ANGELA MARIA RAMOS LOBO

**ESTUDO DAS FUNÇÕES DA LEPTINA DURANTE O
PERÍODO INTRAUTERINO E INFÂNCIA NO
CAMUNDONGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo

2018

ANGELA MARIA RAMOS LOBO

**ESTUDO DAS FUNÇÕES DA LEPTINA DURANTE O
PERÍODO INTRAUTERINO E INFÂNCIA NO
CAMUNDONGO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-
USP) para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

São Paulo

2018

Angela Maria Ramos Lobo

**Estudo das funções da leptina durante o período
intrauterino e infância no camundongo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Donato Júnior

Versão Original

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ramos Lobo, Angela Maria

Estudo das funções da leptina durante o período
intrauterino e infância no camundongo / Angela Maria
Ramos Lobo; orientador José Donato Júnior. -- São
Paulo, 2018.

158 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Leptina. 2. Programação metabólica. 3.
Obesidade. 4. Balanço energético. I. Donato Júnior,
José, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Angela Maria Ramos Lobo

Titulo da Tese: Estudo das funções da leptina durante o período intrauterino e infância no camundongo.

Orientador: Jose Donato Junior

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ____/____/____, considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:

Dedico esta tesis a mi familia: mis viejos (Lucho y Lucy) y mis hermanos (Jose y Any) por acompañarme, apoyarme y cuidarme siempre. Los amo demais.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por tudo que tenho. Por guiar meus passos e me acompanhar em cada momento.

Agradezco a mi familia: mis viejos y mis hermanos. Por acompañarme siempre de cerca, por ser mi base y darme la seguridad de aventurarme en nuevos caminos con la certeza de que están al lado mio. Por compartir cada momento de mi vida académica y dividir mis alegrías y mis frustraciones. Los amo demais!!

À melhor amiga que a vida me deu. Dani, falei no agradecimento da dissertação e repito agora, você é o meu anjo da guarda. Obrigada por acompanhar de perto cada momento dessa etapa, pela sua amizade, as nossas conversas, as risadas, por tudo que você me ensinou na bancada e fora dela. Te admiro muito, como pesquisadora e como pessoa. Obrigada por me permitir ter a companhia dos meninos, que me recebem em casa e me acompanham todos os dias com muito carinho, me dão paz e me fazem rir.

Ao meu orientador, Prof. José Donato Júnior por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse projeto maravilhoso que me apaixonou até hoje. Agradeço pela confiança no meu trabalho e por tudo que aprendi e cresci durante meu doutorado.

À Pry, pela amizade e a parceria no trabalho, as discussões dos trabalhos, os memes e os passeios.

Aos meus colegas e amigos do laboratório por tudo que aprendemos juntos na bancada e no biotério. Obrigada pela companhia, as risadas, os cafés, as conversas e os momentos que passamos juntos dentro e fora do laboratório. Vocês fizeram o trabalho mais divertido.

À Aninha, pelo seu carinho e cuidado com cada um de nós, e pelas risadas compartilhadas.

À Moranguito pelas risadas e companhia, especialmente nessa última etapa do doutorado.

Ao Mit por sua ajuda no Western Blot e a paciência para discutir e explicar.

Agradeço à CAPES pela bolsa que tive no começo do doutorado.

À FAPESP por ter me dado a bolsa para desenvolver meu trabalho no Brasil e permitido que apresentasse meus resultados em vários congressos; agradeço também por ter me dado a bolsa de estágio no exterior para aprender novas técnicas na Universidade de Columbia em Nova York.

À Prof. Lori Zeltser por ter me recebido tão bem no seu laboratório durante meu BEPE na Universidade de Columbia. Agradeço pelas discussões, pelo aprendizado e pela confiança depositada no meu trabalho para desenvolver técnicas novas.

Aos meus amigos em Columbia: Rim, Seoeun e Mick. Por terem me recebido e acolhido tão bem no laboratório. Por ter tornado cada dia de trabalho um dia divertido e por tudo que me ensinaram e que aprendemos juntos nesses 5 meses.

Ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB, minha casa durante os últimos 7 anos. Os professores, os pós-graduandos, e funcionários.

Agradeço a todas as pessoas que compartilharam momentos comigo durante meu doutorado, certamente aprendi de todas elas e termino essa etapa mais madura e com muito mais conhecimento que quando entrei.

**“Jamás seré el carcelero de mis sueños, ni el
bufón a sueldo del rey del cantar; te venden
mucho misterio los que no se animan a
avanzar.”**

Libertad, Sindicato Mono.

RESUMO

Ramos Lobo, A.M. **Estudo das funções da leptina durante o período intrauterino e infância no camundongo**. 2018. 158 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2018.

A leptina é um hormônio essencial para o controle do balanço energético em adultos, por meio de sua ação em populações específicas de neurônios que expressam o receptor de leptina (Lepr). Atualmente, a obesidade e o sobrepeso constituem a quinta causa de morte no mundo, e no Brasil, pela primeira vez, mais da metade da população tem sobrepeso ou obesidade. A maioria dos obesos apresenta resistência à ação da leptina. Porém, alguns estudos sugerem que no período neonatal e infância a leptina possui funções fisiológicas distintas das observadas em adultos, relacionadas com o desenvolvimento neuronal. Por exemplo, peso excessivo no nascimento ou obesidade infantil está relacionado com alta incidência futura de doenças metabólicas. Nesses casos, é possível que a função da leptina durante o desenvolvimento esteja alterada, representando um dos possíveis mecanismos do chamado “*fetal programming*”. O objetivo desse estudo é compreender melhor as funções da leptina durante o desenvolvimento e as consequências no adulto da sua ausência neste período. Geramos e validamos camundongos geneticamente modificados com o sistema Cre-LoxP induzível por tamoxifeno. Para tanto, utilizamos camundongos Ubiquitina-C-Cre^{ERT2} que apresentam atividade da enzima Cre Recombinase em todas as células do corpo mediante o tratamento com tamoxifeno. Este camundongo foi acasalado com outro que apresenta um bloqueador de transcrição, flanqueado por sítios LoxP, *downstream* o gene *Lepr*. O resultado desse cruzamento é um animal deficiente do *Lepr* (LepRNull), porém até ser tratado com tamoxifeno. Animais adultos tratados com tamoxifeno recuperaram algumas funções fisiológicas em comparação com os controles magros, mas outras permaneceram total ou parcialmente alteradas. No balanço energético, recuperaram o consumo alimentar e reverteram do fenótipo obeso, porém permaneceram mais pesados que os controles magros e com menor gasto energético basal e atividade locomotora voluntária. A adiposidade diminuiu significativamente, mas não foi completamente restaurada. Apresentaram melhor tolerância à glicose que os controles magros, menor sensibilidade à insulina e maior insulinemia. As projeções hipotalâmicas através das quais a leptina regula o metabolismo energético estão diminuídas no grupo LepRNull e foram completamente restauradas nos animais reativados, os quais também recuperaram a capacidade de responder agudamente à leptina. A falta de leptina no desenvolvimento levou os animais LepRNull a terem menor massa encefálica, sendo este parâmetro parcialmente revertido após a reativação. A reativação do *Lepr* antes do fenótipo de obesidade preveniu as alterações na homeostase glicêmica, porém os animais Ubi-LepRNull ainda tiveram menor gasto energético basal, menor massa encefálica e maior adiposidade. Esses resultados sugerem que a sinalização de leptina durante o crescimento de camundongos é fundamental para o desenvolvimento normal de parâmetros metabólicos e neurológicos, indicando que esses parâmetros podem estar sujeitos à programação metabólica.

Palavras-chave: Leptina. Metabolismo energético. Obesidade. Programação metabólica.

ASBTRACT

Ramos Lobo, A.M. **Study of leptin functions during intrauterine and infancy periods in mice.** 2018. 158 f. Thesis (PhD in Sciences). Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo; Sao Paulo, 2018.

Leptin is an essential hormone for energy balance control in adults, through its action on specific neural populations that express its receptor (Lepr). Currently, obesity and overweight constitute the fifth cause of death worldwide and in Brazil, for the first time more than half of its population is overweight. A common feature in obese people is leptin resistance. However, some studies suggest that during neonatal and infancy periods leptin has physiological effects different than those observed in adults, related to neuronal development. For example, excessive weight at birth or childhood obesity is related to higher incidence of metabolic disorders in the future. In these cases, leptin's functions in early life might be altered, representing a possible mechanism of "*fetal programming*". The objective of this study is to better understand the functions of leptin during development as well as the long-term consequences of its absence in early life. For this, a LoxP-flanked transcription-blocking cassette was inserted in the *Lepr* gene to generate mice null for the Lepr. They were bred with animals expressing Cre-ERT2 fusion protein under the human ubiquitin C promoter sequence. Consequently, tamoxifen injections can induce Cre Recombinase activity and restore Lepr gene expression in adult or young Ubi-Lepr^{Null} mice. Adult mice treated with tamoxifen recover some physiological functions but others seem to partially recovered or not recovered at all. They recovered food intake and reversed the obese phenotype, but remained heavier, with lower energy expenditure and locomotor activity than lean controls. Adiposity and leptinemia were improved but not restored. Their glycemic control remained altered as well as the reproduction axis in females and males. Brain mass was reduced in obese mice and partially recovered after Lepr reactivation. Reactivation before weaning prevented the obese phenotype and restored glycemic control; however energy expenditure, leptinemia and brain mass remained altered. These results strongly suggest that leptin signaling in early life is fundamental for the development of metabolic and neurological parameters and that metabolic programming might influence those parameters.

Keywords: Leptin. Energy balance. Obesity. Metabolic programming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vias de sinalização ativadas pela sinalização da leptina ao seu receptor de forma longa (Lepr-b) (Adaptado de Ramos-Lobo, 2017).	21
Figura 2. Distribuição no hipotálamo de populações neuronais envolvidas na regulação do balanço energético.	22
Figura 3. Ativação gênica condicional pelo sistema Cre-LoxP.	29
Figura 4. Sistema Cre induzível.	29
Figura 5. Esquema dos pesos moleculares obtidos no processo de genotipagem para cada gene avaliado	34
Figura 6. Desenho experimental.	36
Figura 7. Taxa de mortalidade em animais Ubi-Lepr ^{RNull} adultos com o protocolo de reativação antigo (A) e com o novo protocolo (B).	37
Figura 8. Novo desenho experimental. Protocolo modificado de reativação do Lepr	38
Figura 9. A leptina não regula o peso corporal durante a infância apesar da via estar completamente desenvolvida.	49
Figura 10. Validação do modelo de reativação temporal do Lepr em camundongos adultos	51
Figura 11. Caracterização do metabolismo basal de machos adultos após o período de estabilização seguindo a reativação do Lepr.	53
Figura 12. A reativação do Lepr em camundongos machos adultos não restaura o metabolismo basal.	55
Figura 13. Caracterização do metabolismo basal de fêmeas adultas após o período de estabilização seguindo a reativação do Lepr.	57
Figura 14. A reativação do Lepr em camundongos fêmeas adultas não restaura o metabolismo basal.	57
Figura 15. Mecanismos centrais e periféricos envolvidos na restauração parcial do balanço energético em camundongos machos adultos.	59
Figura 16. Jejum de 24h exacerba alterações no metabolismo de camundongos machos adultos após a reativação do Lepr.	60
Figura 17. Exposição aguda (48h) ao HFD exacerba alterações no metabolismo de camundongos machos adultos após a reativação do Lepr.	61
Figura 18. Resposta de fêmeas adultas a um período de jejum de 24h	62
Figura 19. Peso corporal em camundongos jovens antes da expressão do fenótipo de obesidade.	63
Figura 20. Caracterização do metabolismo basal de machos jovens após o período de estabilização seguindo a reativação do Lepr.	64
Figura 21. A reativação do Lepr em camundongos machos jovens não restaura o metabolismo basal.	65

Figura 22. Caracterização do metabolismo basal de fêmeas jovens após o período de estabilização seguindo a reativação do Lepr.	66
Figura 23. Genes envolvidos na regulação do balanço energético são normalizados pela reativação do Lepr em machos jovens.....	66
Figura 24. Resposta a um período de jejum de 24h é melhorada pela reativação de Lepr em machos jovens.....	67
Figura 25. Homeostase glicêmica é parcialmente recuperada pela reativação do Lepr em machos adultos.....	68
Figura 26. Homeostase glicêmica é parcialmente recuperada pela reativação do Lepr em fêmeas adultas.	69
Figura 27. Homeostase glicêmica é normalizada pela reativação do Lepr em machos e fêmeas jovens.....	70
Figura 28. Alterações no eixo reprodutor em decorrência da falta de leptina são parcialmente revertidas após a reativação do Lepr.....	73
Figura 29. A reativação do Lepr em camundongos adultos restaura parcialmente parâmetros neurológicos alterados pela falta de sinalização de leptina.	76
Figura 30. A reativação do Lepr em camundongos jovens não recupera parâmetros neurológicos alterados pela falta de sinalização de leptina.	77
Figura 31. A falta de leptina no desenvolvimento leva a alteração de comportamentos e aprendizados, alguns dos quais são restaurados após a reativação do Lepr em machos adultos.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista de primers utilizados para determinação do genótipo dos modelos utilizados.....	33
Quadro 2. Sequência de primers utilizados para avaliar expressão de genes de interesse.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3v – terceiro ventrículo
 α -MSH – hormônio estimulante de melanócitos α
AgRP – proteína relacionada ao agouti
ARH – núcleo arqueado do hipotálamo
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
DAB – diaminobenzidina
Db – gene do diabetes
Db/db – camundongos portadores de mutação pontual no gene que codifica para o Lepr
DMH – núcleo dorsomedial do hipotálamo
ERT2 – domínio modificado do receptor de estrógeno
GABA – ácido- γ -aminobutírico
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas
GTT – teste de tolerância à glicose
HDAC – desacetilase de histonas
HFD – dieta hipercalórica
HSP – heat shock protein ou proteína do choque térmico
ITT – teste de sensibilidade à insulina
JAK – proteína quinase janus
KPBS – Salina tamponada com fosfato de potássio
Lepr – receptor de leptina
LepR-Null – grupo controle que expressa um bloqueador de transcrição flanqueado por sítios loxP no gene lepr
LH – hipotálamo lateral
MAPK – proteína quinase ativada por mitógenos
NPY – neuropeptídeo Y
Nos1 – enzima óxido nítrico sintase
Ob/ob – camundongos portadores de mutação pontual no gene que codifica para leptina
Ov – tecido adiposo periovariano
PBS – Salina tamponada com fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
P.G. – tecido adiposo perigonadal
PI3K – fosfoinositol 3 quinase
PMv – núcleo pré-mamilar ventral
POMC – proopiomelanocortina
pSTAT3 – transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 fosforilado
PTT – teste de tolerância ao piruvato
PVH – núcleo paraventricular do hipotálamo
RCH – região retroquiasmática
RER – coeficiente respiratório

R.P. – tecido adiposo retroperitoneal

S.C. – tecido adiposo subcutâneo

SNC – sistema nervoso central

SOCS – supressor de sinalização de citocinas 3

STAT3 – transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

TM – tamoxifeno

VMH – núcleo ventromedial do hipotálamo

VO₂ – volume de oxigênio consumido

VCO₂ – volume de dióxido de carbono liberado

Ubi – grupo controle que expressa a enzima Cre sob o promotor de Ubiquitina

Ubi-LepRNull – grupo experimental que expressa a enzima Cre sob o promotor de Ubiquitina e um bloqueador de transcrição flanqueado por sítios loxP no gene *Lepr*

WT: camundongos selvagens

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Leptina	19
1.2 Leptina e sua relação com o metabolismo energético	23
1.3 Leptina na infância: outras funções?	23
1.4 Sistema Cre-LoxP.....	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVO	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Animais	32
4.1.1 <i>Db/db</i>	32
4.1.2 <i>LepR-Null</i>	32
4.1.3 <i>UbiCre</i>	32
4.1.4 <i>LepR-Cre/Tomato-reporter</i>	33
4.2 Confirmação dos genótipos	33
4.3 Delineamento experimental	35
4.3.1 <i>Determinação do momento em que se manifesta o fenótipo de obesidade em camundongos db/db</i>	35
4.3.2 <i>Efeito da leptina na regulação do peso corporal de camundongos selvagens durante a infância</i>	35
4.3.3 <i>Deteção de células responsivas à leptina em filhotes</i>	35
4.3.4 <i>Deleção do gene <i>LepR</i> e posterior reativação por Cre induzida por TM</i>	36
4.4 Validação do modelo experimental	38
4.4.1 <i>Determinação da sensibilidade à leptina</i>	39
4.5 Alterações no balanço energético	40
4.4.1 <i>Avaliação antes, durante e imediatamente após a reativação</i>	40
4.4.2 <i>Avaliação do metabolismo energético</i>	40
4.6 Determinação da homeostase glicêmica	41
4.7 Determinação da adiposidade	41
4.8 Concentração sérica de hormônios	41
4.9 Expressão gênica hipotalâmica	42
4.10 Avaliação da recuperação do sistema reprodutor	43
4.11 Inervação do hipotálamo	43
4.12 Comportamento de estresse, ansiedade e memória	43

4.12.1 Reconhecimento de objetos.....	44
4.12.2 Campo aberto.....	44
4.12.3 Labirinto de Barnes.....	44
4.12.4 Esquiva inibitória.....	45
4.13 Análise dos resultados	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Efeitos da leptina no controle do balanço energético no período pós-natal	47
5.2 Caracterização e validação do modelo de reativação temporal do receptor de leptina	50
5.3 Avaliação metabólica dos animais que não apresentaram expressão do Lepr durante o desenvolvimento neural	52
5.4 Desafios metabólicos: 24h de jejum e exposição aguda a HFD	59
5.5 Avaliação metabólica em animais que tiveram a restauração do Lepr antes do fenótipo de obesidade	63
5.6 Avaliação da homeostase glicêmica em animais que não apresentaram sinalização de leptina durante o desenvolvimento.....	67
5.7 Avaliação de parâmetros endócrinos em animais que não apresentaram expressão do Lepr durante o desenvolvimento.....	71
5.8 Avaliação do desenvolvimento cerebral e de aspectos cognitivos e comportamentais de animais que não apresentaram expressão do Lepr durante o desenvolvimento	74
6 DISCUSSÃO	81
REFERÊNCIAS	92
ANEXOS	98
Aprovação Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA)	98
Artigo 1	99
Artigo 2	133
Artigo 3	148

1 INTRODUÇÃO

O sobrepeso e a obesidade têm se tornado uma das maiores preocupações dos organismos de saúde, sendo a quinta causa de morte globalmente. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o número de pessoas obesas dobrou desde 1980. Em 2008, a população mundial de pessoas com sobrepeso era de 1,4 bilhões de adultos, dos quais 300 milhões de mulheres e 200 milhões de homens eram obesos. Atualmente, mais de 40 milhões de crianças são obesas, sendo 30 milhões crianças em países em desenvolvimento. Em particular no Brasil, mais da metade da população tem excesso de peso.

