; CHALAR, C.; CRESPI, D.; SANGUINETTI, C.; CAVESTANY, D.; MEIKLE, A. Endometrial expression of leptin receptor and members

of the growth hormone-Insulin-like growth factor system throughout the estrous cycle in heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 122, n. 3-4, p. 208-214, 2010.

SPANSWICK, D.; SMITH, M. A.; GROPP, V. E.; LOGAN, S. D.; ASHFORD, M. L. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. **Nature**, v. 390, p. 521-525, 1997.

STECULORUM, S. M.; BOURET, S. G. Maternal diabetes compromises the organization of hypothalamic feeding circuits and impairs leptin sensitivity in offspring. **Endocrinology**, v. 152, p. 4171-4179, 2011.

STEYN, F. J.; ANDERSON, G. M.; GRATTAN, D. R. Hormonal Regulation of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Messenger Ribonucleic Acid in the Arcuate Nucleus during Late Pregnancy. **Endocrinology**, v. 149, p. 3206-3214, 2008.

SZCZEPANKIEWICZ, D.; WOJCIECHOWICZ, T.; KACZMAREK, P.; NOWAK, K. W. Leptin and its receptors in the course of pregnancy in the rat. **Int. J. Mol. Med.**, v. 17, n. 1, p. 95-99, 2006.

TANG, G. B.; CUI, J. G.; WANG, D. H. Hypothalamic suppressor-of-cytokine-signalling 3 mRNA is elevated and pro-opiomelanocortin mRNA is reduced during pregnancy in Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). **J. Neuroendocrinol.**, v. 20, n. 9, p. 1038-1044, 2008.

TANUMA, N.; NAKAMURA, K.; SHIMA, H.; KIKUCHI, K. Protein-tyrosine phosphatase PTPepsilon C inhibits Jak-STAT signaling and differentiation induced by interleukin-6 and leukemia inhibitory factor in M1 leukemia cells. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 36, p. 28216-28221, 2000.

TARTAGLIA L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CILPEPPER, J.; DEVOS, R. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, p. 1263-1271, 1995.

TARTAGLIA, L. A. The leptin receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 6093-6096, 1997.

TESSIER, D. R.; FERRARO, Z. M.; GRUSLIN, A. Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity. **Placenta**, v. 34, n. 3, p. 205-211, 2013.

TODA, C.; SHIUCHI, T.; KAGEYAMA, H.; OKAMOTO, S.; COUTINHO, E. A.; SATO, T.; OKAMATSU-OGURA, Y.; YOKOTA, S.; TAKAGI, K.; TANG, L.; SAITO, K.; SHIODA, S.; MINOKOSHI, Y. Extracellular signal-regulated kinase in the ventromedial hypothalamus mediates leptin-induced glucose uptake in red-type skeletal muscle. **Diabetes**, v. 62, n. 7, p. 2295-2307, 2013.

TOUW, I. P.; DE KONING, J. P.; WARD, A. C.; HERMANS, M. H. Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 160, p. 1-9, 2000.

TRUJILLO, M. L.; SPUCH, C.; CARRO, E.; SEÑARÍS, R. Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1355-1365, 2011.

TSOU, R. C.; ZIMMER, D. J.; DE JONGHE, B. C.; BENICE, K. K. Deficiency of PTP1B in leptin receptor-expressing neurons leads to decreased body weight and adiposity in mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 9, p. 4227-4237, 2012.

TUDURÍ, E.; DENROCHE, H. C.; KARA, J. A.; ASADI, A.; FOX, J. K.; KIEFFER, T. J. Partial ablation of leptin signaling in mouse pancreatic α -cells does not alter either glucose or lipid homeostasis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 306, n. 7, p. E748-E755, 2014.

TUDURÍ, E.; MARROQUÍ, L.; SORIANO, S.; ROPERO, A. B.; BATISTA, T. M.; PIQUER, S.; LÓPEZ-BOADO, M. A.; CARNEIRO, E. M.; GOMIS, R.; NADAL, A.; QUESADA, I. Inhibitory effects of leptin on pancreatic alpha-cell function. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1616-1624, 2009.

VAISSE, C.; HALAAS, J. L.; HORVATH, C. M.; DARNELL, J. E. JR.; STOFFEL, M.; FRIEDMAN, J. M. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nat. Genet.**, v. 14, p. 95-97, 1996.

VAN DE WALL, E.; LESHAN, R.; XU, A. W.; BALTHASAR, N.; COPPARI, R.; LIU, S. M.; JO, Y. H.; MACKENZIE, R. G.; ALLISON, D. B.; DUN, N. J.; ELMQUIST, J.; LOWELL, B. B.; BARSH, G. S.; DE LUCA, C.; MYERS, M. G. JR.; SCHWARTZ, G. J.; CHUA, S. C. JR. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1773-1785, 2008.

VAN TOL, H. T.; VAN EERDENBURG, F. J.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A.. Enhancement of Bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 75, n. 4, p. 578-587, 2008.

VÁZQUEZ, M. J.; ROMERO-RUIZ, A.; TENA-SEMPERE, M. Roles of leptin in reproduction, pregnancy and polycystic ovary syndrome: consensus knowledge and recent developments. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 79-91, 2015.

VESCO, K. K.; DIETZ, P. M.; RIZZO, J.; STEVENS, V. J.; PERRIN, N. A.; BACHMAN, D. J.; CALLAGHAN, W. M.; BRUCE, F. C.; HORNBROOK, M. C. Excessive gestational weight gain and postpartum weight retention among obese woman. **Obstet. Gynecol.**, v. 114, p. 1069-1075, 2009.

VIGITEL BRASIL, 2011. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011.

VITORATOS, N.; SALAMALEKIS, E.; KASSANOS, D.; LOGHIS, C.; PANAYOTOPOULOS, N.; KOUSKOUNI, E.; CREATSAS, G. Maternal Plasma Leptin Levels and Their Relationship to Insulin and Glucose in Gestational-Onset Diabetes. **Gynecol. and Obst. Invest.**, v. 51, p. 17-21, 2001.

WADE, G.; SCHNEIDER, J. Metabolic fuels and reproduction in female mammals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 16, p. 235-272, 1992.

WANG, Z. W.; PAN, W. T.; LEE, Y.; KAKUMA, T.; ZHOU, Y. T.; UNGER, R. H. The role of leptin resistance in the lipid abnormalities of aging. **FASEB J.**, v. 15, p. 108-114, 2001.

WANG, Z.; ZHOU, Y. T.; KAKUMA, T.; LEE, Y.; KALRA, S. P.; KALRA, P. S.; PAN, W.; UNGER, R. H. Leptin resistance in adipocytes in obesity: role of suppressors of cytokine signaling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 277, p. 20-26, 2000.