Segundo pesquisa da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel, Ministério de Saúde), 51% da população brasileira tem sobrepeso, sendo mais observado nos homens (54%) e essa tendência aumenta com o passar dos anos. A obesidade já atinge mais de 17% da população. Entre os fatores moleculares envolvidos com a obesidade, um dos marcadores típicos é a resistência à ação da leptina.

1.1 Leptina

A leptina é um hormônio peptídico formado por 167 aminoácidos e sintetizado principalmente pelos adipócitos, produto da expressão do gene *Lep* (mais conhecido como gene *ob*), e apresenta ação imprescindível para a regulação do metabolismo energético (ROHNER-JEANRENAUD; JEANRENAUD, 1996). A concentração sérica de leptina está diretamente relacionada à quantidade de tecido adiposo branco e, portanto reflete o estado de armazenamento de energia do corpo. A secreção da leptina na corrente sanguínea segue um padrão circadiano. Sua ação ocorre por meio da ligação com o seu receptor cognato de membrana (Ob-Rb ou Lepr), presente principalmente no sistema nervoso central (PELLEYMOUNTER et al., 1995). A mutação pontual e espontânea do gene *ob* em camundongos produz um fenótipo de obesidade, resistência à insulina, caracterizado também pela diminuição na atividade motora, na taxa metabólica basal e na temperatura corporal (BRAY; YORK, 1979). Quando adulto e em homozigose (*ob/ob*), os animais são inférteis (CHEHAB; LIM; LU, 1996; INGALLS; DICKIE; SNELL, 1950).

Outro modelo animal para estudar a função da leptina é o portador da mutação pontual no gene *Lepr* (também chamado de *gene do diabetes, db*), que leva à perda da forma longa do receptor de leptina. De forma similar aos *ob/ob*, os camundongos *db/db* apresentam obesidade mórbida, hiperglicemia, problemas endócrinos e metabólicos, assim como infertilidade (COLEMAN, 1978). A administração de leptina tanto em animais quanto em humanos deficientes do hormônio leva a diminuição da ingesta alimentar e do peso corporal, porém não tem nenhum efeito nos animais deficientes do seu receptor (FAROOQI et al., 2002; PELLEYMOUNTER et al., 1995).

O *Lepr* pertence à superfamília de receptores de citocina da classe 1 (TARTAGLIA et al., 1995). O *splicing* alternativo do gene *Lepr* gera seis isoformas possíveis do receptor de leptina (Ob Ra-f) com domínios N-terminal iguais, porém diferentes domínios C-terminal. A região intermembrana possui um sítio rico em prolina que favorece a ligação à tirosina quinase janus, em particular JAK2. Somente a isoforma longa do receptor (Ob-Rb) possui regiões adicionais que permitem a sinalização completa JAK-STAT. Após a ligação da leptina ao Ob-Rb, JAK2 se autofosforila e promove a fosforilação de resíduos em tirosina na região C-terminal do *Lepr*. Esses resíduos fosforilados permitem o recrutamento e ativação de diversas vias de sinalização, incluindo a família de STAT (transdutores de sinal e ativadores da transcrição), principalmente o STAT3, a fosfoinositol-3-quinase (PI3K), assim como proteínas da via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK/ERK). Assim, a leptina é capaz de ativar essas vias de sinalização por meio da união ao seu receptor em neurônios de vários núcleos do sistema nervoso central (HARVEY, 2003).

Outra proteína capaz de se ligar em um dos resíduos tirosina é o supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3), a qual inibe a sinalização da leptina. Dado que a transcrição do SOCS3 depende da ativação da via de sinalização da leptina através do STAT3, ele exerce a inibição através de um mecanismo clássico de retroalimentação negativa (RAMOS-LOBO; DONATO JUNIOR, 2017).

Figura 1. Vias de sinalização ativadas pela sinalização da leptina ao seu receptor de forma longa (Lepr-b) (Adaptado de Ramos-Lobo e Donato Junior, 2017).

Apesar de o Lepr estar expresso em células de vários órgãos, o sistema nervoso central (SNC) é o principal local de ação da leptina para a regulação do balanço energético e da homeostase energética (COHEN et al., 2001). Particularmente, o núcleo arqueado do hipotálamo (ARH) representa um sítio fundamental de ação da leptina, que regula a atividade de dois grupos neuronais que expressam o Lepr (VAN DE WALL et al., 2008)(Figura 2A). Um deles é estimulado pela leptina e é constituído por neurônios que expressam a proopiomelanocortina (POMC), cujos alguns produtos de clivagem causam efeito anorexígeno (p.ex., α -MSH) (BALTHASAR et al., 2004; ELIAS et al, 1999). Outro grupamento neuronal é inibido pela leptina e é composto por neurônios GABAérgicos que co-expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada à agouti (AgRP), ambos com ações orexígenas (Hahn et al., 1998; SCHWARTZ et al., 1996).

Esses neurônios se projetam por sua vez para diversas regiões encefálicas, particularmente para o núcleo paraventricular hipotalâmico (PVH), onde têm papel

fundamental na regulação do balanço energético (Figura 2B). O PVH é constituído por vários compartimentos funcionais que regulam atividades neuroendócrinas, comportamentais (por exemplo, ingestão alimentar) e autonômicas envolvidas no controle do balanço energético. A facilidade com que a leptina regula as reservas de energia se deve ao acesso direto que o hormônio tem aos neurônios hipotalâmicos que controlam o comportamento alimentar e outros aspectos do metabolismo energético. O ARH está intimamente relacionado à obesidade. Suas células expressam o *Lepr* e, em resposta a injeções de leptina, exibem a fosforilação do STAT3. Portanto, a fosforilação do STAT3 pode ser utilizada como marcador de células diretamente responsivas à leptina (Buettner et al., 2006; EL-HASCHIMI et al., 2000; MUNZBERG; FLIER; BJORBAEK, 2004).

Figura 2. Distribuição no hipotálamo de populações neuronais envolvidas na regulação do balanço energético. (A) Neurônios AgRP estão localizados próximos do terceiro ventrículo (3v) e da eminência mediana (ME), enquanto que os neurônios POMC se localizam predominantemente na porção lateral do ARH. Os neurônios POMC são visualizados através de marcação do peptídeo β -endorfina, enquanto que os neurônios AgRP são visualizados utilizando um camundongo portador da proteína repórter Td-Tomato sob a expressão do promotor AgRP. (B) O PVH recebe projeções densas de neurônios *Lepr*/AgRP. As fibras verdes são visualizadas por marcação do peptídeo AgRP enquanto que os axônios de neurônios que expressam *Lepr* são visualizados em vermelho utilizando um camundongo que expressa a proteína fluorescente Td-Tomato sob o promotor do *Lepr*. Em amarelo se observa a forte co-localização de ambas fibras (Adaptado de Ramos-Lobo e Donato Junior, 2017).

Animais deficientes em leptina (*ob/ob*) apresentam concentração abundante do neurotransmissor NPY no hipotálamo, e essas concentrações elevadas são revertidas pelo tratamento sistêmico com leptina exógena (SCHWARTZ et al., 1996). Experimentos mostraram que administração crônica deste mediador é capaz de emular o fenótipo dos *ob/ob*, incluindo hiperfagia, obesidade, termogênese reduzida, e menor fertilidade (STANLEY et al., 1986).

Além do ARH, vários outros núcleos hipotalâmicos expressam o Lepr, como o núcleo pré-mamilar ventral (PMv), o núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH), o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) e a área hipotalâmica lateral (LH), entre outros (SCOTT et al., 2009). Essas regiões estão envolvidas no controle neural da alimentação e do balanço energético. As projeções do ARH para esses núcleos hipotalâmicos que participam na regulação do controle alimentar sugerem que o ARH é o regulador principal da sinalização de leptina no encéfalo, embora outros núcleos possam ter participação significativa nessas funções (MUNZBERG; MORRISON, 2015; RAMOS-LOBO; DONATO JUNIOR, 2017).

1.2 Leptina e sua relação com o metabolismo energético

Como foi descrito anteriormente, o principal tecido no qual a leptina age é o sistema nervoso central, particularmente o hipotálamo. Vários órgãos expressam o Lepr como intestino delgado, estômago, fígado e pâncreas, porém a falta de sinalização de leptina nesses órgãos não compromete o metabolismo energético, mostrando que a leptina regula o metabolismo de carboidratos e lipídios através da sinalização central (GUO et al., 2007).

A ausência de leptina, tanto em camundongos *ob/ob*, quanto em humanos resulta em resistência à insulina, diabetes mellitus, esteatose, assim como outras características da síndrome metabólica. Em camundongos *ob/ob*, o tratamento com leptina exógena é capaz de reduzir a hiperglicemia, insulinemia e as concentrações de lipídios antes da perda de peso corporal (PELLEYMOUNTER et al., 1995). Existe uma forte ligação entre a insulina e a leptina. O aumento sérico de insulina estimula tanto a síntese quanto a secreção de leptina. A leptina inibe diretamente a síntese de insulina, através da inibição da sua expressão genica e da secreção de insulina dependente de glicose, já que as células β -pancreáticas expressam Lepr (CASES et al., 2001; SEUFERT; KIEFFER; HABENER, 1999).

1.3 Leptina na infância: outras funções?

Existem evidências na literatura de que alterações que levem ao impedimento do desenvolvimento normal do hipotálamo durante o período perinatal podem ter consequências na regulação do metabolismo energético do indivíduo adulto (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004b; KAMITAKAHARA et al., 2018),

devido à importância fundamental dessa estrutura no controle alimentar e o balanço energético. Cabe aqui uma observação importante a respeito do desenvolvimento neuronal de seres humanos e camundongos. Enquanto que muitas das projeções hipotalâmicas em camundongos se desenvolvem nas primeiras semanas após o nascimento, em seres humanos esse desenvolvimento ocorre no último trimestre de gestação (BOURET, 2009; KOUTCHEROV et al., 2002). Este aspecto é bastante relevante, pois, muitas das alterações que acontecem particularmente no último trimestre de gestação em humanos, como ganho de peso gestacional excessivo ou desnutrição, têm impacto importante na predisposição a doenças metabólicas daquele feto na idade adulta (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976; SCHWARTZ; TSCHOP; ZELTSER, 2014).

Já em camundongos, as primeiras semanas de vida são críticas para afetar sua predisposição a alterações metabólicas na vida adulta (BAYOL; FARRINGTON; STICKLAND, 2007; BONEY et al., 2005; JUAN DE SOLIS et al., 2016; LEREA et al., 2016). Por exemplo, em um artigo publicado na revista *Cell* foi demonstrado que o consumo de dietas hipercalóricas durante a fase neonatal impacta significativamente na formação de circuitos hipotalâmicos, porém esse consumo não tem o mesmo impacto no período intrauterino de camundongos (VOGT et al., 2014). Dessa maneira, estudos que avaliam a formação de circuitos hipotalâmicos nas primeiras semanas de vida de camundongos fornecem valiosa informação sobre o desenvolvimento neural de humanos no último trimestre de gestação.

Diferentemente do que se observa no adulto, a leptina não é regulada pela disponibilidade de alimento durante o período neonatal (AHIMA; PRABAKARAN; FLIER, 1998). De forma interessante, observa-se um pico de leptina na circulação durante a segunda semana de vida que atinge valores cerca de 5 a 10 vezes maiores que a concentração de adultos. Este pico de leptina ocorre antes do aumento de corticosterona, T3 e estradiol e desaparece entre os dias 16 e 20 de vida (AHIMA; PRABAKARAN; FLIER, 1998).

Existem numerosas evidências de que em animais jovens (2-3 semanas de vida) a leptina exógena não inibe o crescimento, o consumo alimentar ou gasto energético (AHIMA; HILEMAN, 2000; MISTRY; SWICK; ROMSOS, 1999) (vide resultados). Mistry; Swick e Romsos (1999) mostraram que a leptina não altera o

consumo de oxigênio (marcador do gasto energético) nem o consumo alimentar em animais magros (WT) ou obesos (*ob/ob*) antes do 17º dia pós-natal (P17). Além disso, animais deficientes de leptina não divergem em peso corporal dos seus irmãos magros até a segunda semana de vida (MISTRY; SWICK; ROMSOS, 1999).

Durante muito tempo se acreditou que o encéfalo de roedores durante o período neonatal fosse insensível à leptina e que ocorresse uma resistência à ação do hormônio. Porém, foi descoberto que o ARH de ratos e camundongos expressam *Lepr* antes da consolidação da circuitaria necessária para a ação da leptina conhecida em animais adultos, e mais, esses receptores são ativos e podem desencadear respostas celulares na presença de leptina (CARON et al., 2010). Os autores que defendem a teoria de que a função da leptina no período pós-natal seria a de consolidar a circuitaria necessária para a regulação do controle alimentar no adulto sugerem que a insensibilidade dos receptores à leptina nesse período se deve a uma falha nessas células de encaminhar o sinal da leptina aos outros núcleos hipotalâmicos envolvidos nessa regulação, uma vez que essas projeções ainda estão se formando (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004a).

Em camundongos neonatos, o ARH possui relativamente baixos níveis de expressão do *Lepr* nos dias pós-natal 2 (P2) e 6 (P6) de vida. Todavia, ocorre um aumento de expressão no dia P10, coincidente com o pico de leptina plasmático (AHIMA; PRABAKARAN; FLIER, 1998) e com o desenvolvimento das projeções do ARH para o PVH. Durante a infância (P10), assim como em indivíduos adultos, a leptina age no ARH através do seu receptor cognato ativando vias de sinalização que envolve a sinalização pelo STAT3, ERK e PI3K (BOURET, 2012).

As projeções do ARH se desenvolvem pós-natalmente atingindo seus respectivos destinos em tempos diferentes. A inervação do DMH ocorre no dia P6, seguida da inervação do PVH que acontece entre os dias P8-10, e as projeções para o LHA atingem seu destino no dia P12. O padrão de projeções do animal jovem somente é consolidado após o dia P18 (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004a). Em camundongos adultos, a leptina age no encéfalo reduzindo a ingesta alimentar, entre outros efeitos, pela regulação da atividade de neurônios no ARH.

Em camundongos deficientes em leptina (*ob/ob*) as projeções neurais do ARH para o PVH não se desenvolvem, a menos que os animais sejam tratados com

leptina exógena no período neonatal. Se o tratamento ocorre na idade adulta, este defeito não é capaz de ser revertido. Portanto, alguns autores têm atribuído à leptina uma ação neurotrófica durante o desenvolvimento do hipotálamo, sendo essa atividade restrita a um período crítico neonatal prévio à ação da leptina na regulação da ingestão alimentar. Embora essa ideia seja interessante, existem críticas importantes a esses estudos. Por exemplo, o tratamento exógeno com leptina em camundongos *ob/ob* adultos reverte seu fenótipo de obesidade e hiperfagia (HARRIS et al, 1998). Assim, se a leptina tivesse um papel fundamental e irreversível no desenvolvimento das projeções dos neurônios que expressam o *Lepr*, estes animais não deveriam responder à leptina quando administrada na idade adulta. Portanto, ainda existem muitas lacunas a respeito do efeito neurotrófico da leptina durante a infância. O fato é que nenhum estudo até então conseguiu provar de fato se a ausência da sinalização da leptina durante o período neonatal predispõe às alterações metabólicas futuras.

Além das funções mais conhecidas e estudadas da leptina sobre o controle do balanço energético, existem evidências de efeitos da leptina sobre a excitabilidade e plasticidade neuronal. Em camundongos *ob/ob* se observa uma alteração no perfil sináptico tanto dos neurônios orexígenos que expressam NPY (aumento de sinapses excitatórias) quanto dos neurônios anorexígenos que expressam POMC (aumento de sinapses inibitórias). O tratamento com leptina exógena nesses animais devolve a configuração observada nos animais selvagens; portanto a leptina é capaz de regular tanto o número de sinapses quanto a atividade sináptica das mesmas. Essas mudanças ocorrem de forma rápida (6h após a injeção de leptina), antecedendo a regulação da ingesta alimentar e do peso corporal (PINTO et al., 2004).

Porém, a rapidez com que ocorre essa reorganização dos circuitos nos neurônios NPY e POMC sugere que essas alterações observadas nos animais *ob/ob* não resultaram de uma alteração irreversível durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Em humanos, a mutação no gene *ob* causa, além dos transtornos já descritos no balanço energético, uma taxa de desenvolvimento cognitivo menor em crianças (idade de desenvolvimento menor à idade cronológica). O tratamento com leptina, além de melhorar o peso e reverter a hipertensão arterial, a dislipidemia e a

hiperinsulinemia, melhora o desempenho cognitivo, levando-o mais próximo do esperado de acordo com a idade (PAZ-FILHO et al., 2008).

Ratos com diabetes tipo II apresentam deficiência em testes cognitivos que dependem de funções do hipocampo. Em camundongos adultos, a leptina regula a neurogênese no giro denteado hipocampal tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Camundongos *db/db* e ratos *Zucker* (deficientes do *Lepr*) apresentam mecanismos de consolidação da memória prejudicados no CA1, assim como pioras na memória espacial (LI et al., 2002).

Existem evidências de que a leptina é importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, já que camundongos adultos *ob/ob* e *db/db* apresentam menor peso encefálico e menor conteúdo proteico (SPEIJERS, 1979; VAN DER KROON), assim como deficiência nas capacidades cognitivas, sendo que muitas dessas alterações são melhoradas com o tratamento exógeno com leptina. Essas melhoras ocorrem particularmente quando os animais ainda são jovens, sugerindo que a sinalização da leptina pode ser necessária durante o desenvolvimento (AHIMA et al., 1999; STEPPAN; SWICK, 1999; UDAGAWA et al., 2007).

Uma explicação para a existência de uma janela temporal crítica para os efeitos neurotróficos da leptina se deve à perda progressiva da plasticidade neuronal que pode ser significativamente menor em adultos. Provas a respeito da perda da plasticidade da formação dos circuitos hipotalâmicos que regulam o balanço energético foram fornecidas por um conjunto elegante de artigos publicados nos últimos anos a respeito das células GABA/NPY/AgRP do ARH. Uma injeção central de NPY ou AgRP estimula fortemente o consumo alimentar, porém animais nocautes para esses genes paradoxalmente não apresentam alteração importante no comportamento alimentar (ERICKSON; CLEGG, 1996; PALMITER et al., 1998; QIAN et al., 2002).

Em concordância, se camundongos neonatos tiverem ablação desses neurônios, estes animais também não apresentam alterações do balanço energético, sugerindo uma intensa plasticidade neuronal para geração de mecanismos compensatórios para suprir a falta desses neurônios. Todavia, se a perda dessas células produtoras de GABA/NPY/AgRP for induzida em camundongos adultos, nesse caso os animais apresentarão profunda supressão da ingestão alimentar até a

inanição completa. Além de provar a importância dos neurônios GABA/NPY/AgRP para o controle do balanço energético, esses estudos certamente comprovam que existe grande plasticidade nesses circuitos até certo período da vida. Nossa hipótese é que a leptina atue de maneira importante na formação de múltiplos circuitos neurais hipotalâmicos e extra-hipotalâmicos (por exemplo, no hipocampo) durante as primeiras semanas de vida do camundongo (que equivale ao terceiro trimestre de gestação em humanos).

1.4 Sistema Cre-LoxP

As possíveis evidências dessa ação durante o desenvolvimento, que se perde durante a maturação somática, foram estudadas no presente trabalho pela capacidade de controlar temporalmente a expressão do *Lepr*. Assim, a geração de animais portadores de mutações condicionais é uma ferramenta sofisticada na análise da função de genes e proteínas em seu contexto fisiológico. A técnica empregada utiliza a enzima Cre Recombinase, obtida originalmente do bacteriófago P1, que mediante recombinação homóloga, remove sequências de DNA flanqueadas por sítios LoxP. Esse sistema permite a inativação ou reativação da expressão fisiológica de genes de interesse em locais específicos (MANSUY; SUTER, 2000).

Maiores desenvolvimentos deste sistema levaram à criação de um sistema que permite o controle temporal da recombinação gênica. Isto pode ocorrer através da fusão da Cre com o receptor de estrógeno mutado. A modificação nesse receptor impede a ligação com o estradiol endógeno, mas permite que o 4-hidroxi (OH)-tamoxifeno (TM) o ative. Quando isso ocorre, a Cre, que está no citoplasma, é liberada para entrar no núcleo onde terá ação de DNA recombinase. Esse sistema tem se mostrado eficiente, tanto *in vitro*, quanto em embriões de camundongos ou em adultos (DANIELIAN et al., 1998; LEONE et al., 2003; VOOIJS; JONKERS; BERNIS, 2001; WEBER; METZGER; CHAMBON, 2001). As figuras 3 e 4 exemplificam o mecanismo de ação do sistema.

Figura 3. A) Ativação gênica condicional pelo sistema Cre-LoxP. Sistema de ativação de Cre. A sequência flanqueada pelos sítios LoxP pode ser retirada por recombinação homóloga pela ação da enzima Cre recombinase. B) Um dos animais é portador dos alelos flanqueados por sítios LoxP (direita) e o outro é portador da enzima CreERT2 (esquerda). Alguns filhotes da descendência serão portadores de ambas as mutações e terão a sequência flanqueada por LoxP eliminada especificamente nos tecidos onde Cre é expressa.

Figura 4. Sistema Cre induzível. Na ausência do ligante correspondente, a Cre recombinase fusionada com o domínio modificado do receptor de estrógeno (ERT2) está bloqueada por uma heat shock protein (HSP90). A ligação do tamoxifeno (TM) ao receptor modificado de estrógeno causa dissociação da HSP90 do complexo e a Cre recombinase migra ao núcleo celular onde reconhece os sítios LoxP do gene de interesse e promove a recombinação com consequente excisão do fragmento flanqueado.

2 JUSTIFICATIVA

Tanto o ganho de peso gestacional excessivo quanto a desnutrição intrauterina, são fatores de risco que causam predisposição do feto a desenvolver obesidade, diabetes e outras alterações metabólicas, na idade adulta. Além disso, cerca de um terço das crianças brasileiras estão acima do peso ideal e evidências epidemiológicas mostram que estas terão risco aumentado de se tornarem adultos obesos.

É bem sabido que alterações na sinalização da leptina, tais como resistência à leptina, são características chave da obesidade. A leptina parece desempenhar papel permissivo importante para o desenvolvimento adequado do encéfalo e das funções cognitivas. Esses efeitos ocorrem em estágios de desenvolvimento do sistema nervoso central. Portanto, a obesidade infantil, por meio de alterações na sensibilidade à leptina ou na sua concentração na circulação, pode hipoteticamente acarretar em prejuízos sobre o desenvolvimento cognitivo e cerebral.

Todavia, nosso conhecimento sobre a ação da leptina durante fases críticas de desenvolvimento neural (intrauterina, neonatal e infância) ainda é incompleto. Portanto, espera-se que o presente estudo possa contribuir significativamente com o entendimento da função da leptina durante essas fases críticas de desenvolvimento do sistema nervoso.

3 OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho é estudar aspectos fisiológicos que são comprometidos no indivíduo adulto em decorrência da falta de sinalização de leptina durante o desenvolvimento intrauterino e na infância.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Animais (diferentes modelos de camundongos, conforme descritos a seguir) foram produzidos e mantidos no Biotério de Camundongos para o Estudo das Neurociências do Departamento de Fisiologia e Biofísica (ICB/USP) e utilizados de acordo com certificado aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (protocolo sob o número 137 nas fls. 12 do livro 03) e normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

4.1.1 *Db/db*

São camundongos que possuem mutação espontânea no gene *Lepr*. Esse modelo pode ser considerado um nocaute “natural” do gene que codifica para o *Lepr*. Quando homozigoto, seu fenótipo é de obesidade mórbida, hiperglicemia, problemas endócrinos e metabólicos e infertilidade (HALAAS et al., 1995).

4.1.2 *LepR-Null*

São camundongos obtidos a partir de recombinação homóloga em células tronco-embrionárias e apresentam um bloqueador de transcrição, flanqueado por sítios LoxP, *downstream* o gene *Lepr* (STOCK *Lepr*^{tm1Jke/J}, The Jackson Laboratory). Portanto, o animal homozigoto para essa mutação é deficiente para o receptor de leptina (fenótipo similar ao *db/db*), mas a expressão fisiológica desse receptor pode ser restaurada em células que expressam a enzima Cre recombinase. Esse animal já foi descrito e validado em estudos anteriores (BERGLUND et al., 2012; CRAVO et al., 2013).

4.1.3 *UbiCre*

São camundongos UbiquitinaC-cre (*B6.Cg-Tg(UBC-cre/ERT2)1Ejb/J*, The Jackson Laboratory). Este transgênico expressa a enzima Cre recombinase, a partir de promotores do gene ubiquitina C; portanto de forma ubíqua (todas as células do corpo). Contudo, a expressão de Cre ocorre apenas quando a célula é exposta ao

tamoxifeno. Portanto, é um animal que permite realizar manipulações gênicas de forma temporal.

Dado que, em homozigose, os animais LepR^{Null} são inférteis, para obtenção dos animais experimentais foram realizados cruzamentos entre animais UbiCreERT2-LepR^{Null/+} x LepR^{Null/+}. Desses cruzamentos geramos animais capazes de induzir a reativação do LepR (12,5% UbiCreERT2-LepR^{Null/Null}), assim como os grupos controles deficientes do LepR (12,5% LepR^{Null/Null}) e com fenótipo de animais selvagens (12,5% UbiCreERT2).

4.1.4 *LepR-Cre/ Tomato-reporter*

São camundongos que expressam duas modificações: a enzima Cre em células que expressam o receptor de leptina (B6.129-Lepr^{tm2(cre)}Rck/J, The Jackson Laboratory) e o gene “reporter” tdTomato (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J, The Jackson Laboratory). Esses camundongos permitem a visualização das células que expressam o receptor de leptina, por meio da expressão da proteína fluorescente vermelha tdTomato. Esses animais foram utilizados em experimentos morfológicos e eletrofisiológicos.

4.2 Confirmação dos genótipos

Os grupos foram confirmados mediante genotipagem. Entre 21 a 28 dias de vida foram realizados o desmame, identificação e coleta de uma amostra de epitélio caudal para genotipagem. 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-AmpTM Tissue PCR kit, Cat N°. XNAT2) com *primers* específicos. Todos os experimentos foram conduzidos de forma que os animais controle fossem oriundos das mesmas ninhadas que os animais com reativação.

A continuação seguem os *primers* utilizados para genotipagem de cada gene de interesse e os tamanhos das bandas esperadas para cada genótipo.

Gene	Código de acesso	Sequência Primer
Tomato-ROSA26 Reporter	oIMR9020	5'-AAGGGAGCTGCAGTGGAGTA-3'
	oIMR9021	5'-CCGAAAATCTGTGGGAAGTC-3'
	oIMR9103	5'-GGCATTAAAGCAGCGTATCC-3'
	oIMR9105	5'-CTGTTCTGTACGGCATGG-3'
LepR-Null reativável	15369	5'-TGGCTTTTAAGCTCTGCAGTC-3'
	15370	5'-TAGGGCCAAACCCACATTTA-3'
	15371	5'-CCCAAGGCCATACAAGTGTT-3'
db/db	oIMR0985	5'-AGAACGGACACTCTTTGAAGTCTC-3'
	oIMR0986	5'-CATTCAAACCATAGTTTAGGTTTGTGT-3'
Ubiquitin-Cre	CZ054	5'-TGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT -3'
	CZ058	5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCAC -3'
	oIMR7338	5'-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3'
	oIMR7339	5'-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC-3'
LepR-Cre	LepRcre_WT1F	5'-ACCTGTTCCACGCACAGTCACA -3'
	LepRcre_WT1R	5'-AGCTGGCCAAATCTCAGAGCTGC -3'
	CZ054	5'-TGCTTCTGTCCGTTTGCCGGT -3'
	CZ058	5'-GTGAAACAGCATTGCTGTCAC -3'

Quadro 1. Lista de primers utilizados para determinação do genótipo dos modelos utilizados.

Tomato-ROSA26 Reporter				
WT		Het		Homo
297		297		
		196		196

LepR-Null reativável				
WT		Het		Homo
540		540		
		350		350

db/db				
WT		Het		Homo
135		135		
		108/27		108/27
enzima de restrição RsaI				

Ubiquitin-Cre				
WT		Het		
324		324		
		213		

LepR-Cre				
WT		Het		Homo
900		900		
		213		213

Figura 5. Esquema dos pesos moleculares obtidos no processo de genotipagem para cada gene avaliado.

4.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental desse trabalho foi o seguinte:

4.3.1 *Determinação do momento em que se manifesta o fenótipo de obesidade em camundongos db/db*

Para estudar esse fenótipo, foram feitos cruzamentos entre indivíduos heterozigotos (*db/+*) obtendo ninhadas com indivíduos *db/db*, heterozigotos (*db/+*) e controles (*wt*). No total, estudamos 12 ninhadas. A partir do primeiro dia de vida dos filhotes, esses animais foram identificados e acompanhados 3 vezes por semana para determinar o ganho de peso corporal até a 8^o semana de vida.

4.3.2 *Efeito da leptina na regulação do peso corporal de camundongos selvagens durante a infância*

Dez ninhadas de camundongos selvagens da linhagem C57BL/6 (padronizadas com seis filhotes cada uma) receberam administração subcutânea diária de leptina recombinante de camundongo (1µg/g; National Hormone and Peptide Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Torrance, CA) ou PBS a partir do 10^o dia de vida até o 22^o dia para avaliar a progressão do ganho de peso (MISTRY; SWICK; ROMSOS, 1999). Posteriormente esses animais foram acompanhados até a 8^a semana de vida. Avaliamos a resposta à leptina (1µg/g) em animais adultos de maneira similar para comparação dos resultados (grupo controle positivo para os efeitos da leptina). Nas fêmeas, também foi determinado o dia da abertura vaginal.

4.3.3 *Deteção de células responsivas à leptina em filhotes*

Utilizamos 4 camundongos LepRCre/Tomato-reporter com 10 dias de vida (P10), os quais receberam infusão subcutânea de leptina (10µg/g) e foram perfundidos 1 hora depois (formalina tamponada à 10%, Sigma) durante 10 minutos. Após a perfusão, coletamos os encéfalos, permanecendo em fixador por um período *overnight*. No dia seguinte, os encéfalos foram transferidos para uma solução de PBS+sacarose 20%. Os encéfalos foram cortados em 4 séries de 30 µm e guardados em solução anticongelante (-20°C) para posterior visualização das células que expressam o *Lepr*, por meio da expressão da proteína tdTomato. Além

disso, realizamos reações de imunohistoquímica para visualização do estado fosforilado do STAT3 (pSTAT3), que é considerado um marcador confiável das células responsivas à administração aguda de leptina. Mediante experimentos eletrofisiológicos determinamos os efeitos da leptina sobre o potencial de membrana e a frequência de potenciais de ação em células que expressam o *Lepr* de camundongos com 8 a 16 dias de vida (experimentos feitos em colaboração com a Profa. Dra. Renata Frazão e a Dra. Marina Silveira, Departamento de Anatomia, ICB/USP).

4.3.4 Deleção do gene *Lepr* e posterior reativação por *Cre* induzida por TM

A deleção do gene *Lepr* foi obtida com o uso de camundongos *Lepr*^{Null/Null}. A reativação da expressão do *Lepr* em todas as células do corpo foi obtida por meio de 5 injeções intraperitoneais de tamoxifeno (0,15 mg/g de peso diluído em óleo de gergelim, Sigma) administradas em dias consecutivos (LEONE et al., 2003). Os grupos estudados foram: Ubi-*LepR*Null (animais nos quais ocorreu a reativação do *Lepr*), *LepR*Null (controle obeso sem o *Lepr*), e Ubi (controle com fenótipo de animais selvagens). Todos os grupos foram tratados com tamoxifeno (Figura 6).

Camundongos com **10 semanas de vida**, machos e fêmeas:

Semana 1 de tratamento	Semanas 2-7 de tratamento	Semana 8 de tratamento
5 injeções de TM (0,15mg/g)	Acompanhamento do peso corporal e consumo alimentar	1) Injeção de leptina (5ug/g) e perfusão 90min depois) 2) Testes <i>in vivo</i>

Figura 6. Desenho experimental. A, protocolo original de reativação consistindo em 5 injeções de TM aplicadas em dias consecutivos e posterior divisão dos grupos para validação do modelo (imunohistoquímica e imunofluorescência) ou para testes *in vivo*.

Com o protocolo descrito, conseguimos validar o balanço energético do modelo proposto e observamos as primeiras alterações nos animais nos quais a sinalização de leptina foi restabelecida na vida adulta. Contudo, uma grande dificuldade que enfrentamos para o desenvolvimento do projeto foi a alta taxa de mortalidade dos animais Ubi-*LepR*Null após o tratamento com tamoxifeno. O protocolo original utilizado para reativar os animais (5 doses consecutivas de 0,15mg/g de animais) ocasionou a morte de 60% dos machos (n=22/37) e de 94%

das fêmeas (n=30/32) do grupo Ubi-LepRNull logo após o término das injeções (Figura 7A).

Figura 7. Taxa de mortalidade em animais Ubi-LepRNull adultos com o protocolo de reativação antigo (A) e com o novo protocolo (B).

Dado que nem os controles magros nem os controles obesos morreram recebendo o mesmo tratamento, concluímos que a letalidade se deveria à forte sinalização de leptina repentina nos animais reativados. Para prevenir essa alta letalidade, testamos diferentes protocolos visando atenuar o efeito da leptina durante a reativação, como restrição alimentar prévia à reativação, injeções alternadas de tamoxifeno e pré-tratamento com corticosterona, já que esse hormônio se encontra diminuído em animais deficientes de leptina. Nenhum desses protocolos evitou a morte dos animais durante a reativação (dados não apresentados). Finalmente decidimos realizar uma pré-reativação consistente de uma dose única de tamoxifeno (0,15mg/g), deixamos os animais se habituarem durante duas semanas. Após esse período, realizamos a reativação com 5 doses de tamoxifeno, sendo aplicadas em dias alternados (Figura 8). Após a última injeção acompanhamos os animais e constatamos um aumento marcante na sobrevivência dos animais adultos, tanto machos (100%, n=10/10) como fêmeas (73%, n=8/11) (Figura 7B).

Protocolo novo de reativação

Semana 1 de tratamento	Semanas 3-4 de tratamento	Semana 5-10 de tratamento	Semana 11 de tratamento
1 injeção de TM (0,15mg/g)	5 injeções alternadas de TM (0,15mg/g)	Acompanhamento do peso corporal	Testes <i>in vivo</i>

Figura 8. Novo desenho experimental. Protocolo modificado de reativação do Lepr consistindo em 1 injeção única de TM (pré-reativação), seguida de 2 semanas de descanso e posterior protocolo de 5 injeções de TM aplicadas em dias alternados. Os testes *in vivo* foram aplicados após o período de adaptação de 6 semanas.

4.4 Validação do modelo experimental

Camundongos adultos que passaram pelo protocolo de reativação e foram acompanhados durante 6 semanas até a estabilização do peso corporal e ingesta alimentar foram utilizados para realizar a validação do modelo (Figura 6). Receberam uma única injeção de leptina intraperitoneal (5ug/g, Torrance, CA) e 90 minutos depois da injeção foram perfundidos. Os animais foram anestesiados com isoflurano e utilizamos uma bomba pulsátil passando 20 ml de solução salina seguidos de 150 ml de solução fixadora (Sigma).

Após a perfusão, coletamos os encéfalos e realizamos pós-fixação do tecido em solução fixadora por 45 min. Uma vez pós-fixados, os encéfalos foram transferidos para uma solução de sacarose 20% (PBS + sacarose) onde permaneceram *overnight* para desidratação do tecido. No dia seguinte, realizamos a microtomia do encéfalo inteiro coletando 4 series de 30 µm de espessura, as quais foram guardadas em solução anticongelante.

Para realizar a reação de imunohistoquímica para marcação do pSTAT3 lavamos os cortes em tampão PBS potássico (KPBS 0,02M, pH 7,4) para retirar a solução anticongelante. O pré-tratamento consistiu em colocar os cortes em solução NaOH 1% e H₂O₂ 1% (solução preparada em água destilada) durante 20 minutos, seguido de lavagens em KPBS até limpar completamente o tecido. A continuação, lavamos os cortes com KPBS e os colocamos em solução de 0,3% de glicina (preparada em KPBS) por 10 minutos. Após esse período lavamos os cortes novamente e transferimos os cortes para solução de SDS (0,03%, preparado em KPBS) por 10 minutos.