WEISS, J. L.; MALONE, F. D.; EMIG, D.; BALL, R. H.; NYBERG, D. A.; COMSTOCK, C. H.; SAADE, G.; EDDLEMAN, K.; CARTER, S. M.; CRAIGO, S. D.; CARR, S. R.; D'ALTON, M. E. FASTER Research Consortium., Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate-a population-based screening study. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 190, n. 4, p. 1091-1097, 2004.

WILLIAMS, K. W.; SOHN, J. W.; DONATO, J.; LEE, C. E.; ZHAO, J. J.; ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F. The Acute Effects of Leptin Require PI3K Signaling in the Hypothalamic Ventral Premammillary Nucleus. **J. Neurosci.**, v. 31, p. 13147-13156, 2011.

WOODSIDE, B. The mother load of lactation. **J. Neuroendocrinol.**, v. 26, n. 12, p. 927-928, 2014.

WUNTAKAL, R.; KALER, M.; HOLLINGWORTH, T. Women with high BMI: should they be managed differently due to antagonising action of leptin in labour? **Med. Hypoth.**, v. 80, n. 6, p. 767-768, 2013.

XU, A. W.; KAELEN, C. B.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SCHWARTZ, M. W.; BARSH, G. S. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 951-958, 2005.

XU, A. W.; STE-MARIE, L.; KAELEN, C. B.; BARSH, G. S. Inactivation of Stat3 in POMC neurons causes decreased Pomc expression, mild obesity and defects in compensatory refeeding. **Endocrinology**, v. 148, p. 72-80, 2007.

XU, Y.; ELMQUIST, J. K.; FUKUDA, M. Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1243, p. 1-14, 2011.

YASUKAWA, H.; MISAWA, H.; SAKAMOTO, H.; MASUHARA, M.; SASAKI, A.; WAKIOKA, T.; OHTSUKA, S.; IMAIZUMI, T.; MATSUDA, T.; IHLE, J. N.; YOSHIMURA,

A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. **EMBO J.**, v. 18, p. 1309-1320, 1999.

YU, C. K. H.; TEOH, T. G.; ROBINSON, S. Obesity in Pregnancy. **B.J.O.G.**, v. 113, p. 1117-1125, 2006.

ZABOLOTNY, J. M.; BANCE-HANILEC, K. K.; STRICKER-KRONGRAND, A.; HAJ, F.; WANG, Y.; MINOKOSHI, Y. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. **Dev. Cell**, v. 2, p. 489-495, 2002.

ZHANG, E. E.; CHAPEAU, E.; HAGIHARA, K.; FENG, G. S. Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 45, p. 16064-16069, 2004.

ZHANG, J. G.; FARLEY, A.; NICHOLSON, S. E.; WILLSON, T. A.; ZUGARO, L. M.; SIMPSON, R. J.; MORITZ, R. L.; CARY, D.; RICHARDSON, R.; HAUSMANN, G.; KILE, B. J.; KENT, S. B.; ALEXANDER, W. S.; METCALF, D.; HILTON, D. J.; NICOLA, N. A.; BACA, M. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 5, p. 2071-2076, 1999.

ZHANG, R.; DHILLON, H.; YIN, H.; YOSHIMURA, A.; LOWELL, B. B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J. S. Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. **Endocrinology**, v. 149, n. 11, p. 5654-5661, 2008.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.

ZIOTOPOULOU, M.; MANTZOROS, C. S.; HILEMAN, S. M.; FLIER, J. S. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 279, p. E838-E845, 2000.

ANEXOS

Anexo A - Primers utilizados para determinação de expressão gênica por PCR em tempo real.

Gene de interesse	Accession no.	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	amplicon (bp)
ABCC8	NM_011510.3	GTCTTCTGGAACAGCGCCT	GTCCTGAGGCAATACCTGGG	63
ABCC9	NM_021041.2	ATCGACATGGCCACGGAAAA	GAGACACGGTGAGCTATGGT	91
ACTB*	Mm_00607939_s1	-	-	115
AgRP	NM_001271806.1	CTTTGGCGGAGGTGCTAGAT	AGGACTCGTGCAGCCTTACAC	75
CART	NM_013732	CCGAGCCCTGGACATCTACT	CCGCCTTGGCAGCTCCTT	64
Cyclophilin A	NM_008907.1	TATCTGCACTGCCAAGACTGAGT	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	128
G6PC	NM_008061.3	GCTGGAGTCTTGTCAGGCAT	CGGAGGCTGGCATTGTAGAT	74
GAPDH	GU21402.1	CTCCCACTCTTCCACCTTCG	CCACCACCCTGTTGCTGTAG	110
KCNJ11	NM_010602.3	GCTGTCCCGAAAGGGCATT	CCTCCTCTCTCGAGTACGGT	94
KCNJ8	NM_008428.4	CATGGAGAAGAGTGGCCTGG	CGCAGACGTGAATGACCTGA	64
LepR*	Mm01265583_m1	-	-	74
NPY*	Mm03048253_m1	-	-	107
PCK-1	NM_011044.2	TCGATCCTGGCCACATCTC	CGCAAGCTGAAGAAATATGACAA	68
POMC	NM_001278581.1	GAGGCCACTGAACATCTTTGTC	GCAGAGGCCAAAACAAGATTGG	253
PPARα*	Rn00566193_m1	-	-	98
PRKCδ	NM_011103.3	AACTGGTCCCTCCTGGAGAA	AGGGGATTTCACTTTGGGCT	63
PRKCθ	NM_008859.2	GTCAGGGAGAGGCAGTGAAC	TCTGCCCATTTTCTGATTCCAC	72
PTP1B	NM_011201.3	GGCGTGGTCATGCTCAAC	GCCAATACTGGGCACATTTTAA	61
PTPN11	NM_011202.3	AACGACGGCAAGTCCAAAGT	TGCTCCACCAGGTCTGTCAG	107
PTPN2	NM_008977.3	GTGATCCATTGCAGTGCG	TTCCATCAGAACAAGACAGGTAT	75
PTPRc*	Mm00448493_m1	-	-	68
SH2B1	NM_001081459.2	CCATGGTGTCTTCTTGGTAC	GTCCCTCCTCATTTAGTGAC	113
SOCS1*	Mm00782550_s1	-	-	88
SOCS3*	Mm00545913_s1	-	-	76
Srebf1c*	Rn01495769_m1	-	-	79

*, TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

Anexo B - Anticorpos utilizados no *Western blot* ou imunohistoquímica.

anticorpo	forneecedor	nº de catálogo
SOCS3	Cell Signaling	#2923S
GAPDH	Santa Cruz	SC-25778
pSTAT3	Cell Signaling	#91315
STAT3	Santa Cruz	C-20
pIR β	Santa Cruz	SC-25103
pAKT (S473)	Cell Signaling	#3787S

Anexo C - ZAMPIERI, THAIS T., RAMOS-LOBO, ÂNGELA, FURIGO, ISADORA C., PEDROSO, JOÃO A. B., BUONFIGLIO, DANIELLA, C., DONATO, JOSÉ JR. 2014.
SOCS3 effects on leptin receptor-expressing cells orchestrate metabolic changes during pregnancy. *Molecular Metabolism*, 4 (3): 237-245.

Brief communication

SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes^a

Thais T. Zampieri¹, Angela M. Ramos-Lobo¹, Isadora C. Furigo, João A.B. Pedrosa, Daniella C. Buonfiglio, Jose Donato Jr.^{*}

ABSTRACT

Objective: During pregnancy, women normally increase their food intake and body fat mass, and exhibit insulin resistance. However, an increasing number of women are developing metabolic imbalances during pregnancy, including excessive gestational weight gain and gestational diabetes mellitus. Despite the negative health impacts of pregnancy-induced metabolic imbalances, their molecular causes remain unclear. Therefore, the present study investigated the molecular mechanisms responsible for orchestrating the metabolic changes observed during pregnancy.

Methods: Initially, we investigated the hypothalamic expression of key genes that could influence the energy balance and glucose homeostasis during pregnancy. Based on these results, we generated a conditional knockout mouse that lacks the suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) only in leptin receptor-expressing cells and studied these animals during pregnancy.

Results: Among several genes involved in leptin resistance, only SOCS3 was increased in the hypothalamus of pregnant mice. Remarkably, SOCS3 deletion from leptin receptor-expressing cells prevented pregnancy-induced hyperphagia, body fat accumulation as well as leptin and insulin resistance without affecting the ability of the females to carry their gestation to term. Additionally, we found that SOCS3 conditional deletion protected females against long-term postpartum fat retention and streptozotocin-induced gestational diabetes.

Conclusions: Our study identified the increased hypothalamic expression of SOCS3 as a key mechanism responsible for triggering pregnancy-induced leptin resistance and metabolic adaptations. These findings not only help to explain a common phenomenon of the mammalian physiology, but it may also aid in the development of approaches to prevent and treat gestational metabolic imbalances.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Keywords Leptin; Suppressor of cytokine signaling; Gestational diabetes; Obesity; Leptin resistance; Hypothalamus

1. INTRODUCTION

The developing embryo and subsequent fetus impose energy demands on pregnant women. Consequently, increased food intake is expected during gestation [1,2]. Additionally, pregnancy leads to benign and transitory insulin resistance [3]. These metabolic adaptations are thought to have evolved to ensure better conditions for offspring development [2]. However, an increasing number of women are developing metabolic imbalances during pregnancy, including excessive gestational weight gain (EGWG) and gestational diabetes mellitus (GDM) [3,4]. These conditions represent a serious health threat to

women and their offspring and are becoming a major obstetric complication worldwide. For example, EGWG increases the risk of maternal mortality, GDM, pre-eclampsia, thromboembolism, postpartum hemorrhage and other gestational complications [3]. Furthermore, long-term postpartum weight retention predisposes women to obesity, and GDM increases the risk of diabetes mellitus later in life [4]. Therefore, metabolic imbalances during pregnancy may also aggravate the obesity and diabetes epidemics.

Despite the negative health impacts of pregnancy-induced metabolic imbalances, the precise mechanisms responsible for orchestrating these changes remain largely unknown. Previous studies have

^aGrants: This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP-Brazil, 10/18086-0, 12/15517-6, 13/21722-4, 13/25032-2 and 14/11752-6) and the International Brain Research Organization (IBRO; Return Home Fellowship).

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, São Paulo, SP, 05508-000, Brazil

¹ These authors contributed equally to this study as co-first authors.

^{*}Corresponding author: Tel.: +55 11 3091 0929; fax: +55 11 3091 7285. E-mail: jdonato@icb.usp.br (J. Donato).

Abbreviations: ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DIO, diet-induced obesity; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; EGWG, excessive gestational weight gain; GDM, gestational diabetes mellitus; GTT, glucose tolerance test; IR, insulin receptor; ITT, insulin tolerance test; LepR, leptin receptor; PKC, protein kinase C; GH-V, placental growth hormone; pSTAT3, phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription 3; pSTAT3-ir, pSTAT3-immunoreactive; RP, retroperitoneal; SOCS3, suppressor of cytokine signaling-3; STZ, streptozotocin; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus

Received November 24, 2014 • Revision received December 8, 2014 • Accepted December 12, 2014 • Available online 20 December 2014

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.12.005>

Brief communication

reported lower responsiveness to leptin in pregnant animals [5–7]. Nonetheless, no compelling evidence has been provided about the real contribution of leptin resistance for the onset of pregnancy-induced metabolic changes. Therefore, the objective of the present study was to identify key molecular mechanisms that trigger the metabolic changes observed during pregnancy.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Generation of conditional knockout mice

All mouse strains were backcrossed at least 4 times to the C57BL/6 background before the initiation of breeding. To induce the *Socs3* gene deletion exclusively in leptin-responsive cells, we bred the LepR-IRES-Cre strain (B6.129-*Lep^{tm2(cre)}Rck*/J, Jackson Laboratories) with mice carrying loxP-flanked *Socs3* alleles (B6.129S4-*Socs3^{tm1Ayo}*/J, Jackson Laboratories). The SOCS3 KO group was composed of animals homozygous for the loxP-flanked *Socs3* allele and homozygous for the LepR-IRES-Cre allele. The control group was composed of animals homozygous for the LepR-IRES-Cre allele. We used only littermates as controls. The mice were weaned at 4 weeks of age, and the genomic DNA was extracted from tail tips for PCR genotyping (Sigma). The loxP-flanked *Socs3* allele and the wild-type allele were identified by the presence of a 420 bp or 272 bp PCR fragment, respectively. The LepR-IRES-Cre allele and the wild-type allele were identified by the presence of a 213 bp or 800 bp PCR fragment, respectively. After weaning, the mice received a regular low-fat rodent chow diet (2.99 kcal/g; 9.4% calories from fat; Quimtia, Brazil). All animal procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Institute of Biomedical Sciences at the University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

2.2. Breeding strategy and tissue collection

Two-month-old females were bred with sexually experienced males, and we assessed the presence of copulatory plugs on a daily basis. Females that did not mate within 3 weeks were discarded. A breeding strategy was designed to assure that all pups in both groups would have the same genotype (homozygous for LepR-IRES-Cre and heterozygous for LoxP-flanked *Socs3* allele). The day that the copulatory plug was detected was considered to be the first day of pregnancy (P1), and the females were single-housed. All females were euthanized after a 4-h fasting period during the middle of the light phase. Non-pregnant mice (nulliparous and primiparous) were euthanized on the second day of diestrus. To determine adiposity levels, we measured the masses of the uterine, ovarian and retroperitoneal (RP) fat pads. The uterine pad was collected from the midpoint of the cervix and trimmed away along the horn length to the infundibulum region. Ovarian pad was well defined by a circular fat deposit around the ovary. The retroperitoneal pad was removed as a triangular section extending from a vertex in the inguinal region up the midline and across at the lower pole of the kidney, extending laterally as far as fat was visible. The deposits were collected bilaterally and the values presented represent their average.