Posteriormente, realizamos o bloqueio utilizando solução de soro normal de burro 3%, preparado em KPBS + T (solução de 20% Triton X-100 em KPBS) durante 60 minutos. Após o bloqueio, incubamos os cortes com o anticorpo primário anti-pSTAT3^{Tyr715} (1:1000) feito em coelho (Cell Signaling) junto com soro de burro 3% (Jackson Lab) em solução de KPBS + T com azida (0,05% azida) durante 48h. Após a incubação, lavamos os cortes e incubamos no anticorpo secundário biotilado anti-coelho IgG 1:1000 (Jackson ImmunoResearch) preparado em KPBS + T durante 60 minutos, seguido de incubação em kit ABC (Vector Laboratories: A 1:500, B 1:500), preparado em KPBS, durante 90 minutos. Lavamos os cortes (2 lavagens com KPBS e a terceira lavagem em tampão acetato 0,01M, pH 6,0).

Após a lavagem em tampão acetato realizamos a reação colocando os cortes em solução de tampão acetato 0,01M contendo níquel sulfato 5%, H₂O₂ 0,03% e diaminobenzidina (DAB, 25µg/µl) e acompanhamos a reação até observar a marcação de pSTAT3 nos cortes. Interrompemos a reação transferindo os cortes para solução de tampão acetato 0,01M por 10 minutos, seguido de lavagens em KPBS. Finalmente, montamos os cortes em lâminas gelatinizadas e depois de secas, cobrimo-las com meio de montagem DPX (Sigma). Os núcleos das células que foram ativadas pela leptina marcadas com pSTAT3 foram contados utilizando o software ImageJ (imagej.nih.gov/ij/). Foi considerado um nível rostrocaudal de cada núcleo para cada animal nas análises.

4.4.1 Determinação da sensibilidade à leptina

Para o teste de sensibilidade aguda à leptina os animais receberam administração intraperitoneal de leptina recombinante de camundongo (2,5 µg/g, (DA SILVA et al., 2014)) às 17h (3h antes da fase escura começar). O consumo alimentar e peso corporal foram mensurados 24 horas após a administração de leptina e comparados com o dia prévio, no qual os animais receberam infusão de solução veículo (PBS).

4.5 Alterações no balanço energético

4.4.1 Avaliação antes, durante e imediatamente após a reativação

A partir da 10ª semana de vida, os animais foram individualizados e após 3 dias de adaptação, avaliamos o consumo alimentar durante o período basal (5 dias). Depois, ocorreu o período de reativação (10 dias) e o acompanhamento (três vezes por semana) posterior até a estabilização do peso corporal e ingestão alimentar. Após a estabilização do peso corporal e do consumo alimentar, realizamos um novo registro basal de peso e ingestão alimentar (5 dias). Posteriormente, um novo grupo de animais (4 semanas de vida) passaram pelo mesmo protocolo de reativação para caracterização do modelo de reativação em animais jovens, antes da expressão do fenótipo obeso. Neste grupo foram avaliados os parâmetros que não foram recuperados no grupo adulto.

4.4.2 Avaliação do metabolismo energético

O foco deste estudo foi avaliar os animais depois que eles atingiram a estabilidade após a reativação. Após esse momento, avaliamos o peso corporal e a ingestão alimentar (5 dias), bem como possíveis alterações no balanço energético com o uso do equipamento OXYMAX/CLAMS (Comprehensive Lab Animal Monitoring System, Columbus Instruments). Esse aparelho consiste de oito gaiolas que permitem registrar o consumo de O_2 e a produção de CO_2 de cada uma delas individualmente. As caixas também estão equipadas com balanças para acompanhar a ingesta alimentar, assim como sensores de movimento por infravermelho que registram a atividade locomotora voluntária e sensores que registram o volume hídrico consumido.

Com essas medições, o software (Oxymax for Windows v5.02) é capaz de inferir vários parâmetros metabólicos. Assim, foi avaliado o gasto energético (VO_2), o coeficiente respiratório (razão VCO_2/VO_2), a atividade locomotora voluntária, bem como a ingestão alimentar e o consumo hídrico durante 5 dias. Com os animais no CLAMS realizamos dois testes agudos para desafiar o metabolismo dos animais: exposição aguda a uma dieta hiperlipídica (HFD, 5,31 kcal/g, 58% calorias provenientes de gordura, Prag Soluções) e um período de jejum de 24h com posterior realimentação. A exposição à HFD foi realizada colocando ração rica em

gordura 2h antes do começo da fase escura (18h). Monitoramos os parâmetros metabólicos 24h antes do começo do HFD e 48h após (XU et al, 2010). Após recuperação em dieta convencional os animais foram expostos a 24h de jejum e monitoramos os parâmetros metabólicos durante o jejum e durante 48h de realimentação.

4.6 Determinação da homeostase glicêmica

Após a estabilização do peso corporal e consumo alimentar, os animais reativados e seus respectivos controles foram sujeitos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Foi retirado o alimento dos animais 4 horas prévias ao início do teste para padronização do estado pós-prandial. No início do teste, os animais receberam solução de glicose intraperitoneal (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 (OneTouch Ultra, J&J). Após um período mínimo de recuperação de 3 dias, realizamos testes de sensibilidade à insulina (ITT) e da capacidade gliconeogênica (PTT), da mesma forma que o descrito anteriormente, exceto que os animais receberam solução contendo insulina humana (1 UI/kg) ou piruvato sódico (2 g/kg, Sigma).

4.7 Determinação da adiposidade

Avaliamos a adiposidade dos animais através da pesagem dos depósitos de gordura de três territórios em machos (SC: subcutâneo, RP: retroperitoneal e PG: perigonadal). No caso das fêmeas, além dos três territórios mencionados previamente foi determinada a adiposidade do território periovariano (Ov). A adiposidade foi calculada como a média das gorduras esquerda e direita e relativizada ao peso corporal do animal.

4.8 Concentração sérica de hormônios

Durante o sacrifício dos animais para coleta de tecidos a fresco o sangue foi coletado e centrifugado (temperatura ambiente, 10 minutos a 4000 rpm) para obtenção de sua porção sérica, a qual foi utilizada para determinação dos níveis de leptina (Crystal Chem, #90030), insulina (Crystal Chem, #90080), tiroxina (T4) (CalBiotech, #T4044T-100), testosterona (CalBiotech, #TE1875-100) por meio de

kits de ELISA comercialmente disponíveis. A dosagem de noradrenalina foi determinada na urina coletada em três momentos do dia (ABNOVA #KA-1891).

4.9 Expressão gênica hipotalâmica

Hipotálamos de camundongos machos dos três genótipos, jovens e adultos, foram coletados a fresco durante o sacrifício, congelados imediatamente em gelo seco e posteriormente mantidos a -80°C até o processamento. Extraímos o RNA total das amostras com o reagente TRIzol® (Invitrogen). Quantificamos o RNA utilizando o Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek®). Após quantificação tratamos as amostras com DNase I (Roche Applied Science), seguido de transcrição reversa utilizando 2µg de RNA total, SuperScript® II Transcriptase reversa (Invitrogen) e random primers p(dN)6 (Roche Applied Science). Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando o sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems) com SYBRgreen máster mix e primers específicos para genes de interesse (Quadro 2). A quantificação da expressão gênica relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e os dados foram normalizados pela média geométrica de genes constitutivos (GAPDH, β -Actina e Ppia) e apresentados em relação à expressão do grupo controle.

Gene	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (3'-5')
Agrp	cttggcgagggtgctagat	aggactcgtgcagccttacac
Npy	cagatactactccgctctgcg	gggctggatctcttgccata
Pomc	tagatgtgtggagctggtgc	ccagcgagaggtcgagtttg
Cart	cagtcacacagcttcccgat	cagatcgaagcgttgcaaga
Bdnf	gccttcacgaaccgaagta	atgttccaccaggtgagaag
Igf1	gtacttccttctctctcttgc	ccacactgacatgcccaga
Dlg4	cccagacctgagttaccctt	agttgcaggtgaacggaaca
Hdac3	ggcctggtaaggctgaaga	ggagctggacacccaatgaa
Hdac5	ctccagtgttgctctggatctc	gcagccctggatgaagcag
Hdac8	agttctggtgaaacaggctct	ctgatgttggcctggggaaa
Kiss1	gattcctttcccaggcatt	ggcaaaagtgaagcctggat
Nos1	cggacctgtagctcttctc	ttcggctgtgcttggatgga
Gapdh	cggcagcccagaacatcat	ccgttcagctctgggatga
β-actina	catcgtggcgctcta	caccacataggagtcttctg
Ppia	cttctgctggtcttgccattcc	tatctgcactgccaagactgagt

Quadro 2. Sequência de primers utilizados para avaliar expressão de genes de interesse.

4.10 Avaliação da recuperação do sistema reprodutor

Avaliamos a fertilidade em camundongos machos após a reativação colocando-os com fêmeas selvagens para determinação do número de fêmeas grávidas no grupo controle (Ubi) e reativado (Ubi-LepRNull). Além disso, foi determinado o número de dias até a gravidez e o número e peso dos filhotes no dia do nascimento. No caso das fêmeas adultas acompanhamos o ciclo estral dos três grupos após o tratamento com TM durante 25 dias através de lavagem vaginal e coleta de células de descamação da vagina. O estágio do ciclo foi determinado segundo a distribuição de células, sendo diestro (maioria de leucócitos), estro (maioria de células cornificadas) e quando observada uma distribuição equitativa dessas células foi considerado o estágio intermediário metestro.

4.11 Inervação do hipotálamo

Estudamos as inervações do hipotálamo em camundongos adultos deficientes da sinalização de leptina e após a reativação com tamoxifeno e posterior estabilização do peso e o consumo alimentar. Após serem lavados em KPBS, os cortes foram bloqueados com soro normal de burro 3% preparado em KPBS + T por 1 h, seguido de incubação por 2 dias com anticorpo anti-AgRP (1:2000; Phoenix Pharmaceuticals), β -endorfina (1:2000; Phoenix Pharmaceuticals), α -MSH (1:2000; Chemicon, #AB5087) ou GnRH (1:2000; Immunostar). Após lavagens em KPBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário conjugado com Alexa-Fluor 488 (1:500; The Jackson Laboratories) por 90 minutos. Depois de lavagens em KPBS, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e cobertos com meio de montagem fluorescente (Fluoromount-G, EMS). Os núcleos hipotalâmicos PVH, DMH e VMH que recebem projeções de neurônios do ARH, assim como as regiões retroquiasmática (RCH) e da eminência mediana foram fotografados e a análise da densidade da inervação foi realizada por meio do cálculo da densidade óptica integrada, com o uso do programa ImageJ (imagej.nih.gov/ij/).

4.12 Comportamento de estresse, ansiedade e memória

Para avaliar a capacidade cognitiva e outros parâmetros cognitivos dos camundongos sem presença de leptina e após a reativação com tamoxifeno foram realizados testes comportamentais de reconhecimento de objetos, campo aberto,

labirinto de Barnes, e esquiva inibitória para determinação da ansiedade e memória de curto e longo prazo dos animais. Os testes foram realizados na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), após um período de aclimação, pela equipe da Profa. Dra. Fernanda de Felice.

4.12.1 Reconhecimento de objetos

Foi realizado em uma arena de campo aberto (0,3m X 0,3m e 0,45m de altura). Durante as sessões comportamentais os objetos foram fixados ao piso da arena para evitar que os animais os deslocassem. Nenhum dos objetos utilizados evocou memórias inatas. O treinamento consistiu de uma sessão de 5 minutos na qual os animais foram colocados no centro da arena diante de dois objetos idênticos. Foi registrado o tempo explorando cada objeto. Os comportamentos considerados como exploratórios foram cheirar e tocar o objeto. Tanto a arena como os objetos foram limpos com álcool (40% vol/vol) entre cada animal para evitar pistas olfatórias. Uma hora após o treino, os animais foram colocados novamente na arena para a sessão teste, onde um dos objetos utilizados durante o treino foi substituído por um objeto novo. Novamente, foi registrado o tempo explorando o objeto novo e o familiar. Os resultados foram expressos como porcentagem de tempo explorando cada um dos objetos durante a sessão de treino e a teste e analisados utilizando teste t de Student comparando a média de exploração para cada objeto partindo de 50%. Por definição, animais que reconhecem um objeto como familiar (aprendizado normal) exploram o objeto novo por tempo significativamente superior a 50% do tempo total.

4.12.2 Campo aberto

Os animais foram colocados na mesma arena que a utilizada no teste de reconhecimento de objetos, onde a atividade locomotora foi registrada utilizando o *software* ANY-maze, que registra a distância explorada e a posição do animal durante o teste.

4.12.3 Labirinto de Barnes

O labirinto consiste em uma plataforma circular branca (92 cm de diâmetro) com 20 buracos equidistantes (5 cm de diâmetro, 7,5 cm de distância entre eles)

localizados ao longo do perímetro. A arena se encontra a 105 cm do chão para evitar que os camundongos pulem espontaneamente da mesma. Debaixo de um dos buracos existe uma câmara escura, e a sua localização se manteve constante ao longo das provas.

A arena foi monitorada constantemente utilizando o *software* ANY-maze, que registra a posição do animal e a distância que ele percorre. Os animais foram habituados à arena um dia antes da primeira prova. A habituação consistiu em colocar o animal em uma câmara cilíndrica no centro do labirinto. Após 10 segundos a câmara foi retirada e o animal guiado até o esconderijo, onde permaneceu 2 minutos. A sessão de treino consistiu em 4 eventos por dia durante 4 dias.

Em cada evento os animais foram colocados na câmara cilíndrica no centro do labirinto por 10 segundos, seguidos de 3 minutos para explorar livremente o labirinto. O evento termina quando o animal entra no esconderijo ou após 3 minutos de exploração. Caso o animal não entrasse no esconderijo, este era guiado gentilmente até ele, onde permanecia por 1 minuto. Os animais foram devolvidos a suas gaiolas para descansar até o próximo evento, com um tempo de 15 minutos entre cada um.

O tempo (latência primária) e as tentativas (erros primários) até chegar ao esconderijo foram registrados. Os testes para determinar memória de curto e longo prazo foram feitos nos dias 5 e 12, respectivamente, após o treino. Em cada teste o esconderijo foi coberto e os animais foram colocados dentro do cilindro no centro do labirinto. Dez segundos depois, a câmara foi retirada e os animais exploraram livremente o labirinto durante 90 segundos, e foram registrados a latência e os erros.

4.12.4 Esquiva inibitória

No primeiro dia (treino) os animais foram colocados em uma arena contendo uma plataforma e foi registrado o tempo que demoraram em descer da mesma (latência). Uma vez que desceram da plataforma, receberam um choque elétrico nas patas (2 segundos, 0,25 mA). No dia seguinte foi avaliado no mesmo contexto e foi registrado o tempo de latência para descer da plataforma, testando a capacidade de memória aversiva.

4.13 Análise dos resultados

Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão médio com dispersão. Primeiro foi feito o teste de normalidade (teste de Bartlett); caso as amostras tivessem distribuição normal, a análise estatística dos dados foi realizada pelo One-way ANOVA, seguido do teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls, ou Two-way ANOVA seguido de Newman-Keuls como pos hoc; nos casos em que as amostras não seguiram distribuição normal foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparações múltiplas, ou Mann-Whitney com correção de Bonferroni. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$, exceto nos casos em que aplicamos a correção de Bonferroni, nos quais o nível de significância foi de $p < 0,01$. Para realização dos testes estatísticos utilizamos o *software* GraphPad Prism v.6.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos da leptina no controle do balanço energético no período pós-natal

Demostramos ampla presença de células que expressam o *Lepr* em diversos núcleos hipotalâmicos durante a infância (P10), utilizando camundongos que expressam a proteína tdTomato condicionada as regiões promotoras do gene *Lepr* (Figura 9A,D). Essas células também são responsivas à leptina, observado através da fosforilação do STAT3 no ARH (Figura 9B) e PMv (Figura 9E), bem como outros núcleos não mostrados. Essa marcação é específica das células que expressam o *Lepr*, pois o pSTAT3 co-localiza com a proteína tdTomato (Figura 9C,F).

Registros eletrofisiológicos de células do PMv e do ARH de camundongos infantes machos (8 a 16 dias de vida) mostraram que a maioria das células (Figura 9H) responde à leptina alterando seu potencial de membrana assim como a frequência de potenciais de ação (mais especificamente sofreram hiperpolarização, Figura 9G). Nesses animais, 75% das células registradas no PMv respondem à leptina. Esse percentual é igual ao descrito em camundongos adultos (LESHAN et al, 2009). Já no ARH aproximadamente 30% de das células estudadas (P8 a P16) responderam a leptina, sendo este valor próximo ao observado no ARH de animais adultos (~35%) (WILLIAMS et al., 2010).

Esses resultados demonstram que as células que expressam o *Lepr* em camundongos durante a infância são capazes de responder à leptina (Figura 9H) e que a proporção de resposta nessas células é similar à observada em camundongos adultos (LESHAN et al, 2009; WILLIAMS et al., 2010).

Uma das funções da leptina mais conhecida e estudada em indivíduos adultos é a regulação do peso corporal e do consumo alimentar. Porém, na infância a leptina pode ter outras funções, tais como uma ação neurotrófica (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004b). Para estudar se a leptina é capaz de regular o peso corporal já na infância, acompanhamos camundongos deficientes do receptor de leptina (*db/db*), assim como seus irmãos portadores de uma cópia do gene *Lepr* (*db/+*) e os selvagens (*wt*) nascidos nas mesmas ninhadas.

Curiosamente, observamos tendência tanto dos animais *db/+*, quanto dos *db/db* de serem mais pesados ($5,77\text{g} \pm 0,25$ e $5,96\text{g} \pm 0,29$ respectivamente nas

fêmeas; $5,72\text{g} \pm 0,15$ e $5,37 \text{g} \pm 0,31$ respectivamente nos machos), comparados aos wt ($5,23\text{g} \pm 0,35$ nas fêmeas e $4,88\text{g} \pm 0,22$ nos machos), desde a segunda semana de vida. (Figura 9I, J). O mais importante é que os camundongos *db/db*, que se tornarão massivamente obesos quando adultos, começam a apresentar divergência de peso comparados aos animais heterozigotos apenas a partir do 39º dia de vida nos machos ($18,0\text{g} \pm 1,3$ e $16,05\text{g} \pm 0,34$ respectivamente, $P = 0,0001$) e no dia 33 nas fêmeas ($13,12\text{g} \pm 0,74$ e $11,49\text{g} \pm 0,38$, $P = 0,0052$).

Esses dados confirmam que antes da 4ª ou 5ª semana de vida a ausência do *Lepr* tem impacto mínimo na regulação do peso corporal. Por outro lado, quando adultos (10 semanas de vida), a diferença de peso entre os grupos é imensa ($35,47\text{g} \pm 0,86$ no *db/db* e $22,48\text{g} \pm 0,33$ no *db/+* em machos, $P < 0,0001$; $35,50\text{g} \pm 1,02$ e $18,86\text{g} \pm 0,33$ respectivamente nas fêmeas, $P < 0,0001$).