2.3. Relative gene expression

The tissues were quickly dissected for relative gene expression analysis as previously described in Ref. [8]. Specific primers were designed for each target gene according to the sequences obtained from GenBank or acquired from Applied Biosystems (Supplemental Table 1). The data were reported as fold changes compared with the values obtained from the control group (set at 1.0).

2.4. Leptin sensitivity tests

For all experiments, we used mouse recombinant leptin purchased from Dr. A.F. Parlow (National Hormone and Peptide Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). On P5, mice were anaesthetized (isoflurane) and we performed a surgical procedure, in which osmotic micro-pumps (model 1002; Alzet) were implanted s.c. to deliver 0.5 µg leptin/h. Body weight and food intake were measured daily before (P1–P5) and after (P6–P16) surgery. To determine the region-specific responses to leptin, pregnant control and SOCS3 KO mice received a leptin injection after a 4 h fasting period (2.5 µg leptin/g; s.c.). Three hours later, the mice were perfused with 10% buffered formalin, and their brains were processed to detect leptin-induced phosphorylation of the Signal Transducer and Activator of Transcription 3-immunoreactive (pSTAT3-ir) as previously described in Ref. [7]. We counted the number of pSTAT3-ir cells on one side of a representative rostrocaudal level.

2.5. Western blot

The tissues were homogenized in RIPA buffer (Sigma) containing a cocktail of proteases and phosphatase inhibitors (1:100, Sigma). Protein (40 or 50 µg) was resolved on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). The membranes were blocked with 5% BSA and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (1:1,000; pSTAT3^{Tyr705}, Cell Signaling; STAT3, Santa Cruz; SOCS3, Cell Signaling; pIR^{Tyr1162/1163}, Santa Cruz; pAKT^{Ser473}, Cell Signaling; GAPDH, Santa Cruz). Next, the membranes were incubated for 45 min with secondary antibody (1:10,000; IRDye 800CW, Li-COR). The proteins were detected and analyzed using the Li-COR Odyssey system.

2.6. Hormone levels

ELISA kits were used to determine the serum concentrations of leptin (Crystal Chem), insulin (Crystal Chem) and glucagon (Sigma).

2.7. Glucose homeostasis

A glucose tolerance test (GTT; 2 g glucose/kg; s.c.) and an insulin tolerance test (ITT; 1 IU insulin/kg; s.c.) were performed on P14 and P16, respectively. Insulin sensitivity was evaluated in different tissues by infusing 5 IU insulin/kg s.c. into pregnant mice and euthanizing them 15 min after the injection. GDM was induced by a single intraperitoneal injection of freshly prepared streptozotocin (STZ; 200 mg/kg; Amresco) dissolved in 50 mM sodium citrate (pH 4.5) on P5 [9]. Glycemia was assessed before (on P1 and P4) and after (on P7 and P13) the STZ injection, followed by a GTT (0.5 g glucose/kg; s.c.) on P14.

2.8. Statistics

The results are expressed as mean ± SEM. The differences between the groups were compared using an unpaired two-tailed Student's t-test. The data obtained from the leptin and insulin sensitivity tests were analyzed by two-way ANOVA and the Bonferroni post hoc test. Glycemic changes after the STZ treatment were assessed using repeated measures ANOVA. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software. We considered *p* values of less than 0.05 to be statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Identification of proteins potentially related with leptin resistance during pregnancy

We investigated the hypothalamic expression of several genes potentially related to leptin resistance including components of the

suppressor of cytokine signaling (SOCS) family, adapter proteins such as SH2B1, protein-tyrosine phosphatases and LepR isoforms. Among them, only SOCS3 and Ob-Rb expression were increased in the hypothalamus of pregnant mice (Figure 1A). Interestingly, SOCS3 is the main member of the SOCS family capable of inhibiting leptin receptor (LepR) signaling [10,11]. Its expression is increased in the hypothalamus of obese animals, and the brain-specific ablation of SOCS3 increases leptin sensitivity in diet-induced obesity (DIO) [12–15]. Therefore, SOCS3 is a strong candidate to induce both leptin resistance and the metabolic changes during pregnancy.

3.2. Generation of mice lacking SOCS3 only in LepR-expressing cells

Mice carrying LoxP-flanked *Sox3* alleles were bred with animals expressing Cre recombinase under the *LepR* promoter control (Figure 1B). Thus, SOCS3 was inactivated specifically in LepR-expressing cells (SOCS3 KO mice). Littermate mice carrying the wild-type *Sox3* gene were used as controls. Both groups were composed of animals homozygous for the Cre allele (Figure 1B). To functionally confirm the genetic deletion, we assessed the capacity of an acute leptin injection to induce hypothalamic SOCS3 mRNA expression [10,11]. We found that leptin increased SOCS3 expression only in control animals (Figure 1C). Then, we compared hypothalamic SOCS3 expression in nulliparous and pregnant SOCS3 KO mice. In contrast to the elevated SOCS3 mRNA expression seen during pregnancy in wild-type mice (Figure 1A), pregnant SOCS3 KO mice did not show increased SOCS3 hypothalamic expression (Figure 1D). These results indicate that pregnancy-induced changes in hypothalamic SOCS3 expression are restricted to LepR-expressing cells. Gene expression analysis in the hypothalamus of pregnant mice confirmed

that SOCS3 KO females did not exhibit compensatory alterations in the expression of other components potentially related to leptin resistance, although pregnant SOCS3 KO mice had a higher hypothalamic expression of Ob-Ra compared to control animals (Supplemental Figure 1).

Because SOCS3 inhibits LepR signaling [10,11], SOCS3 KO mice are expected to be more responsive to leptin. To determine leptin sensitivity in the hypothalamus, non-pregnant control and SOCS3 KO mice received a leptin injection to induce pSTAT3. Leptin increased pSTAT3 expression 1.5 h after the injection. However, SOCS3 KO mice showed a longer and sustained increase in the pSTAT3 expression compared to control animals, indicating a prolonged signaling through the LepR (Figure 1E). Additionally, hypothalamic SOCS3 was increased in control mice 3 h after leptin injection, whereas no such changes were detected in SOCS3 KO mice (Figure 1E). These results confirm the efficiency of SOCS3 inactivation in LepR-responsive cells.

3.3. Metabolic changes during pregnancy are attenuated in SOCS3 KO mice

Despite the increased sensitivity to leptin (Figure 1E), non-pregnant SOCS3 KO females have a similar food intake (Control: 4.5 ± 0.3 g/day; SOCS3 KO: 4.6 ± 0.3 g/day; $p = 0.73$) and body weight (Figure 2B) compared with control animals, and only a slight decrease in fat mass (Figure 2C). To investigate whether SOCS3 plays a role in the leptin resistance and metabolic changes observed during pregnancy, females were bred and monitored daily to detect the copulatory plug, indicating the first day of pregnancy (P1). Then, they were single-housed, and their body weight and food intake were recorded daily during the gestation, lactation and postweaning periods. SOCS3 KO females exhibited normal fertility rates (data not shown) and did not

Figure 1: Validation of mice lacking SOCS3 in LepR-expressing cells. (A) Gene expression analysis in the hypothalamus of nulliparous ($n = 8$) and pregnant ($n = 7$) wild-type mice to determine candidate genes involved in leptin resistance during pregnancy. (B) PCR genotyping from tail biopsies to identify the loxP-flanked *Sox3* allele (upper picture) or the LepR-IRES-Cre allele (lower picture) in wild-type, control and SOCS3 KO mice. (C) Deletion of SOCS3 in LepR-expressing cells prevented the leptin-induced increase in hypothalamic SOCS3 expression after 1 h ($n = 6$ /group). (D) SOCS3 KO mice did not show the typical increase in hypothalamic SOCS3 expression during pregnancy ($n = 7-8$). (E) SOCS3 KO mice exhibited longer, sustained leptin-induced phosphorylation of STAT3 (pSTAT3) and did not exhibit changes in SOCS3 protein levels in the hypothalamus compared to control mice ($n = 3$ /group). * $p < 0.05$.

Brief communication

Figure 2: Energy balance changes during pregnancy are attenuated in SOCS3 KO mice. (A and B) Relative food intake and body weight at baseline and during pregnancy, lactation and postweaning periods in control and SOCS3 KO mice ($n = 20$ – 30 /group). (C) Bar graphs comparing fat pad masses of nulliparous and pregnant mice at P16 from the control ($n = 12$) and SOCS3 KO ($n = 12$) groups. (D and E) Graphs comparing the body weights and adiposities of age-matched nulliparous and primiparous mice from the control ($n = 12$) and SOCS3 KO ($n = 12$) groups. $*p < 0.05$.

experience any noticeable pregnancy complications. As expected, control animals showed a progressive increase in food intake during gestation (Figure 2A). Remarkably, SOCS3 KO mice maintained their food intake significantly lower than control animals from P5 to P17 (Figure 2A). During pregnancy, body weight increased progressively in control mice, whereas in SOCS3 KO females this increase was attenuated (Figure 2B). Because adiposity increased during gestation in control animals (Figure 2C), we hypothesized that the lower weight gain of pregnant SOCS3 KO females was due to the prevention of fat mass accumulation. Accordingly, deletion of SOCS3 from LepR-expressing cells reduced the accumulation of fat mass by approximately 80% during pregnancy (Figure 2C). Consequently, pregnant SOCS3 KO females exhibited the same degree of adiposity as nulliparous controls.

Pups had similar body weight at embryo stage (E16) or at birth in control and SOCS3 KO groups (Supplemental Figure 2). To ensure comparable metabolic demands during lactation, we standardized to 6 pups per litter. Lactating control animals exhibited profound increases in food intake (Figure 2A). However, hyperphagia during lactation was markedly reduced by SOCS3 deletion suggesting that ongoing leptin resistance contributes to the hyperphagia of lactation. Food intake returned to baseline levels after weaning in both groups (Figure 2A). In addition, control animals remained significantly heavier than SOCS3

KO females during lactation (Figure 2B). Pups from SOCS3 KO dams showed a lower weight gain rate resulting in a significantly lower body weight from day 14 on compared to control litters (Supplemental Figure 2).

Pregnancy is considered an important risk factor for obesity in women [4]. To investigate whether SOCS3 deletion prevented postpartum weight retention, we compared the body weight of age-matched nulliparous and primiparous mice. In nulliparous mice, we found no differences in body weight between the groups (Figure 2D). However, primiparous control animals showed sustained increases in body weight and adiposity than nulliparous controls (Figure 2D,E). Notably, SOCS3 deletion mitigated pregnancy-induced increases in body weight and fat accumulation (Figure 2D,E). Therefore, long-term postpartum fat retention was prevented by SOCS3 conditional deletion.

3.4. SOCS3 deletion in LepR-expressing cells precludes the development of leptin resistance during pregnancy

It remains unknown whether the development of leptin resistance leads to the metabolic changes observed during pregnancy. Control mice exhibited a marked increase in serum leptin concentration during late pregnancy (Figure 3A). Since hyperleptinemia is a common feature of leptin resistance [12,14,15], these results corroborate previous findings indicating that late pregnant animals are leptin resistant [5–

Figure 3: Deletion of SOCS3 in LepR-expressing cells precludes the development of leptin resistance during pregnancy. (A) Serum leptin levels of nulliparous and pregnant mice at P16 ($n = 8$ /group). (B and C) Weight change differences between non-treated and leptin-treated mice during pregnancy ($n = 8-22$ /group). The arrow indicates the day (P5) that the osmotic pumps containing leptin were implanted into the animals. (D and E) Changes in body weight and food intake between leptin-treated and non-treated mice at baseline (P1–P5) and during late pregnancy (P14–P16; $n = 30-33$ /group). (F) Fat pad masses of leptin-treated control and SOCS3 KO mice ($n = 8-11$ /group). (G) The numbers of pSTAT3-ir cells in different brain nuclei of pregnant control ($n = 6$) and SOCS3 KO ($n = 5$) mice at 3 h after leptin injection. (H–O) Brain photomicrographs of representative animals showing the distribution of leptin-induced pSTAT3-ir cells. Abbreviations: 3v, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; f, fornix; LHA, lateral hypothalamic area; MPA, medial preoptic area; NTS, nucleus of the solitary tract; oc, optic chiasm; ovlt, organum vasculosum of the lamina terminalis; PMV, ventral premammillary nucleus; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus. Scale bar = 100 μ m. * p < 0.05.