Outra forma de demonstrar que a leptina não regula o peso na infância é através do tratamento com leptina exógena. Conforme esperado, o grupo de camundongos adultos tratados com leptina apresentou redução do peso corporal comparado aos animais tratados com PBS, demonstrando os efeitos anorexígenos da administração da leptina (Figura 9K). Por outro lado, o tratamento com leptina não teve efeito algum sobre o peso corporal durante a infância dos camundongos, tanto em machos (Figura 9L) quanto em fêmeas (Figura 9M). Todavia, observamos que as fêmeas tratadas com leptina apresentaram antecipação da abertura vaginal (Figura 9M, quadro superior). Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores (AHIMA et al., 1997; CHEHAB et al., 1997). Portanto, esses resultados preliminares fortalecem a hipótese proposta no presente trabalho, pois demonstram que existem neurônios hipotalâmicos durante a infância que expressam o *Lepr* e são tão responsivos à leptina quanto nos adultos, porém a leptina não regula o peso corporal nessa idade.

Figura 9. A leptina não regula o peso corporal durante a infância apesar de estar completamente desenvolvida. A-F) Marcação por imunohistoquímica da proteína repórter tdTomato (A,D), de pSTAT3 (B,E), e a co-localização de ambas (C,F) tanto no núcleo arqueado, ARH (A-C) quanto no núcleo pré-mamilar ventral, PMV (D-F). No P10 os animais receberam uma injeção s.c. de leptina 1h previa a perfusão. A marcação da proteína tdTomato indica a expressão do *Lepr* e a de pSTAT3 demonstra a ativação de células pela leptina nos núcleos específicos. Observa-se um alto grau de co-localização tanto no ARH quanto no PMV. G) Registro eletrofisiológico de uma célula do PMV de um animal macho P8 após o estímulo com leptina. A célula responde hiperpolarizando, e essa resposta é revertida quando o estímulo é retirado. H) Percentual de células no PMV (esquerda) e ARH (direita) que respondem à leptina comparadas com as células que não respondem. I, J) Acompanhamento do peso corporal de animais deficientes no receptor de leptina (*db/db*) e seus irmãos heterozigotas (*db/+*) e controles (*wt*), tanto machos (I), quanto fêmeas (J). K-M) Efeitos do tratamento com leptina exógena (1 μ g/ μ l) (vermelho) ou PBS (preto) diariamente durante 12 dias no ganho de peso. A leptina exógena diminui significativamente o ganho de peso em animais *wt* adultos machos (K), porém não tem efeito no ganho de peso de camundongos jovens (P10), sejam machos (L) ou fêmeas (M). Contudo, o tratamento com leptina consegue adiantar a idade na qual ocorre a abertura vaginal (M, quadro superior). (I-M análise por Two-way ANOVA, seguido de post test Newman-Keuls, exceto abertura vaginal, onde foi utilizado t-Student. Para todos os casos * $P < 0,05$).

5.2 Caracterização e validação do modelo de reativação temporal do receptor de leptina

Com o intuito de fazer uma caracterização metabólica do nosso modelo animal, avaliamos o peso corporal e o consumo alimentar de animais com nove semanas de vida, prévio ao tratamento com tamoxifeno. Avaliamos machos e fêmeas dos grupos Ubi-LepRNull (grupo que terá o receptor de leptina reativado), LepRNull (controle obeso), e Ubi (controle magro; Figura 10). Antes do tratamento com tamoxifeno, os animais sem *Lepr* eram morbidamente obesos (Figura 10A para machos e C para fêmeas) e hiperfágicos (Figura 10B para machos e D para fêmeas). Durante a reativação, unicamente os animais Ubi-LepRNull perderam peso e reduziram o consumo alimentar, sendo que a grande perda de peso ocorreu durante o período de acompanhamento e atingiu valores estáveis 5-6 semanas após a reativação.

Para confirmar se a reativação temporal do receptor de leptina foi eficaz, ou seja, que consegue afetar os principais grupamentos de neurônios que expressam o *Lepr*, camundongos adultos previamente reativados e cujo peso corporal e ingesta alimentar estavam estabilizados, receberam injeção de leptina e realizamos reação imunohistoquímica para identificar a imunoreatividade ao pSTAT3 (Figura 10E-J). Os animais controle apresentaram marcação de pSTAT3 induzida pela leptina em núcleos característicos como o ARH, DMH, VMH e PMv (Figura 10K, barras brancas). Nos animais LepRNull a expressão de pSTAT3 no hipotálamo foi virtualmente nula em relação ao grupo controle (Figura 10K, barras vermelhas). Nos animais Ubi-LepRNull comprovamos que a expressão de pSTAT3 nesses núcleos foi restaurada comparada à marcação do grupo controle. Dessa forma demonstramos que a reativação com tamoxifeno é eficiente na restauração da sinalização do receptor de leptina nos principais núcleos hipotalâmicos (Figura 10K, barras azuis).

Figura 10. Validação do modelo de reativação temporal do *Lepr* em camundongos adultos. A-D) Efeito do tratamento com tamoxifeno em camundongos adultos antes, durante o tratamento (área cinza) e durante o acompanhamento posterior até a estabilização dos parâmetros estudados (área vermelha). A) Variação do peso corporal e B) do consumo alimentar em camundongos machos. C) Variação do peso corporal e D) do consumo alimentar em fêmeas. Two-way ANOVA, seguido de Newman-Kewls. *** $P < 0,001$ Ubi-LepRNull vs Ubi; #### $P < 0,001$ Ubi-LepRNull vs LepRNull. E-J) Micrografias representativas mostrando a expressão de pSTAT3 após injeção de leptina (5µg/g de peso corporal i.p.) em núcleos hipotalâmicos que expressam o *Lepr* em animais controle (E,H), obesos (F,I) e reativados (G,J) após a estabilização do peso e consumo alimentar mostrados em (A-D, área vermelha). Abreviações: ARH, núcleo arqueado; DMH, núcleo dorsomedial; PMv, núcleo pré-mamilar ventral; VMH, núcleo ventromedial; 3v, terceiro ventrículo. K) Quantificação do número de células responsivas à leptina através da reatividade à pSTAT3 nos três grupos mostrados em (E-J). Kruskal-Wallis para cada núcleo seguido de Dunn. ARH (***) $P = 0.0002$, DMH (***) $P < 0.0001$, PMv (***) $P = 0.0002$ and VMH (***) $P = 0.0003$. L) Resposta anorexigênica avaliada através da redução do consumo alimentar (esquerda) e do peso corporal (direita) 24h após injeção de leptina (2,5µg/g de peso corporal i.p.) em relação ao veiculo em animais adultos. One-way

ANOVA para cada parâmetro, seguida de Newman-Keuls. * $P = 0.0071$ para o consumo alimentar e * $P = 0.0184$ para o peso corporal.

Uma vez comprovado que o tratamento com TM leva a reativação do Lepr nas principais áreas do hipotálamo, avaliamos a resposta fisiológica à leptina em animais adultos. Os animais Ubi e Ubi-LepRNull reduziram o consumo alimentar e o peso corporal de forma semelhante 24h após receberem injeção de leptina. Já o grupo LepRNull, não respondeu ao hormônio, conforme esperado para animais deficientes do Lepr (Figura 10L).

Diante desse conjunto de resultados, demonstramos ser capazes de produzir um modelo de camundongos que não apresenta sinalização de leptina até a 10ª semana de vida (vide os fenótipos de obesidade e hiperfagia), mas cujo tratamento com tamoxifeno é eficaz em restaurar a sinalização de leptina na idade adulta. Portanto, esse modelo parece plenamente apropriado para estudar os efeitos permanentes da ausência da sinalização do Lepr durante o desenvolvimento.

5.3 Avaliação metabólica dos animais que não apresentaram expressão do Lepr durante o desenvolvimento neural

Os dados anteriormente apresentados indicam que na sexta semana de acompanhamento após o tratamento com tamoxifeno o peso corporal e o consumo alimentar atingiram valores estáveis. Portanto, começamos a avaliação do metabolismo basal apenas a partir deste momento.

A reativação do Lepr levou à reversão do fenótipo de obesidade, porém o grupo reativado manteve-se em média 12% mais pesado que o grupo controle ($P = 0.0053$) (Figura 11A). O maior peso foi acompanhado de maior adiposidade nos territórios subcutâneo e perigonadal (Figura 11B), assim como maior concentração de leptina no sangue ($P = 0,0026$) (Figura 11C). A alteração no peso, adiposidade e leptina não foram decorrentes de maior consumo alimentar, o qual foi completamente restaurado após o tratamento com tamoxifeno (Figura 11D).

Figura 11. Caracterização do metabolismo basal de machos adultos após o período de estabilização seguindo a reativação do Lepr. A) Peso corporal avaliado durante uma semana. Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$, * $P = 0,0053$. B) adiposidade calculada através do peso de diversos territórios. Abreviações: S.C., subcutâneo; P.G., perigonadal; R.P., retroperitoneal. Kruskal-Wallis seguido de Dunn. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$. C) concentração sérica de leptina. Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$, * $P = 0,0026$. D) consumo alimentar. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$.

O fato do grupo Ubi-LepRNull ter maior peso corporal, mas consumo alimentar igual sugere uma possível mudança no gasto energético. Assim, avaliamos o gasto energético por calorimetria indireta (Figura 12). Como esperado, a falta de sinalização de leptina está associada ao menor gasto energético basal, indicado pelo menor consumo de oxigênio (Figura 12). A reativação do Lepr recuperou parcialmente o gasto energético em relação ao grupo obeso, porém este parâmetro não foi completamente restaurado, sendo que permaneceu aproximadamente 10% menor que no grupo controle (Figura 12A e B).

O coeficiente respiratório (RER) é um indicador do substrato energético preferencial que está sendo utilizado pelo organismo e é obtido a partir do volume de CO_2 produzido em relação ao volume de O_2 consumido (Figura 12C e D). Valores próximos de 0,7 indicam predominância de oxidação de lipídios, enquanto que valores próximos a 1,0 indicam metabolização preferencial de carboidratos. Os animais controle (círculos brancos) têm uma variação circadiana, como esperada. Nesse sentido, durante a fase escura, na qual os animais estão ativos e se alimentando, ocorre predominantemente metabolização de carboidratos; já durante a fase clara, em que os animais se encontram em repouso e comem menos, o RER se aproxima de 0,8 indicando predominância de oxidação de lipídios (Figura 12D). Nos animais LepRNull, essa variação circadiana é perdida e os animais utilizam predominantemente carboidratos tanto na fase escura quanto na fase clara (Figura 12C e D, quadrados vermelhos). Os animais Ubi-LepRNull recuperaram o

comportamento circadiano do coeficiente respiratório (Figura 12D, triângulos azuis), com preferência para a metabolização de carboidratos na fase escura e oxidação de lipídios na fase clara, à semelhança do grupo controle magro.

Com relação ao consumo alimentar, observamos que a restauração em decorrência da reativação do Lepr se estende ao padrão circadiano de alimentação (Figura 12E). Quando avaliamos o consumo de água, observamos que o grupo LepRNull ingeriu mais do dobro de água que os animais controle (Figura 12F), enquanto que o grupo Ubi-LepRNull teve o consumo hídrico completamente normalizado (Figura 12F, barras azuis).

Finalmente, outro parâmetro importante para avaliar a condição metabólica é a atividade ambulatoria voluntária (Figura 12G e H). O grupo LepRNull apresentou atividade ambulatoria significativamente reduzida em comparação ao grupo Ubi. A reativação do Lepr levou ao aumento da atividade ambulatoria, em comparação ao grupo obeso, porém, à semelhança do gasto energético, este parâmetro permaneceu significativamente menor em relação ao grupo controle magro (Figura 12G e H, triângulos e barras azuis).

Figura 12. A reativação do Lepr em camundongos machos adultos não restaura o metabolismo basal. (A,B) Medição do gasto energético através de calorimetria indireta (volume de O₂ consumido, VO₂) durante 5 dias. A) Média do VO₂ consumido nas fases escura, clara e durante as 24h. B) Padrão circadiano de consumo de VO₂ ao longo dos 5 dias. C,D) Coeficiente respiratório (RER) calculado através dos volumes de CO₂ produzido e VO₂ consumido. C) Média do RER nas fases escura, clara e durante as 24h. D) Padrão circadiano do RER ao longo dos 5 dias. E,F) Média do consumo alimentar (E) e consumo hídrico (F) durante 5 dias de acompanhamento nas fases escura, clara e 24h. G,H) Atividade ambulatoria voluntária durante 5 dias. G) Média da atividade nas fases escura, clara e 24h durante os 5 dias de acompanhamento. H) Padrão circadiano de atividade ambulatoria ao longo dos 5 dias. One-way ANOVA para cada parâmetro e cada fase do dia seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

As fêmeas adultas que passaram pelo tratamento com tamoxifeno apresentaram resposta similar aos machos adultos, revertendo o quadro de obesidade, porém com peso 15% maior que o grupo controle ($P = 0,001$) (Figura 13A). Esse maior peso foi acompanhado de maior adiposidade no território perigonadal (Figura 13B), porém a concentração de leptina sérica foi normalizada completamente após a reativação (Figura 13C). Similarmente ao observado nos machos adultos, a diferença de peso e adiposidade não é resultado de maior consumo alimentar, o qual foi normalizado pelo tratamento com tamoxifeno (Figura 13D).

Figura 13. Caracterização do metabolismo basal de fêmeas adultas após o período de estabilização seguindo a reativação do Lepr. A) Peso corporal avaliado durante uma semana. Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$, * $P = 0.001$. B) adiposidade calculada através do peso de diversos territórios. Abreviações: S.C., subcutâneo; Ov, periovariano; P.G., perigonadal; R.P., retroperitoneal. Kruskal-Wallis seguido de Dunn. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$. C) concentração sérica de leptina. Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$. D) consumo alimentar. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$.

Ao avaliar o metabolismo basal de fêmeas adultas observamos menor gasto energético no grupo LepRNull, como esperado (Figura 14A e B, quadrados e barras vermelhas), enquanto que o tratamento com tamoxifeno levou ao aumento do gasto energético no grupo Ubi-LepRNull. Nesse caso não observamos diferença significativa em relação ao grupo controle, mas sim uma tendência de menor gasto energético nas fêmeas reativadas, consumindo 11% menos oxigênio em média (Figura 14A e B). O RER no grupo LepRNull perdeu a ritmicidade e se manteve constantemente em valores próximos de 1, indicando oxidação preferencialmente de carboidratos; a reativação do Lepr reverteu completamente essa alteração, recuperando a ritmicidade e o padrão fisiológico de metabolização de nutrientes (Figura 14C e D). Finalmente, a atividade locomotora de fêmeas obesas foi

significativamente baixa, como esperado (Figura 14E e F, quadrados e barras vermelhas). Nesse caso, a reativação do *Lepr* recuperou parcialmente o padrão de atividade, permanecendo significativamente menor que o do grupo controle (Figura 14E e F, triângulos e barras azuis). Não observamos diferenças entre o padrão de consumo alimentar e hídrico entre machos e fêmeas adultos (dados não mostrados).

Figura 14. A reativação do *Lepr* em camundongos fêmeas adultas não restaura o metabolismo basal. (A,B) Medição do gasto energético através de calorimetria indireta (volume de O_2 consumido, VO_2) durante 5 dias. A) Média do VO_2 consumido nas fases escura, clara e durante as 24h. B) Padrão circadiano de consumo de VO_2 ao longo dos 5 dias. C,D) Coeficiente respiratório (RER) calculado através dos volumes de CO_2 produzido e VO_2 consumido. C) Média do RER nas fases escura, clara e durante as 24h. D) Padrão circadiano do RER ao longo dos 5 dias. E,F) Atividade ambulatoria voluntária durante 5 dias. E) Média da atividade nas fases escura, clara e 24h durante os 5 dias de acompanhamento. F) Padrão circadiano de atividade ambulatoria ao longo dos 5 dias. One-way ANOVA para cada parâmetro e cada fase do dia seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$.

Para entender melhor os mecanismos por trás do menor gasto energético em animais reativados analisamos hormônios que estão relacionados ao controle do metabolismo. Inicialmente, avaliamos a concentração de noradrenalina na urina de machos adultos. Apesar de não obtermos diferenças estatísticas entre os grupos, observamos tendência de menor noradrenalina nos animais LepRNull, assim como nos animais Ubi-LepRNull (Figura 15A), em comparação com animais Ubi, podendo ser a baixa amostragem a causa da falta de poder estatístico.

É sabido que o eixo hipotálamo-hipófise-glândula tireoide está fortemente envolvido na regulação do balanço energético (OH; KAPLAN, 1994). Observamos menor concentração sérica do hormônio T4 nos animais LepRNull (Figura 15B, barras vermelhas), sendo que o tratamento com tamoxifeno foi capaz de recuperar completamente os níveis circulantes de T4 em relação ao grupo controle (Figura 15B, barras azuis).

Como é amplamente descrito na literatura (CHEN et al., 2000; ELIAS et al., 1999; ERICKSON; HOLLOPETER; PALMITER, 1996; HAHN et al., 1998) o sistema melanocortina no hipotálamo é o principal regulador central da alimentação e saciedade e é diretamente regulado pela concentração sérica de leptina. Como esperado pelo seu fenótipo, os animais LepRNull apresentaram maior expressão hipotalâmica de genes orexigênicos (*Agrp* e *Npy*), enquanto que a expressão de genes anorexigênicos (*Pomc* e *Cart*) foi significativamente menor (Figura 15C, barras vermelhas) em relação ao grupo controle. A reativação do Lepr em machos adultos resultou na restauração da expressão de *Agrp* e *Npy*, porém a expressão de ambos genes que codificam peptídeos anorexigênicos permaneceu diminuída (Figura 15C, barras azuis).

Para descartar que essa menor expressão gênica de *Pomc* e *Cart* se devesse à redução no número de neurônios POMC, avaliamos por imunohistoquímica o número de neurônios que expressam o peptídeo produto da clivagem do POMC, o α -MSH (Figura 15D-G). Não observamos diferenças entre os grupos controle e reativado no número médio de células POMC no ARH (Figura 15G). Não conseguimos quantificar as células POMC nos animais LepRNull (Figura 15E) por limitações técnicas, já que o anticorpo não produz uma boa marcação quando a expressão do POMC está reduzida.