7]. Notably, no changes in leptin levels were observed in pregnant SOCS3 KO mice suggesting improved leptin sensitivity (Figure 3A). To directly evaluate leptin sensitivity, osmotic pumps delivering leptin were implanted subcutaneously at day 5 of pregnancy in control and SOCS3 KO mice. Blood analysis at day 16 of pregnancy indicated that leptin-treated control and SOCS3 KO mice had similarly high leptin levels (Supplemental Figure 3). Control mice showed reduced weight gain at the beginning of leptin treatment. However, by late gestation, their weight gain was similar to non-treated animals (Figure 3B). These results are in accordance with the fact that leptin resistance arises at midpregnancy towards the end of gestation, coinciding with the period of highest weight gain rate and hyperphagia (Supplemental Figure 4)

[1,2,16,17]. In contrast, leptin-treated SOCS3 KO mice had a lower rate of weight gain by late pregnancy (Figure 3C). By the end of pregnancy, leptin-treated controls showed similar rate of weight gain as the non-treated controls (Figure 3D and Supplemental Figure 4). Conversely, leptin-treated SOCS3 KO mice gained significantly less weight during pregnancy than non-treated animals (Figure 3D and Supplemental Figure 4). Although leptin treatment was able to reduce food intake of control animals, the anorexigenic effects of leptin were significantly stronger in SOCS3 KO mice, completely preventing hyperphagia during late pregnancy (Figure 3E). Moreover, leptin drastically reduced the adiposity of pregnant SOCS3 KO mice by nearly eliminating their fat deposits (Figure 3F).

Brief communication

Figure 4: Improved glucose homeostasis and protection against gestational diabetes in the SOCS3 KO mice. (A and B) Glycemic changes ($n = 14$ – 18 /group) and serum insulin levels ($n = 6$ /group) in pregnant mice during a GTT. (C) ITT in pregnant mice ($n = 14$ – 16 /group). (D and E) Glycemic changes and GTT in the streptozotocin (STZ)-injected mice ($n = 8$ – 20 /group). The arrow indicates the day STZ was injected in the animals. (F) Hypothalamic expression of genes involved in the central regulation of glucose homeostasis in pregnant mice ($n = 8$ /group). (G and H) Activation of the insulin intracellular pathway in the gastrocnemius/soleus muscle and liver of saline- or insulin-treated pregnant mice ($n = 4$ /group). * $p < 0.05$.

To assess region-specific changes in leptin sensitivity, another group of pregnant control and SOCS3 KO mice received an acute leptin injection to determine the activation of the STAT3 signaling pathway in the brain (Figure 3G). No differences between control and SOCS3 KO mice were observed in the number of leptin-induced pSTAT3-ir cells in the medial preoptic area (Figure 3H,L), lateral hypothalamic area, dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH; Figure 3J,N) and nucleus of the solitary tract. However, SOCS3 KO mice exhibited increased pSTAT3-ir cells in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH; Figure 3I,M), ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH; Figure 3I,M) and ventral premammillary nucleus (Figure 3K,O). Therefore, mice carrying SOCS3 deletion in LepR-expressing cells exhibited improved leptin sensitivity during pregnancy, which was likely responsible for the prevention of metabolic changes during pregnancy. Similarly to that observed in DIO [18,19], some brain areas are not affected by leptin resistance during gestation (i.e., DMH). However, pregnant SOCS3 KO mice showed improved responsiveness to leptin in hypothalamic nuclei related to energy balance regulation including the ARH and VMH [20]. Interestingly, these same areas are prone to developing leptin resistance induced by high-fat diets [18,19] or during pregnancy [5,6].

3.5. Improved glucose homeostasis and protection against GDM in SOCS3 KO mice

Pregnancy leads to the development of insulin resistance [3], although the mechanisms that cause this condition are unclear. No significant changes in serum insulin or glucagon levels were observed in pregnant control or SOCS3 KO mice (Supplemental Figure 5). However, SOCS3 KO mice showed improved glucose tolerance during pregnancy (Figure 4A). Remarkably, pregnant SOCS3 KO mice required less insulin secretion during the GTT to control their glucose levels (Figure 4B). Additionally, SOCS3 KO mice subjected to an ITT exhibited increased insulin sensitivity during late pregnancy (Figure 4C), which is the period associated with the highest risk of developing GDM [1]. Although these results indicate significant improvements in glucose homeostasis in pregnant SOCS3 KO mice, it remains unclear whether these changes can protect them from GDM. Thus, we studied GDM using a previously described protocol [9]. Mice received a single injection of STZ on P5 to induce lesions in their pancreatic β -cells. Although no changes were observed between the groups in serum insulin levels after the STZ treatment ($p = 0.98$; data not shown), control animals were hyperglycemic by P13 (>200 mg/dL), whereas SOCS3 KO mice showed no significant changes in glycemia

(Figure 4D). Accordingly, the results of a GTT performed at day 14 indicated considerably better glucose tolerance in STZ-injected SOCS3 KO mice compared with controls (Figure 4E).

Central leptin signaling modulates insulin sensitivity in peripheral tissues [14,20–22]. The regulation of glucose homeostasis by hypothalamic neurons requires the activity of K_{atp} channels [23,24] and is affected by specific isoforms of protein kinase C (PKC) [25,26]. We observed an upregulation of the SUR2 K_{atp} channel subunit as well as a reduced expression of PKC θ in the hypothalamus of pregnant SOCS3 KO mice (Figure 4F). To investigate whether these changes affected insulin sensitivity in peripheral tissues, pregnant mice received an acute insulin stimulus to assess the activation of the insulin receptor (IR) signaling pathway. Insulin induced the phosphorylation of the IR and AKT in the skeletal muscle (Figure 4G) and liver (Figure 4H). However, SOCS3 KO mice showed increased IR phosphorylation in the skeletal muscle, suggesting higher insulin responsiveness (Figure 3G). No differences between control and SOCS3 KO groups were observed in the insulin sensitivity (Figure 4H) or the expression of genes involved in glucose and lipid metabolism in the liver (Supplemental Figure 6). These results indicate that alterations in hypothalamic SOCS3 expression are responsible for inducing insulin resistance during pregnancy. These effects involve changes in the hypothalamic expression of K_{atp} channels and PKC θ , leading to better insulin responsiveness in skeletal muscles. Remarkably, SOCS3 deletion in LepR-expressing cells is sufficient to prevent the development of GDM in the STZ-induced model.

4. DISCUSSION

In the present study, we identified a key molecular mechanism responsible for inducing metabolic changes during pregnancy. By preventing SOCS3 expression only in LepR-expressing cells, we turned off most of the pregnancy-induced metabolic changes without affecting the ability of the females to carry their gestation to term. Thus, SOCS3 may represent an integrative protein recruited by multiple signals to induce gestational metabolic changes. In the present obesogenic environment, this response may have become maladaptive leading many women to present metabolic imbalances during pregnancy such as EGWG and GDM. These conditions are becoming a common complication for obstetric practice as well as a risk factor of intergenerational programming of metabolic disorders [3,4,9]. In this case, consumption of high-caloric diets or prior obesity may increase hypothalamic SOCS3 expression leading to an aggravation of gestational metabolic imbalances. On the other hand, in physiological conditions, SOCS3 expression is induced by hormones secreted during gestation including estradiol [27], leptin [10], prolactin/placental lactogens [27] and growth hormone/placental growth hormone (GH-V) [28]. Therefore, increased hypothalamic SOCS3 expression and the consequent leptin resistance may represent a downstream mechanism common for several hormones to induce physiological adaptations of pregnancy. This fact is important because, from an evolutionary perspective, pregnancy-induced metabolic changes help female mammals to cope with the energy demands of gestation and lactation [2]. Our results corroborate this idea because pups from SOCS3 KO dams showed a lower weight gain rate, despite presenting the same genotype and body weight at birth compared with control pups. Fat accretion during pregnancy and food intake during lactation were decreased in SOCS3 KO dams which probably compromised their ability to nurture the offspring.