Figura 15. Mecanismos centrais e periféricos envolvidos na restauração parcial do balanço energético em camundongos machos adultos. A) Concentração de noradrenalina na urina, coletada ao longo de 24h. B) Concentração sérica de T4. C) Expressão hipotalâmica de genes que codificam para neurotransmissores que regulam o balanço energético. D-F) Micrografias representativas para a expressão de neurônios POMC (através da reatividade a α -MSH) em animais controle (D), obesos (E) e reativados (F). G) Quantificação do número de neurônios reativos ao α -MSH. Abreviações: N.D., valores não detectados. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls para cada parâmetro. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

5.4 Desafios metabólicos: 24h de jejum e exposição aguda a HFD

Uma vez que descrevemos que a reativação do *Lepr* recupera parcialmente a regulação do balanço energético em estado basal, estudamos a resposta dos animais a dois desafios opostos: um caso de balanço energético negativo causado por um período de 24h de jejum e outro caso de balanço energético positivo decorrente da exposição aguda a uma dieta hipercalórica (Figura 16).

Frente ao jejum, observamos que os animais obesos perderam significativamente menos peso; já os animais reativados perderam mais peso que os obesos, porém não tanto quanto o grupo controle (Figura 16A). Quando avaliamos o gasto energético e o RER, observamos atenuação na redução do gasto energético durante o jejum nos grupos *LepRNull* e *Ubi-LepRNull* (Figura 16B) e menor RER em ambos grupos em relação aos controles, indicando maior preferência na utilização de lipídios como fonte de energia durante o jejum (Figura 16C). Não observamos diferenças na glicemia entre os grupos durante o jejum (Figura 16D).

A falta de alimento provocou aumento da atividade locomotora nos três grupos, sendo mais evidente nos animais reativados em relação ao seu estado basal (Figura 16E, barras azuis). Cabe destacar neste último ponto a resposta na atividade

ambulatória dos animais obesos durante o jejum. Sendo descritos classicamente na literatura como animais com reduzida atividade locomotora, observamos que em média aumentaram 300% a atividade ambulatoria em busca de alimento (Figura 16E, barras vermelhas).

Após o período de realimentação, os animais LepRNull permaneceram com menor peso que antes do teste; os animais reativados recuperaram o peso de forma similar ao grupo controle (Figura 16F). O gasto energético permaneceu menor em todos os grupos em relação ao período basal e não observamos diferenças significativas entre os grupos (Figura 16G).

Com a realimentação o RER aumentou em animais controle e reativados, indicando predomínio na metabolização de carboidratos, porém o grupo LepRNull manteve a metabolização de lipídios (Figura 16H). A glicemia retornou ao basal correspondente de cada grupo (Figura 16I), e não observamos diferenças no consumo alimentar entre os grupos (dados não mostrados), enquanto que a realimentação levou à redução da locomoção nos animais controle e reativados, enquanto que os animais obesos mantiveram a atividade aumentada (Figura 16J).

Figura 16. Jejum de 24h exacerba alterações no metabolismo de camundongos machos adultos após a reativação do Lepr. A-E) Resposta a um período de 24h de jejum. A) Redução do peso corporal em relação ao estado alimentado. B) Variação do gasto energético medido através do volume de O_2 consumido (VO_2) durante o jejum em relação ao estado alimentado. C) Variação do coeficiente respiratório (RER) durante o jejum em relação ao estado alimentado. D) Glicemia medida após 24h de jejum. E) Variação da atividade ambulatoria voluntária durante o jejum em relação ao estado alimentado. F-J) Resposta do metabolismo na recuperação do jejum após 48 de realimentação. F) Redução do peso corporal em relação ao estado alimentado basal. G) Variação do gasto energético durante a realimentação em relação ao estado alimentado basal. H) Variação do coeficiente respiratório (RER) durante a realimentação em relação ao estado alimentado basal. I) Glicemia medida após 48h de realimentação. J) Variação da atividade ambulatoria voluntária durante a realimentação em relação ao estado alimentado basal.

Glicemia medida após 48h de realimentação. J) Variação da atividade ambulatoria voluntaria durante a realimentação em relação ao estado alimentado basal. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls para cada parâmetro. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$.

Após a completa recuperação do desafio prévio, os animais foram estudados quanto à resposta à exposição aguda (48 horas) a uma dieta hipercalórica (Figura 17). Os animais reativados tiveram maior consumo calórico que o grupo controle, indicando maior susceptibilidade a uma dieta mais palatável, porém o consumo ainda é menor que o do grupo obeso (Figura 17A). Os animais obesos tiveram maior consumo calórico, porém ganharam menos peso que os controles; o ganho de peso com HFD no grupo Ubi-LepRNull foi semelhante ao grupo controle (Figura 17B).

Apesar de observar diferenças no consumo alimentar e no ganho de peso entre os grupos não observamos diferenças no gasto energético entre os grupos durante o desafio, provavelmente devido à grande dispersão dentro do grupo controle (Figura 17C). Os animais obesos reduziram o RER, enquanto que os grupos controle e reativado não modificaram esse parâmetro com a dieta (Figura 17D).

Finalmente, o HFD levou à redução da atividade locomotora dos animais controle. Contrariamente, os animais obesos aumentaram a atividade ambulatoria; já os animais reativados reduziram também a atividade, porém em menor medida que o grupo controle (Figura 17E).

Figura 17. Exposição aguda (48h) ao HFD exacerba alterações no metabolismo de camundongos machos adultos após a reativação do Lepr. A) Média do consumo de calorias durante a alimentação com HFD. B) Ganho de peso durante as 48h de HFD. C) variação do gasto energético medido através do volume de O₂ consumido (VO₂) durante o HFD. D) variação do coeficiente respiratório (RER) durante o HFD. E) variação da atividade ambulatoria voluntaria durante o HFD. Todos os parâmetros são expressos em relação ao estado alimentado com ração padrão. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls para cada parâmetro. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

No caso das fêmeas, o grupo obeso também apresentou menor perda de peso durante o jejum, porém, diferentemente do que observamos nos machos, as fêmeas reativadas tiveram perda de peso similar ao grupo controle (Figura 18A). Não observamos diferenças na glicemia entre os grupos durante o jejum (Figura 18B).

Após o período de realimentação, o grupo obeso ainda manteve menor peso em relação ao seu período basal, enquanto que as fêmeas reativadas recuperaram menos peso que o grupo controle, indicando menor capacidade de se recuperar do jejum (Figura 18C). A glicemia retornou aos valores basais, sendo que o grupo reativado teve menor glicemia que o grupo controle (Figura 18D). Também não observamos diferenças no consumo alimentar entre os grupos durante a realimentação (Figura 18E).

Figura 18. Resposta de fêmeas adultas a um período de jejum de 24h. A-B) Resposta a um período de 24h de jejum. A) Redução do peso corporal em relação ao estado alimentado. B) Glicemia medida após 24h de jejum. C-E) Resposta do metabolismo na recuperação do jejum após 48h de realimentação. C) Redução do peso corporal em relação ao estado alimentado. D) Glicemia medida após 48h de realimentação. E) Consumo alimentar acumulado durante as 48h de realimentação. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls para cada parâmetro. **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

5.5 Avaliação metabólica em animais que tiveram a restauração do Lepr antes do fenótipo de obesidade

Como observamos que a ausência do Lepr durante o desenvolvimento está associada a alterações no balanço energético, o passo seguinte foi restringir a janela temporal na qual ocorrem essas alterações. Para isso reativamos camundongos machos e fêmeas com 4 semanas de vida, antes da expressão do fenótipo de obesidade para isolar os efeitos devido ao emagrecimento.

Antes da reativação, constatamos que havia diferenças entre os pesos corporais de animais dos diferentes genótipos, sendo mais pesados os animais dos grupos LepRNull/+, LepRNull e Ubi-LepRNull, tanto machos quanto fêmeas (Figura 19A e B).

Figura 19. Peso corporal em camundongos jovens antes da expressão do fenótipo de obesidade. Peso corporal de machos (A) e fêmeas (B) com 4 semanas de vida e diferentes genótipos, prévio ao tratamento com tamoxifeno. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ para cada parâmetro.

Após o período de tratamento com tamoxifeno e posterior acompanhamento, os animais entraram na idade na qual a leptina regula o balanço energético e o grupo LepRNull apresentou maior peso corporal em decorrência da ausência de leptina, enquanto que o grupo Ubi-LepRNull estabilizou em peso similar ao grupo Ubi (Figura 20A).

Mesmo tendo peso similar ao grupo controle os animais reativados apresentaram maior adiposidade unicamente no território perigonadal (Figura 20B), e interessante a leptinemia continuou significativamente maior em relação ao grupo controle ($P = 0,0409$) (Figura 20C). Da mesma forma que os animais adultos, o consumo alimentar foi similar entre os controles e os reativados. (Figura 20D).

Figura 20. Caracterização do metabolismo basal de machos jovens após o período de estabilização seguindo a reativação do Lepr. A) Peso corporal avaliado durante uma semana. Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$. B) adiposidade calculada através do peso de diversos territórios. Abreviações: S.C., subcutâneo; P.G., perigonadal; R.P., retroperitoneal. Kruskal-Wallis seguido de Dunn. **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$. C) concentração sérica de leptina. Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$, * $P = 0,0409$. D) consumo alimentar. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$.

Interessantemente, observamos que os animais reativados antes do início do fenótipo de obesidade tiveram menor gasto energético em relação ao grupo controle, apesar de terem peso corporal e consumo alimentar similares (Figura 21A e B). Um detalhe interessante observado é que os animais LepRNull que já tem o quadro de obesidade instalado nesta idade apresentaram uma perturbação parcial do RER, o que indica que essa idade é o momento em que a falta de leptina está relacionada com a alteração do padrão circadiano de metabolização de nutrientes (Figura 21C e D). Com relação à atividade ambulatoria, observamos o quadro de hipoatividade esperado para os animais obesos, enquanto que a reativação do Lepr normalizou o padrão de atividade (Figura 21E e F).

Figura 21. A reativação do Lepr em camundongos machos jovens não restaura o metabolismo basal. (A,B) Medição do gasto energético através de calorimetria indireta (volume de O_2 consumido, VO_2) durante 5 dias. A) Média do VO_2 consumido nas fases escura, clara e durante as 24h. B) Padrão circadiano de consumo de VO_2 ao longo dos 5 dias. C,D) Coeficiente respiratório (RER) calculado através dos volumes de CO_2 produzido e VO_2 consumido. C) Média do RER nas fases escura, clara e durante as 24h. D) Padrão circadiano do RER ao longo dos 5 dias. E,F) Atividade ambulatoria voluntária durante 5 dias. E) Média da atividade nas fases escura, clara e 24h durante os 5 dias de acompanhamento. F) Padrão circadiano de atividade ambulatoria ao longo dos 5 dias. One-way ANOVA para cada parâmetro e cada fase do dia seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

No caso das fêmeas tratadas com tamoxifeno em idade jovem, observamos que os animais reativados estabilizaram em um peso corporal maior que o grupo controle ($P = 0,0185$), mesmo nunca tendo passado pelo quadro de obesidade (Figura 22A). O maior peso no grupo Ubi-LepRNull está associado a maior adiposidade unicamente no território perigonadal (Figura 22B). Igualmente às

fêmeas adultas, o consumo alimentar foi similar entre o grupo reativado e o grupo controle (Figura 22C). Não medimos a leptinemia nesses animais.

Figura 22. Caracterização do metabolismo basal de fêmeas jovens após o período de estabilização seguindo a reativação do Lepr. A) Peso corporal avaliado durante uma semana. Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$, * $P = 0,0185$. B) Adiposidade calculada através do peso de diversos territórios. Abreviações: S.C., subcutâneo; Ov., periovariano; P.G., perigonadal; R.P., retroperitoneal. Kruskal-Wallis seguido de Dunn. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$. C) Consumo alimentar. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$.

Com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento com tamoxifeno antes do desmame sobre o controle central do balanço energético em machos, avaliamos a expressão de genes anorexigênicos e orexigênicos no hipotálamo (Figura 23). À semelhança da resposta em animais adultos, a expressão de genes que codificam peptídeos anorexigênicos (*Agrp* e *Npy*) está normalizada no grupo Ubi-LepRNull. Diferentemente do que observamos no hipotálamo de machos adultos, a reativação do Lepr em animais jovens normalizou também a expressão de genes orexigênicos (*Pomc* e *Cart*).

Figura 23. Genes envolvidos na regulação do balanço energético são normalizados pela reativação do Lepr em machos jovens. Expressão hipotalâmica de genes que codificam para neurotransmissores que regulam o balanço energético. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls para cada gene. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

Quando desafiávamos os machos jovens a um período de jejum de 24h observamos que o grupo obeso, diferentemente do grupo adulto apresentou maior perda de peso que os grupos controle e reativado (Figura 24A), e os animais reativados tiveram menor glicemia (Figura 24B). Após a realimentação, o grupo obeso manteve a perda de peso, enquanto que os grupos controle e reativado recuperaram o peso perdido durante o jejum (Figura 24C), e a glicemia foi reestabelecida aos seus valores basais nos três grupos (Figura 24D). Novamente não houve diferença no consumo alimentar entre os grupos (Figura 24E).

Figura 24. Resposta a um período de jejum de 24h é melhorada pela reativação de Lepr em machos jovens. A-B) Resposta a um período de 24h de jejum. A) Redução do peso corporal em relação ao estado alimentado. B) Glicemia medida após 24h de jejum. C-E) Resposta do metabolismo na recuperação do jejum após 48h de realimentação. C) Redução do peso corporal em relação ao estado alimentado. D) Glicemia medida após 48h de realimentação. E) Consumo alimentar acumulado durante as 48h de realimentação. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls para cada parâmetro. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

5.6 Avaliação da homeostase glicêmica em animais que não apresentaram sinalização de leptina durante o desenvolvimento

Para determinar se a reativação do Lepr na vida adulta restaura a homeostase glicêmica testamos a tolerância à glicose (GTT), a sensibilidade à insulina (ITT) e a capacidade de gliconeogênese, por meio do teste de tolerância ao piruvato (PTT).

Nos machos, o grupo LepRNull apresentou maior tolerância à glicose (Figura 25A e B), junto com menor sensibilidade à insulina (Figura 25C e D,

quadrados e barra vermelhos), o que foi confirmado pela dosagem de insulina sérica (Figura 11E). Quando avaliamos a capacidade de realizar gliconeogênese por meio do teste de piruvato, não observamos diferenças entre os animais LepRNull e Ubi (Figura 25F e G). A reativação do Lepr em machos adultos recuperou a tolerância à glicose, sendo inclusive mais tolerantes que o grupo controle ($P = 0,0210$) (Figuras 25A e B, triângulos e barra azuis).

A sensibilidade à insulina foi melhorada nos animais reativados em relação ao grupo obeso, porém, a melhora foi apenas parcial (Figura 25C e D, triângulos e barra azuis). Para avaliar melhor essa resposta realizamos a dosagem sérica de insulina (Figura 25E). Constatamos que o grupo LepRNull de fato apresenta maior insulina sérica que o Ubi ($57,0 \pm 9,4\text{ng/ml}$ vs $0,93 \pm 0,07\text{ng/ml}$, $P < 0,0001$), corroborando o quadro de resistência a insulina e que no grupo Ubi-LepRNull a insulina sérica diminuiu significativamente em relação ao grupo obeso mas continuou maior que nos animais Ubi ($1,8 \pm 0,3\text{ng/ml}$ vs $0,93 \pm 0,07\text{ng/ml}$, $P = 0,0329$). Quando avaliada a capacidade de gliconeogênese, observamos que nos animais reativados está diminuída em comparação com o controle (Figuras 25F e G).

Figura 25. Homeostase glicêmica é parcialmente recuperada pela reativação do Lepr em machos adultos. A,B) Tolerância à glicose. A) Medição da glicemia antes e após uma injeção de glicose (2g/kg de peso corporal, i.p.). Two-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. ##### $P <$

0,0001 Ubi-LepRNull vs LepRNull, **** $P < 0,0001$ Ubi-LepRNull vs Ubi. B) Cálculo de área sob a curva apresentada em (A). Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$, & $P = 0,0432$. C,D) Sensibilidade à insulina C) Medição da glicemia antes e após uma injeção de insulina (1U.I./kg de peso corporal i.p.). Two-way ANOVA seguido de Newman-Keuls # $P < 0,05$ Ubi-LepRNull vs LepRNull, ** $P < 0,01$ Ubi-LepRNull vs Ubi. D) Cálculo de área sob a curva apresentada em (C). Kruskal-Wallis seguida de Dunn. **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$. E) Concentração sérica de insulina. Kruskal-Wallis seguida de Dunn. **** $P < 0,0001$, * $P = 0,0432$. F-G) Capacidade de gliconeogênese. F) Medição da glicemia antes e após uma injeção de piruvato (2g/kg de peso corporal i.p.). Two-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. ### $P < 0,001$, Ubi-LepRNull vs LepRNull, ** $P < 0,01$ Ubi-LepRNull vs Ubi. G) Cálculo de área sob a curva apresentada em (F). One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

As fêmeas LepRNull tiveram um quadro de intolerância a glicose, insensibilidade a insulina causado por resistência ao hormônio, sem alterar a capacidade gliconeogênica em relação ao grupo controle, similar ao descrito previamente para os machos obesos (Figura 26, quadrados e barras vermelhos). A reativação do Lepr restaurou completamente a tolerância à glicose (Figura 26A e B), sem apresentar diferenças na sensibilidade a insulina (Figura 26C e D), mesmo tendo maior insulinemia que o grupo controle ($1,36 \pm 0,12\text{ng/ml}$ vs $0,58 \pm 0,05\text{ng/ml}$, $P = 0,0432$), porém menor que nos animais LepRNull ($27,17 \pm 6,01\text{ng/ml}$ vs $1,36 \pm 0,12\text{ng/ml}$, $P = 0,0779$) (Figura 26E), e levou à diminuição da capacidade de gliconeogênese em relação aos grupos controle e LepRNull (Figura 26F e G).

Figura 26. Homeostase glicêmica é parcialmente recuperada pela reativação do Lepr em fêmeas adultas. A,B) Tolerância à glicose. A) Medição da glicemia antes e após uma injeção

de glicose (2g/kg de peso corporal, i.p.). Two-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. ##### $P < 0,0001$ Ubi-LepRNull vs LepRNull. B) Cálculo de área sob a curva apresentada em (A). Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$, * $P = 0,0210$. C,D) Sensibilidade à insulina C) Medição da glicemia antes e após uma injeção de insulina (1U.I./kg de peso corporal i.p.). Two-way ANOVA. D) Cálculo de área sob a curva apresentada em (C). Kruskal-Wallis seguido de Dunn. * $P < 0,05$. E) Concentração sérica de insulina. Mann-Whitney com correção de Bonferroni. **** $P < 0,0001$, * $P = 0,0329$. F-G) Capacidade de gliconeogênese. F) Medição da glicemia antes e após uma injeção de piruvato (2g/kg de peso corporal i.p.). Two-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. ## $P < 0,01$, # $P < 0,05$ Ubi-LepRNull vs LepRNull, *** $P < 0,001$ Ubi-LepRNull vs Ubi. G) Cálculo de área sob a curva apresentada em (F). One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

Com vista nessas alterações descritas em animais adultos, avaliamos a homeostase glicêmica em animais tratados com tamoxifeno antes do desmame (Figura 27). A reativação em animais jovens evitou que o grupo Ubi-LepRNull passasse pelas fases de obesidade e emagrecimento. Observamos que a tolerância à glicose (Figura 27A e B para os machos e Figura 27E e F para as fêmeas), a sensibilidade à insulina (Figura 27C e D para os machos e Figura 27G e H para as fêmeas) foram completamente restauradas no grupo Ubi-LepRNull.