Among the hormones possibly involved in the physiological adaptations of pregnancy, prolactin has received special attention [2,16,29]. For

example, central prolactin infusion causes leptin resistance in pseudopregnant rats [30]. Since LepR-expressing cells are directly responsive to prolactin in some brain areas [7], a crosstalk between leptin and prolactin signaling may affect the regulation of energy balance during pregnancy [2,7,16,29,30]. An important aspect to be considered is that some hormonal changes during pregnancy are different between rodents and primates. For instance, primates, including humans, present a tonic secretion of GH-V which is absent in rodents [31]. GH-V has a diabetogenic effect and at least part of the changes in glucose homeostasis in pregnant women may be caused by this hormone [31]. Therefore, the extrapolation of our findings to primates must be carefully evaluated. Overall, future studies are still necessary to determine the precise role of each hormone in the onset of metabolic changes observed during pregnancy.

Another important aspect is that our study cannot distinguish whether the prevention of gestational metabolic changes is caused by the deletion of SOCS3 in LepR-expressing cells or by the resulting improvement in leptin sensitivity. Therefore, the rescue of leptin sensitivity during pregnancy may represent a key aspect responsible for mitigating the development of gestational metabolic changes. Although previous studies have demonstrated that hypothalamic SOCS3 expression is increased during pregnancy [32,33], our study is the first to analyze several other genes that could modulate leptin sensitivity and to show that only SOCS3 expression is significantly affected by gestation. In addition, SOCS3 KO females did not exhibit the pregnancy-induced changes in hypothalamic SOCS3 expression indicating that this increase is restricted to LepR-expressing cells. Therefore, our findings indicate that SOCS3 likely plays a major role in inducing the leptin resistance during pregnancy and consequently controlling the onset of pregnancy-induced metabolic changes. An interesting finding is that pregnant SOCS3 KO mice have increased hypothalamic expression of Ob-Ra. This isoform is believed to be involved in the transport of leptin from the systemic circulation to the central nervous system and its expression is reduced in the choroid plexus of pregnant mice [5]. Thus, an increased transport of leptin to the central nervous system may have contributed to the better leptin sensitivity observed in pregnant SOCS3 KO mice. However, a recent study showed that a knockout mice specific for the Ob-Ra have only a modest phenotype indicating that this isoform plays a minor role in the regulation of metabolism [34].

Earlier studies have described the role of SOCS3 in modulating leptin sensitivity in DIO models [12–15]. Haploinsufficiency or neuronal SOCS3 deficiency partially protects mice against DIO and insulin resistance [12–15]. Surprisingly, deletion of SOCS3 from LepR-expressing cells did not prevent DIO, although improved diet-induced insulin resistance [14]. In accordance, overexpression of SOCS3 in LepR-expressing cells did not lead to obesity [35]. These results contrast with the present findings indicating that SOCS3 deficiency in LepR-expressing cells leads to drastic consequences in the regulation of energy balance of pregnant mice. Therefore, although SOCS3 modulates leptin sensitivity in distinct conditions, the consequences of manipulating SOCS3 in LepR-expressing cells depend on the situation. Regarding this, SOCS3 seems to influence glucose homeostasis in both DIO and pregnancy. However, SOCS3 expression in LepR cells modulates the energy balance more significantly during pregnancy.

Based on our findings, therapies that target SOCS3 could become a promising approach to prevent and treat gestational metabolic diseases. Of note, currently there is no specific treatment for pregnancy-induced metabolic imbalances. Nonetheless, SOCS3 is involved in different biological functions, and systemic manipulations of SOCS3

Brief communication

may cause unpredicted effects. For example, SOCS3 ablation may influence placental functions [36]. Therefore, more studies are still necessary to assess the risk-benefits of manipulating SOCS3 during pregnancy. It seems, however, that central inhibition of SOCS3 may produce more benefits than risks not only for the treatment of gestational metabolic imbalances, but for obesity and diabetes mellitus as well. Because LepR expression is also found in different organs [37], peripheral tissues may have been affected in SOCS3 KO females. However, this fact did not cause any apparent complications during pregnancy. Regarding the phenotype of pregnant SOCS3 KO females, we cannot rule out that part of it was caused by peripheral SOCS3 deletion. For example, liver- or skeletal muscle-specific SOCS3 deletion increases insulin sensitivity in those particular tissues [38,39]. However, this fact is unlikely because liver-specific SOCS3 ablation paradoxically leads to obesity [38] which is incompatible with the phenotype of SOCS3 KO females observed in our study. Additionally, since the recovery of leptin sensitivity during pregnancy may represent a major aspect in the prevention of metabolic changes in pregnant SOCS3 KO females, and it is well-known that the key metabolic effects of leptin are mediated by the brain [40,41], the metabolic phenotype of pregnant SOCS3 KO mice is likely caused by central mechanisms. In conclusion, our study identified the increased hypothalamic expression of SOCS3 as a key mechanism responsible for inducing pregnancy-induced leptin resistance and metabolic adaptations. These findings not only help to explain a common phenomenon of the mammalian physiology, but it may also aid in the development of approaches to prevent and treat gestational metabolic imbalances.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors have nothing to disclose.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Ana Campos, Deborah P. Romeu and Vanessa Nagaishi for their technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.12.005>.