Figura 27. Homeostase glicêmica é normalizada pela reativação do LepR em machos e fêmeas jovens. A-D) Homeostase glicêmica em machos. A,B) Tolerância à glicose. A) Medição da glicemia antes e após uma injeção de glicose (2g/kg de peso corporal, i.p.). Two-way ANOVA seguida de Newman-Keuls # $P < 0,05$ Ubi-LepRNull vs LepRNull. B) Cálculo de área sob a curva apresentada em (A). One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$. C,D) Sensibilidade à insulina C) Medição da glicemia antes e após uma injeção de insulina (1U.I./kg de peso corporal i.p.). Two-way ANOVA seguido de Newman-Keuls ##### $P < 0,0001$ Ubi-LepRNull vs LepRNull, * $P < 0,05$ Ubi-LepRNull vs Ubi. D) Cálculo de área sob a curva apresentada em (C). Kruskal-Wallis seguido de Dunn. **** $P < 0,0001$. E-H) Homeostase glicêmica em fêmeas. E,F) Tolerância à glicose. E) Medição

da glicemia antes e após uma injeção de glicose (2g/kg de peso corporal, i.p.). Two-way ANOVA seguida de Newman-Keuls ##### $P < 0,0001$ Ubi-LepRNull vs LepRNull. F) Cálculo de área sob a curva apresentada em (E). One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$. G,H) Sensibilidade à insulina G) Medição da glicemia antes e após uma injeção de insulina (1U.I./kg de peso corporal i.p.). Two-way ANOVA seguido de Newman-Keuls ##### $P < 0,0001$ Ubi-LepRNull vs LepRNull. H) Cálculo de área sob a curva apresentada em (G). Kruskal-Wallis seguida de Dunn. **** $P < 0,0001$.

5.7 Avaliação de parâmetros endócrinos em animais que não apresentaram expressão do Lepr durante o desenvolvimento

É bem estabelecido na literatura que a leptina é um hormônio fundamental para o funcionamento do eixo reprodutor, sendo que indivíduos deficientes da sinalização de leptina apresentam hipogonadismo hipogonadotrófico. Avaliamos a fertilidade dos machos Ubi e Ubi-LepRNull, porém não avaliamos nos animais LepRNull dado que a deficiência de leptina causa infertilidade. Constatamos que a reativação do Lepr na vida adulta permitiu a recuperação parcial da fertilidade, já que os machos conseguiram engravidar fêmeas controle, porém o desempenho foi pior que no grupo Ubi (Figura 28A).

Os animais LepRNull adultos apresentaram menor peso testicular que os animais controle, enquanto que a reativação do Lepr causou a recuperação parcial (Figura 28B). Os animais Ubi-LepRNull jovens ainda tiveram recuperação parcial do peso testicular (Figura 28E). Os níveis séricos de testosterona foram menores nos animais LepRNull, e houve aumento nos Ubi-LepRNull, porém não observamos diferença estatística, provavelmente pela ampla dispersão dos dados no grupo controle (Figura 28C).

Existem evidências na literatura do efeito da leptina para a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo, afetando centralmente a regulação da reprodução (FINN et al., 1998; QUENNELL et al., 2009). Além disso, camundongos deficientes de leptina apresentam maior concentração de GnRH no hipotálamo, o que reflete defeitos na capacidade de secretar GnRH no sistema porta-hipofisário (DONATO JUNIOR et al., 2011). Quando avaliamos a quantidade de GnRH no hipotálamo de camundongos tratados com TM na vida adulta, observamos que os animais LepRNull tiveram maior estoque de GnRH que os animais Ubi, enquanto que os animais Ubi-LepRNull tiveram quantidade intermediária de GnRH (Figura 28F-I). A infertilidade dos animais obesos ainda está

acompanhada de menor expressão no hipotálamo de genes relacionados ao controle do eixo reprodutor como *Kiss1*, cujo produto proteico, as kisspeptinas, estimulam a secreção do GnRH (COLLEDGE, 2009) e o gene *Nos1*, catalisa a produção do óxido nítrico e também está envolvido na via de liberação de GnRH pela leptina (MCCANN et al., 1998; YU et al., 1997). A reativação em animais adultos não foi capaz de restaurar a expressão hipotalâmica de *Kiss1* nem de *Nos1* (Figura 28D).

No caso das fêmeas adultas, acompanhamos o ciclo estral durante 25 dias como indicador do funcionamento do eixo reprodutor (Figura 28J). As fêmeas do grupo controle apresentaram alternância entre as diferentes etapas do ciclo estral, indicando um padrão de ciclicidade esperado (Figura 28J, círculos brancos). Devido a seus déficits neuroendócrinos, as fêmeas *LepRNull* não apresentaram alternância das etapas do ciclo estral, passando maior parte dos dias na fase de diestro (Figura 28J, quadrados vermelhos). Finalmente a reativação do *Lepr* aumentou o grau de alternância entre as etapas do ciclo, porém não foi suficiente para restaurar o ciclo normal (Figura 28J, triângulos azuis).

Figura 28. Alterações no eixo reprodutor em decorrência da falta de leptina são parcialmente revertidas após a reativação do Lepr. A) Avaliação da fertilidade de machos Ubi e Ubi-LepRNull através do número de fêmeas selvagens que conseguiram engravidar. Abreviações: N.D. valores não detectáveis. B) Média da massa dos dois testículos de machos adultos. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$. C) Concentração sérica de testosterona em machos adultos. Kruskal-Wallis seguido de Dunn. * $P < 0,05$. D) Expressão hipotalâmica de genes envolvidos na liberação do GnRH. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. * $P < 0,05$ para cada gene. E) Média da massa dos dois testículos de machos jovens. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$. F) Quantificação densidade de fibras reativas ao GnRH no hipotálamo de machos adultos apresentados em G-I. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. ** $P < 0,01$. G-I) Micrografias representativas de fibras reativas ao GnRH no hipotálamo de machos controle (G), obesos (H) e reativados (I). J) Ciclo estral de fêmeas adultas dos grupos controle (coluna esquerda, círculos brancos), obesas (coluna central, quadrados

vermelhos) e reativadas (coluna direita, triângulos azuis) acompanhadas durante 25 dias. Cada símbolo representa um dia de acompanhamento. Eixo esquerdo representa o tipo de células encontradas no lavado vaginal. Abreviações: C, predominância de células cornificadas (Estro); M, proporção equitativa de células cornificadas e leucócitos (Metestro); L, predominância de leucócitos (Diestro).

5.8 Avaliação do desenvolvimento cerebral e de aspectos cognitivos e comportamentais de animais que não apresentaram expressão do Lepr durante o desenvolvimento

Outra função da leptina que tem sido muito estudada é a de participar em processos cognitivos, de aprendizagem e diferentes tipos de memória. Como primeira avaliação, pesamos os encéfalos dos animais e observamos que os animais LepRNull possuem encéfalos mais leves que os seus irmãos que se desenvolveram com a sinalização de leptina normal. Interessantemente, os animais que se desenvolveram sem as ações da leptina até a vida adulta, quando foram reativados, apresentaram maior massa encefálica que os obesos, porém não recuperaram completamente a massa encefálica quando comparados aos controles magros (Figura 29A). No caso das fêmeas adultas, observamos padrão similar aos machos, com menor massa encefálica no grupo LepRNull e recuperação parcial no grupo reativado (Figura 29B).

Uma vez que observamos que após a reativação na vida adulta algumas funções não foram recuperadas, hipotetizamos que a circuitaria no hipotálamo desses animais não estivesse normalizada. Utilizamos os neurotransmissores AgRP e β -endorfina (peptídeo produto da clivagem do POMC) como marcadores para estudar as fibras dos neurônios do ARH que se projetam para o PVH (Figura 29C-J).

Os animais obesos LepRNull apresentaram diminuição drástica das projeções de neurônios AgRP e β -endorfina como era esperado por serem deficientes do receptor de leptina (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004b; KAMITAKAHARA et al., 2018) (Figura 29C e F para AgRP e Figura 29D e I para β -endorfina). Os animais que passaram pela reativação do Lepr na vida adulta recuperaram completamente as projeções de neurônios AgRP para o PVH (Figura 29C e G). Um padrão similar foi observado quando avaliamos as projeções de neurônios POMC, porém menos marcante em relação à marcação com AgRP (Figura 29D e J).

A continuação, avaliamos a expressão de genes relacionados com processos cognitivos no hipotálamo (Figura 29K). No hipotálamo de animais LepRNull

observamos menor expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*), do *Igf1* e do gene que codifica para proteína sináptica (*Dlg4*). Avaliamos também a expressão de desacetilases de histonas (*Hdacs*) 3, 5, e 8, implicadas na sinalização da leptina no hipotálamo e cuja alteração de expressão foi demonstrada previamente de estar relacionada a alterações no balanço energético (FUNATO et al., 2011; KABRA et al, 2016). A expressão de *Hdac3* e *Hdac5* está diminuída nos animais *LepRNull* em comparação com o grupo controle, ao contrário da expressão de *Hdac8*, que se encontra aumentada nos animais obesos (Figura 29K, barras vermelhas). Nos animais reativados, a expressão de *Hdac8* foi normalizada, enquanto que as *Hdac3* e *Hdac5* permaneceram diminuídas em relação ao grupo controle (Figura 29K, barras azuis).

Figura 29. A reativação do *Lepr* em camundongos adultos restaura parcialmente parâmetros neurológicos alterados pela falta de sinalização de leptina. A,B) Massa encefálica de machos (A) e fêmeas (B) adultos. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$, * $P < 0,05$ para cada parâmetro. C,D) Quantificação da densidade de fibras de AgRP (C) e β-endorfina (D) no PVH de animais adultos apresentados em E-J. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ para cada parâmetro. E-J) Micrografias representativas de fibras reativas a AgRP (E-G) e β-endorfina (H-J) no PVH de animais adultos controle (E,H), obesos (F,I) e reativados (G,J). Abreviações: PVH, núcleo paraventricular; 3v, terceiro ventrículo. K) Expressão hipotalâmica, em machos adultos, de genes relacionados a processos cognitivos ou enzimas desacetilases de histonas, envolvidas na regulação central do balanço energético pela leptina. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ para cada gene.

Também avaliamos os animais que passaram pelo tratamento com tamoxifeno antes do desmame. A reativação do Lepr em animais jovens não preveniu o desenvolvimento parcial do encéfalo, e os animais Ubi-LeprNull machos e fêmeas apresentaram recuperação parcial da massa encefálica quando adultos (Figura 30A e B).

Ao estudar a expressão no hipotálamo dos genes relacionados a processos cognitivos que não foram restaurados pela reativação do Lepr em animais adultos observamos um perfil diferente nos animais jovens (Figura 30C). Não observamos diferenças entre os grupos na expressão de *Bdnf*, *Igf1* ou *Hdac3*; porém a expressão de *Hdac5*, a desacetilase descrita como fundamental para a função da leptina no hipotálamo, foi menor nos animais obesos e a reativação do Lepr não foi capaz de restaurá-la.

Figura 30. A reativação do Lepr em camundongos jovens não recupera parâmetros neurológicos alterados pela falta de sinalização de leptina. A,B) Massa encefálica de machos (A) e fêmeas (B) jovens. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls. **** $P < 0,0001$, * $P < 0,05$ para cada parâmetro. C) Expressão hipotalâmica, em machos jovens, de genes que não resultaram recuperados nos animais adultos, relacionados a processos cognitivos ou enzimas desacetilases de histonas, envolvidas na regulação central do balanço energético pela leptina. One-way ANOVA seguida de Newman-Keuls * $P < 0,05$ para cada gene.

Para estudar mais profundamente possíveis alterações cognitivas, avaliamos o comportamento em animais que passaram pelo tratamento com tamoxifeno na vida adulta.

Avaliamos a ansiedade através do teste de campo aberto (Figura 31A-C). Nesse teste, os animais foram colocados em uma plataforma de campo aberto durante 5 minutos e foi avaliada a distância total percorrida nesse tempo. Os animais LepRNull se movimentaram significativamente menos que os controles, enquanto que os animais Ubi-LeprNull tiveram um desempenho similar aos controles,

percorrendo a mesma distância (Figura 14A). Os animais LepRNull apresentaram menor tempo de exploração 90 minutos e 24 horas após terem sido colocados pela primeira vez na plataforma. Já o grupo reativado apresentou grau de ansiedade similar ao grupo controle em todas as instâncias avaliadas, com tendência a menor exploração no longo prazo (Figura 31C e D).

De forma geral o teste mostra a participação da via de sinalização de leptina no comportamento de ansiedade e aparentemente não existe uma dependência de uma janela temporal durante o crescimento do animal para ser formado.

Para estudar outro tipo de memória (de aversão), utilizamos o teste de esQUIVA passiva ou inibitória (Figura 31D e E). Esse teste se baseia no princípio do animal ser exposto a uma experiência negativa que precisa ser aprendida. O teste consiste em colocar o animal em uma plataforma apoiada sobre um campo que pode ser estimulado eletricamente quando o animal coloca as quatro patas nele.

Durante o treino é avaliado o tempo que o animal demora em descer da plataforma (latência). Durante o treino, os três grupos apresentaram latência similar (Figura 31D). No dia seguinte foi testada a capacidade dos animais de terem aprendido a experiência negativa (Figura 31E). Quando colocados na plataforma, os animais controle apresentaram latência seis vezes maior que no treino, demonstrando terem adquirido a memória aversiva. Já os animais LepRNull e Ubi-LepRNull tiveram latência similar à do treino, indicando que a capacidade de aprendizado está prejudicada pela falta de leptina e que deve estar limitada a uma janela de tempo mais precoce no desenvolvimento, porém não obtivemos diferença estatística provavelmente por causa da ampla dispersão dos dados no grupo controle.

Finalmente estudamos o efeito da reativação do Lepr em animais adultos no teste de labirinto de Barnes que avalia memória espacial. Dado que a maioria dos testes comportamentais requer a movimentação locomotora dos animais e que os animais LepRNull apresentam marcante déficit de locomoção voluntária, o que causaria prejuízo na interpretação dos resultados, para estes testes foram apenas comparados os animais controle magros e os animais reativados (Figura 31F-K). Durante quatro dias os animais tiveram oportunidade de aprender a localizar o esconderijo em sessões de treino. Não observamos diferenças na capacidade de

aprendizado dos animais Ubi-LepRNull em comparação com o grupo controle, sendo que cada dia os animais cometeram menos erros (Figura 31F) e demoraram menos tempo para encontrar o esconderijo (Figura 31G).

No quinto dia foi avaliada a capacidade dos animais de lembrarem a tarefa aprendida nos dias anteriores, sendo uma avaliação da memória de curto prazo. Nesse teste foi contado o número de vezes que o animal passou pelo esconderijo verdadeiro (Figura 31H) assim como o tempo que permaneceu nele (Figura 31I). Não houve diferença entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados. Os animais reativados tiveram a mesma capacidade de lembrar a tarefa aprendida no dia anterior. Uma semana depois do treino, no dia 12, foi avaliada a memória de longo prazo dos animais. Para isso, foram submetidos ao mesmo teste e novamente o grupo reativado apresentou resposta igual ao grupo controle no número de vezes que frequentou o esconderijo (Figura 31J) e o tempo que passou nele (Figura 31K).

Figura 31. A falta de leptina no desenvolvimento leva a alteração de comportamentos e aprendizados, alguns dos quais são restaurados após a reativação do *Lep* em machos adultos. A-C) Comportamento de ansiedade analisado através do campo aberto. A) Distância percorrida pelos animais durante o treino. B,C) Tempo percorrido na mesma arena 90

minutos (B) e 24h (C) após o treinamento. Kruskal-Wallis seguido de Dunn. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ para cada parâmetro. D,E) Memória de aversão avaliada através da esquiva inibitória. Latência para descer na plataforma durante o treino (D) e depois de conhecer o estímulo aversivo (E). F-K) Memória espacial avaliada através do labirinto de Barnes. F,G) Durante os sucessivos dias de treino, redução do tempo em achar o esconderijo medido através da latência primária (F), e redução das entradas em falsos esconderijos medida através dos erros primários (G). H,I) Durante os testes de curto prazo (H) e longo prazo (I) tempo passado na zona alvo, lugar onde se encontrava o esconderijo no treino. J,K) Durante os testes de curto prazo (J) e longo prazo (K) a distribuição do número de entradas nas diferentes posições do labirinto.

6 DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, vários estudos tem demonstrado o papel fundamental da leptina no controle do balanço energético, através da sua ação no SNC, principalmente via neurônios do hipotálamo (Cohen et al., 2001; ELIAS et al., 1999), agindo em dois grupos de neurônios de primeira ordem no ARH: inibindo os neurônios orexigênicos AgRP/NPY e estimulando os neurônios anorexigênicos POMC (HAHN et al., 1998; SCHWARTZ et al., 1996).

As ações clássicas descritas para a leptina em animais adultos (regulação do peso corporal, adiposidade e consumo alimentar) parece não ocorrer em animais durante o período da infância (MISTRY; SWICK; ROMSOS, 1999). No presente trabalho podemos confirmar essas observações através de duas abordagens: o acompanhamento de peso corporal de camundongos deficientes do *Lepr* durante o crescimento; e o tratamento com leptina em animais infantis (P10) até o desmame. A aparente falta de regulação do peso corporal de animais jovens não se deve à falta de sinalização da leptina, já que foi descrito que na primeira semana de vida camundongos expressam o *Lepr* no SNC e essas células são responsivas a leptina (CARON et al., 2010). Novamente, comprovamos essa informação através da mensuração de células que expressam o *Lepr* e que respondem a leptina (VAISSE et al., 1996) em camundongos infantis. Portanto, a leptina parece exercer funções diferentes na infância e na vida adulta.