REFERENCES

- [1] Sarwer, D.B., Allison, K.C., Gibbons, L.M., Markowitz, J.T., Nelson, D.B., 2006. Pregnancy and obesity: a review and agenda for future research. *Journal of Women's Health* 15(6):720–733.
- [2] Ladyman, S.R., Augustine, R.A., Grattan, D.R., 2010. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. *Journal of Neuroendocrinology* 22(7):805–817.
- [3] Norman, J.E., Reynolds, R.M., 2011. The consequences of obesity and excess weight gain in pregnancy. *Proceedings of the Nutrition Society* 70(4):450–456.
- [4] Nehring, I., Schmoll, S., Beyerlein, A., Hauner, H., von Kries, R., 2011. Gestational weight gain and long-term postpartum weight retention: a meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* 94(5):1225–1231.
- [5] Ladyman, S.R., Grattan, D.R., 2005. Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 146(9):3868–3874.
- [6] Ladyman, S.R., Fieldwick, D.M., Grattan, D.R., 2012. Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse. *Reproduction* 144(1):83–90.
- [7] Nagaishi, V.S., Cardinali, L.I., Zampieri, T.T., Furigo, I.C., Metzger, M., Donato Jr., J., 2014. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neuroscience* 259(0):71–83.
- [8] Zampieri, T.T., Pedrosa, J.A., Furigo, I.C., Tirapegui, J., Donato Jr., J., 2013. Oral leucine supplementation is sensed by the brain but neither reduces food intake nor induces an anorectic pattern of gene expression in the hypothalamus. *PLoS One* 8(12):e84094.
- [9] Steculorum, S.M., Bouret, S.G., 2011. Maternal diabetes compromises the organization of hypothalamic feeding circuits and impairs leptin sensitivity in offspring. *Endocrinology* 152(11):4171–4179.
- [10] Bjorbaek, C., El-Hashimi, K., Frantz, J.D., Flier, J.S., 1999. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *Journal of Biological Chemistry* 274(42):30059–30065.
- [11] Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E., Flier, J.S., 1998. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell* 1(4):619–625.
- [12] Mori, H., Hanada, R., Hanada, T., Aki, D., Mashima, R., Nishinakamura, H., et al., 2004. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nature Medicine* 10(7):739–743.
- [13] Briancon, N., McNay, D.E., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., 2010. Combined neural inactivation of suppressor of cytokine signaling-3 and protein-tyrosine phosphatase-1B reveals additive, synergistic, and factor-specific roles in the regulation of body energy balance. *Diabetes* 59(12):3074–3084.
- [14] Pedrosa, J.A., Buonfiglio, D.C., Cardinali, L.I., Furigo, I.C., Ramos-Lobo, A.M., Tirapegui, J., et al., 2014. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. *Molecular Metabolism* 3(6):608–618.
- [15] Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzameli, I., Bjorbaek, C., Flier, J.S., 2004. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nature Medicine* 10(7):734–738.
- [16] Augustine, R.A., Ladyman, S.R., Grattan, D.R., 2008. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *Journal of Physiology* 586(2):387–397.
- [17] Mounzih, K., Qiu, J., Ewart-Toland, A., Chehab, F.F., 1998. Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology* 139(12):5259–5262.
- [18] Münzberg, H., Flier, J.S., Bjorbaek, C., 2004. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145(11):4880–4889.
- [19] Enriori, P.J., Sinnayah, P., Simonds, S.E., Garcia Rudaz, C., Cowley, M.A., 2011. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *Journal of Neuroscience* 31(34):12189–12197.
- [20] Williams, K.W., Elmquist, J.K., 2012. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature Neuroscience* 15(10):1350–1355.
- [21] Berglund, E.D., Vianna, C.R., Donato Jr., J., Kim, M.H., Chuang, J.C., Lee, C.E., et al., 2012. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *Journal of Clinical Investigation* 122(3):1000–1009.
- [22] Koch, C., Augustine, R.A., Steger, J., Ganjam, G.K., Benzler, J., Pracht, C., et al., 2010. Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. *Journal of Neuroscience* 30(48):16180–16187.

- [23] Miki, T., Liss, B., Minami, K., Shiuchi, T., Saraya, A., Kashima, Y., et al., 2001. ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nature Neuroscience* 4(5):507–512.
- [24] Pocai, A., Lam, T.K.T., Gutierrez-Juarez, R., Obici, S., Schwartz, G.J., Bryan, J., et al., 2005. Hypothalamic KATP channels control hepatic glucose production. *Nature* 434(7036):1026–1031.
- [25] Benoit, S.C., Kemp, C.J., Elias, C.F., Abplanalp, W., Herman, J.P., Migrenne, S., et al., 2009. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- θ subcellular localization in rodents. *Journal of Clinical Investigation* 119(9):2577–2589.
- [26] Cabou, C., Vachoux, C., Campistron, G., Drucker, D.J., Burcelin, R., 2011. Brain GLP-1 signaling regulates femoral artery blood flow and insulin sensitivity through hypothalamic PKC- δ . *Diabetes* 60(9):2245–2256.
- [27] Steyn, F.J., Anderson, G.M., Grattan, D.R., 2008. Hormonal regulation of suppressors of cytokine signaling (SOCS) messenger ribonucleic acid in the arcuate nucleus during late pregnancy. *Endocrinology* 149(6):3206–3214.
- [28] Krebs, D.L., Hilton, D.J., 2001. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19(5):378–387.
- [29] Woodside, B., Budin, R., Wellman, M.K., Abizaid, A., 2012. Many mouths to feed: the control of food intake during lactation. *Frontiers in Neuroendocrinology* 33(3):301–314.
- [30] Augustine, R.A., Grattan, D.R., 2008. Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. *Endocrinology* 149(3):1049–1055.
- [31] Newbern, D., Freemark, M., 2011. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 18(6):409–416.
- [32] Anderson, G.M., Beijer, P., Bang, A.S., Fenwick, M.A., Bunn, S.J., Grattan, D.R., 2006. Suppression of prolactin-induced signal transducer and activator of transcription 5b signaling and induction of suppressors of cytokine signaling messenger ribonucleic acid in the hypothalamic arcuate nucleus of the rat during late pregnancy and lactation. *Endocrinology* 147(10):4996–5005.
- [33] Trujillo, M.L., Spuch, C., Carro, E., Senaris, R., 2011. Hyperphagia and Central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* 152(4):1355–1365.
- [34] Li, Z., Ceccarini, G., Eisenstein, M., Tan, K., Friedman, J.M., 2013. Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor. *Molecular Metabolism* 2(4):364–375.
- [35] Reed, A.S., Unger, E.K., Olofsson, L.E., Piper, M.L., Myers Jr., M.G., Xu, A.W., 2010. Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes* 59(4):894–906.
- [36] Roberts, A.W., Robb, L., Rakar, S., Hartley, L., Cluse, L., Nicola, N.A., et al., 2001. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(16):9324–9329.
- [37] Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G.H., Zhao, C., Darnell, R., et al., 1997. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(13):7001–7005.
- [38] Sachithanandan, N., Fam, B.C., Fynch, S., Dzamko, N., Watt, M.J., Wormald, S., et al., 2010. Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity. *Hepatology* 52(5):1632–1642.
- [39] Jorgensen, S.B., O'Neill, H.M., Sylow, L., Honeyman, J., Hewitt, K.A., Palanivel, R., et al., 2013. Deletion of skeletal muscle SOCS3 prevents insulin resistance in obesity. *Diabetes* 62(1):56–64.
- [40] Cohen, P., Zhao, C., Cai, X., Montez, J.M., Rohani, S.C., Feinstein, P., et al., 2001. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *Journal of Clinical Investigation* 108(8):1113–1121.
- [41] de Luca, C., Kowalski, T.J., Zhang, Y., Elmquist, J.K., Lee, C., Kilimann, M.W., et al., 2005. Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *Journal of Clinical Investigation* 115(12):3484–3493.