Durante as primeiras semanas de vida dos camundongos ocorrem etapas finais do desenvolvimento do hipotálamo, processos que ocorrem no período intrauterino em humanos (BOURET, 2009; GROVE et al., 2003; KOUTCHEROV et al., 2002). E é nesse período crítico que foram descritas funções neurotróficas da leptina, como o desenvolvimento das projeções do ARH para os núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação do balanço energético nos adultos (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004a; BOUYER; SIMERLY, 2013) e o pico de secreção de leptina (AHIMA; PRABAKARAN; FLIER, 1998). Essas informações bem estabelecidas na literatura sugerem que a leptina pode ter uma função importante para o desenvolvimento do SNC e em aspectos que envolvem programação

metabólica, uma vez que o balanço energético na idade adulta é sensível a alterações durante o desenvolvimento (BOURET, 2009, 2010).

Durante o seu desenvolvimento, o organismo está mais exposto a alterações do ambiente (intrauterino ou pós-natal), sendo que ambientes adversos podem afetar diretamente o organismo levando a modificações moleculares, bioquímicas e celulares permanentes que desencadearão respostas metabólicas particulares na vida adulta. Esse conceito é definido como “programação metabólica” (HALES; BARKER, 2001). Existem vários estudos em humanos e em roedores fortalecendo a teoria da importância do ambiente para o modelamento dos seres vivos. Em humanos o trabalho mais clássico foi a observação da chamada “fome holandesa” que se estendeu durante um ano no final da segunda guerra mundial na Holanda. Os filhos de mulheres que estavam no final da gravidez ou que passaram o começo da infância durante a fome apresentaram maior propensão à obesidade e distúrbios metabólicos que aqueles indivíduos que nasceram antes da fome ou depois de encerrado esse período (RAVELLI; STEIN; SUSSER, 1976).

Em roedores, foi demonstrado que animais que nasceram de fêmeas obesas ou que passaram por períodos de subnutrição na infância são mais susceptíveis a desenvolverem alterações metabólicas na vida adulta (BONEY et al., 2005; CARMODY et al., 2011; JUAN DE SOLIS et al., 2016; SCHWARTZ; TCHOP; ZELTSER, 2014).

No presente trabalho propomos a hipótese que a ausência da leptina durante as etapas de desenvolvimento age como um programador metabólico. Para testar nossa hipótese utilizamos um modelo que nos permite avaliar as consequências da falta de leptina durante fases críticas do desenvolvimento. Decidimos reativar o Lepr com 10 semanas de vida devido a evidências que mostram que nessa idade o SNC se encontra amplamente desenvolvido e os processos de plasticidade são limitados (BOURET, 2009). O modelo apresenta obesidade mórbida (BERGLUND et al., 2012), o que foi confirmado tanto em machos quanto em fêmeas adultos.

A reativação do Lepr em camundongos adultos foi suficiente para normalizar a resposta à leptina no hipotálamo assim como a resposta fisiológica de perda de peso e redução do consumo alimentar. Porém, observamos a primeira evidência de alteração decorrente da falta de sinalização de leptina durante o desenvolvimento:

os animais adultos ainda se mantiveram mais pesados que os controles (12-15%), apesar da restauração da sinalização da leptina. O maior peso foi associado a maior adiposidade, sendo mais evidente nos machos, porém essa relação não foi mantida nas fêmeas, as quais apresentaram leptinemia normalizada. Em ambos os casos o maior peso corporal nos grupos reativados não foi causado por maior consumo alimentar, o que reforça o conceito de plasticidade nos circuitos que regulam esse comportamento (LUQUET et al., 2005).

Existem trabalhos demonstrando a importância da leptina na manutenção do balanço energético e a associação entre baixo gasto energético e obesidade (ERICKSON; HOLLOPETER; PALMITER, 1996; PELLEYMOUNTER et al., 1995; RAVUSSIN et al., 1988; SCHLOGL et al., 2015). Tanto em machos quanto em fêmeas, o maior peso corporal junto com consumo alimentar normalizado esteve associado a menor gasto energético em estado basal (10-12%), o que sugere que a ausência de leptina no desenvolvimento levou à alteração do balanço energético. Esse menor gasto energético basal esteve associado a menor movimentação voluntária, porém o ritmo circadiano de metabolização de nutrientes não parece depender da presença da leptina no desenvolvimento, sugerindo que esses parâmetros são regulados por mecanismos diferentes.

Como foi mencionado anteriormente, a ação da leptina é através da sua ligação com o Lepr no hipotálamo. No caso de animais obesos, a falta de sinalização de leptina leva ao aumento da expressão dos neurotransmissores *Agrp* e *Npy*, enquanto que *Pomc* e *Cart* estão diminuídos, o que explica o menor gasto energético (CHEN et al., 2000; STE MARIE et al., 2000). A reativação em adultos normalizou a expressão de *Agrp* e *Npy*, mas não foi suficiente para restaurar *Pomc* e *Cart*, o que sugere que a regulação dos dois grupos de neurotransmissores ocorre de forma independente (ELMQUIST, 2001). A expressão reduzida do *Pomc* não parece ser decorrente de menor número de neurônios, já que não observamos diferenças entre o número de neurônios responsivos ao α -MSH no hipotálamo de camundongos reativados e controle.

Outro mecanismo envolvido na regulação do metabolismo basal é através dos hormônios tireoidianos, que sabidamente aumentam a taxa metabólica basal e que

estão diminuídos em casos de obesidade (OH; KAPLAN, 1994). Os animais adultos normalizaram os valores de T4 circulantes após a reativação do Lepr.

Finalmente, observamos uma tendência a menor concentração de noradrenalina na urina de animais obesos, que não parece ser recuperada nos animais reativados. É descrito na literatura que a leptina regula sua própria produção nos adipócitos brancos por um mecanismo de retroalimentação negativa mediada por noradrenalina, sendo que animais que não produzem este neurotransmissor apresentam deficiências na inibição da produção de leptina no tecido adiposo (COMMINS et al., 1999). No nosso modelo, a maior concentração de leptina sérica junto com maior adiposidade poderia estar relacionada à menor concentração de noradrenalina. Acreditamos que a falta de significância estatística se deva ao número pequeno de animais dos quais conseguimos coletar amostragem.

De forma geral, esses dados reforçam a importância da sinalização de leptina durante o desenvolvimento, e que a regulação de mecanismos no SNC ocorre de forma complexa, mediante a interação de diversos eixos hormonais.

Para diferenciar os efeitos no metabolismo em decorrência da perda de peso daqueles relacionados à programação metabólica, reativamos um segundo grupo de camundongos logo após o desmame, quando ainda não apresentaram o fenótipo de obesidade. Novamente observamos diferença na resposta de machos e fêmeas, sendo que os machos jovens tiveram o peso normalizado enquanto que as fêmeas estabilizaram com peso maior, mesmo nunca tendo passado pelo sobrepeso, o que sugere dimorfismo sexual no mecanismo de regulação do peso corporal.

Surpreendentemente, apesar do peso normalizado nos machos jovens, a composição corporal continuou alterada, com maior adiposidade e maior leptinemia. Isso sugere que mesmo sem regular o peso a leptina teve influência na adiposidade dos animais. Não dosamos leptinemia nas fêmeas jovens, porém as fêmeas adultas apresentaram maior peso e adiposidade, com leptinemia normalizada, portanto provavelmente as fêmeas jovens apresentem resposta similar.

Confirmamos no caso dos machos jovens que a recuperação parcial do gasto energético e da atividade locomotora não é devido a emagrecimento e provavelmente está associada ao requerimento da leptina em fases do

desenvolvimento anteriores ao desmame, sugerindo um efeito de programação metabólica. Interessantemente, observamos que a perda do padrão circadiano de metabolização de nutrientes nos animais obesos acontece após o desmame, já que animais obesos tratados com TM em idade jovem apresentaram oscilação intermediária.

Em animais jovens, a expressão dos neurotransmissores de neurônios de primeira ordem regulados pela leptina foi normalizada após a reativação. Isso sugere que peptídeos anorexigênicos dependem da leptina mais precocemente que os peptídeos orexigênicos, e que as alterações observadas no gasto energético e atividade ambulatoria não dependem exclusivamente da expressão normal de *Agrp*, *Npy*, *Pomc* e *Cart*.

Por ter observado alterações no metabolismo basal de animais após a reativação do Lepr, hipotetizamos que o organismo seria mais sensível a apresentar alterações em situações de balanço energético positivo ou negativo. É sabido que os mecanismos que regulam a resposta nessas duas situações são diferentes (AHIMA et al., 1999; XU et al., 2010). Em casos de balanço energético negativo como um período de privação alimentar, o organismo normalmente responde ativando mecanismos de preservação de energia, como redução do gasto energético (LEIBEL; ROSENBAUM; HIRSCH, 1995). A falta de sinalização de leptina em animais obesos leva a economia de energia mesmo em situações de alimento disponível através da redução do gasto energético (PELLEYMOUNTER et al., 1995).

No nosso modelo, machos adultos reativados apresentaram perda de peso parcialmente recuperada frente ao jejum, porém o gasto energético foi mais preservado que no grupo obeso, sugerindo que os mecanismos que regulam a resposta ao estresse causado por falta de alimento não são completamente recuperados pela restauração da via de sinalização da leptina na vida adulta. De forma interessante, a falta de locomoção voluntária em animais obesos parece estar relacionada à falta de estímulo ou como mecanismo de preservação, da mesma forma que o gasto energético basal é preservado. A falta de alimento nos animais obesos parece agir como estímulo para o aumento da locomoção no nível de animais magros.

A recuperação do metabolismo após a realimentação foi similar entre os grupos reativado e controle em todos os parâmetros avaliados, o que indica que esses mecanismos de recuperação de um estresse como o jejum são restaurados pela reativação do Lepr nos adultos.

Quando expomos animais jovens ao desafio de jejum, os animais reativados se comportaram de forma similar aos controles na perda de peso, porém tiveram menor glicemia. Após a realimentação os grupos controle e reativado recuperaram o peso perdido durante o jejum e restauraram a glicemia, enquanto que os animais obesos permaneceram com menor peso mesmo após a realimentação, provavelmente devido ao maior peso perdido durante o jejum. Esses resultados sugerem que a reativação do Lepr em animais jovens parece melhorar a resposta ao jejum, indicando que a leptina pode influenciar os mecanismos que regulam a resposta a situações de balanço energético negativo.

No caso das fêmeas adultas observamos uma resposta diferente àquela dos machos adultos. Se bem o grupo obeso perdeu menos peso, como esperado por terem um metabolismo mais econômico, as fêmeas reativadas perderam similar porcentagem de peso que o grupo controle. Durante a realimentação, as fêmeas obesas não recuperaram o peso perdido enquanto que as reativadas tiveram menor ganho de peso que o grupo controle, sem alterações no consumo alimentar. Esses resultados sugerem que os mecanismos que regulam a resposta ao jejum e a recuperação desse desafio são diferentes, e que a leptina age de forma diferente em ambos os mecanismos, assim como esses mecanismos parecem estar diferentes nos machos e nas fêmeas.

Quando expostos a um alimento mais palatável, observamos o aumento no consumo em animais obesos e interessante observamos que o grupo reativado teve um consumo calórico intermediário, acompanhado de maior ganho de peso que o grupo obeso. Não observamos diferenças no VO_2 consumido, provavelmente por causa da grande dispersão dos dados, porém comprovamos o efeito de aumento do gasto energético nos três grupos causado pela dieta. A drástica diminuição no RER frente ao HFD é causada pelo fato dos animais metabolizarem predominantemente carboidratos quando alimentados com dieta padrão. Finalmente, a atividade locomotora foi reduzida significativamente em

animais controle e reativados, enquanto que os animais obesos aumentaram sua locomoção. Isso provavelmente é causado pelo aumento do teor calórico do alimento. Esses resultados sugerem que a reativação do Lepr em animais adultos restaura parcialmente a resposta frente a uma situação de balanço energético positivo.

Outra função da leptina bem descrita na literatura é a de regular a homeostase glicêmica (BERGLUND et al., 2012). Leptina e insulina compartilham a via de sinalização da PI3K (NISWENDER et al., 2003), e é bem estabelecido o desbalanço na regulação da glicemia que ocorre em indivíduos obesos (KOCH et al., 2010). Uma característica da obesidade é a hipertrofia e hiperplasia das células β -pancreáticas, o que leva a maior produção de insulina em resposta a resistência das células à ação do hormônio (CERF, 2013).

A reativação do Lepr em machos e fêmeas adultos normalizou a tolerância à glicose, mantendo certo grau de resistência à insulina, o que é justificado pela concentração elevada de insulina sérica nesses animais, em decorrência do quadro de obesidade prévio. A gliconeogênese hepática diminuída em animais adultos reativados em relação ao grupo controle, apesar do aumento na sensibilidade a insulina, pode ser explicada pelo fato desses animais ainda apresentarem maior concentração de leptina circulante. Existem evidências que mostram que além da leptina regular a homeostase glicêmica por vias dependentes da insulina, ela também regula esses processos através de mecanismos centrais independentes do aumento da sensibilidade a insulina (GERMAN et al., 2011; POCAI et al., 2005). Dado que a sinalização da leptina está recuperada no hipotálamo, pode estar ocorrendo maior ativação das vias independentes da insulina aumentando a captação de glicose hepática, o que explicaria a maior tolerância à glicose, e inibindo a gliconeogênese.

Diferentemente do observado para o balanço energético, a homeostase glicêmica parece não depender da sinalização de leptina no desenvolvimento, pois a reativação do Lepr antes da expressão do fenótipo de obesidade foi suficiente para normalizar a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina. Esses resultados sugerem que o fenótipo intermediário observado nos adultos está relacionado à obesidade e não à programação metabólica.

A sinalização de leptina é fundamental para o normal funcionamento do eixo reprodutor. Dado que a leptina age como um indicador do estado nutricional do organismo, alterações na sinalização central da leptina estão associadas à interrupção do eixo reprodutor, por ser um processo custoso energeticamente (MOSCHOS; CHAN; MANTZOROS, 2002), tanto em camundongos (AHIMA et al., 1996) como em humanos (ALFER et al., 2000). Existem evidências que sugerem que a leptina estimula a secreção de GnRH (QUENNEL et al., 2009) e que animais com deficiência na sinalização de leptina apresentam acúmulo de GnRH no hipotálamo, o que afeta indiretamente o eixo (DONATO JUNIOR et al., 2011). As kisspeptinas, peptídeos secretados pelos neurônios que expressam o gene *Kiss1*, estimulam a secreção de GnRH (MESSAGER et al., 2005). O óxido nítrico, um gás que age como neurotransmissor e pode ser produzido pela enzima nNOS também está envolvido na liberação do GnRH (MCCANN et al., 1998; YU et al., 1997).

A reativação em machos adultos levou à recuperação parcial da fertilidade, o que pode ser explicado pela recuperação parcial da massa testicular e da concentração sérica de testosterona; a falta de normalização da expressão de *Kiss1* e *nNos* poderiam explicar a falta de recuperação da expressão do GnRH no hipotálamo. O papel da leptina no eixo reprodutor parece ser importante antes do desmame, já que a reativação em animais jovens teve o mesmo efeito na massa testicular. Não avaliamos diretamente a fertilidade das fêmeas adultas, mas devido a que o ciclo estral não foi normalizado e considerando que o eixo reprodutor das fêmeas é mais complexo por conta de maior necessidade de sincronização hormonal, provavelmente a fertilidade não seja recuperada.

Como discutido anteriormente, a leptina parece ser importante para o desenvolvimento do SNC. Existem evidências de que a falta de leptina está relacionada à menor massa encefálica em roedores (AHIMA et al, 1999; BEREITER; JEANRENAUD, 1979; SENA; SARLIEVE; REBER, 1985; VAN DER KROON; SPEIJERS, 1979;). Roedores deficientes do *Lepr* têm prejuízos na formação de memória espacial (LI et al., 2002) e a falta de leptina está associada a comportamentos depressivos, sendo revertidos por sua ação local no hipocampo (LU et al., 2006). Alguns estudos sugerem que o tratamento com leptina pode ajudar no desenvolvimento cognitivo (HARVEY, 2007; PAZ-FILHO et al., 2008, 2016).

Comprovamos que o desenvolvimento normal da massa encefálica é dependente da leptina, sugerindo que a ação dela ocorre em etapas precoces do desenvolvimento, já que a reativação em animais jovens não foi suficiente para reverter a menor massa encefálica. Surpreendentemente, a reativação em animais adultos, depois de passada a idade na qual ainda existe plasticidade no SNC, levou ao aumento significativo da massa encefálica, o que indica que a leptina tem a capacidade de regular o crescimento celular no SNC, mesmo na vida adulta.

Acredita-se que a ação neurotrófica da leptina esteja restrita às primeiras semanas de vida, já que camundongos *ob/ob* apresentam deficiência na formação de projeções do ARH para o PVH, as quais somente podem ser recuperadas se os animais forem expostos à leptina durante esse período crítico (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004b; KAMITAKAHARA et al, 2018). No nosso modelo avaliamos a expressão das fibras reativas à AgRP e β -endorfina. Interessantemente, observamos que a reativação do Lepr em animais adultos normalizou o padrão das fibras, o que sugere que essas fibras foram formadas nos animais adultos após a exposição à leptina. Esse resultado é uma forte evidência de que a ação trófica da leptina no SNC não é restrita às fases iniciais da vida como se acredita. Algumas explicações para a diferença dos nossos resultados com os descritos na literatura é que o nosso modelo não depende de tratamento exógeno com leptina. Fisiologicamente, a leptina tem um padrão de produção que é diferente do obtido através de injeções diárias. Outra diferença é o tempo que os animais estiveram expostos à leptina. No nosso modelo os animais foram tratados com tamoxifeno e acompanhados durante seis semanas antes do início dos testes *in vivo*. Tal vez o tempo de tratamento utilizado em trabalhos prévios não foi suficiente para completar a formação das projeções. Porém, devido a que tanto camundongos quanto humanos deficientes de leptina respondem ao tratamento com o hormônio, a ação anorexigênica da leptina no SNC parece não depender diretamente da formação dessas projeções.

Recentemente foi descrita a participação de enzimas da família das desacetilase de histonas na regulação do balanço energético (ALENGHAT et al., 2008; FUNATO et al., 2011). Em particular, a Hdac3 foi encontrada diminuída em animais expostos a jejum, enquanto que a Hdac8 se encontra aumentada na situação oposta, durante a exposição à HFD (FUNATO et al., 2011). Notoriamente, a Hdac5 foi descrita como parte do mecanismo de ação da leptina no hipotálamo,

dado que *Hdac5* está diminuída em camundongos *ob/ob*, e sua expressão é recuperada após o tratamento com leptina. A inibição da *Hdac5* no hipotálamo por métodos farmacológicos ou genéticos leva ao aumento do consumo alimentar e a susceptibilidade a obesidade induzida pela dieta, assim como redução da expressão do *Pomc*, através do aumento da acetilação e diminuição da fosforilação do STAT3 (KABRA et al., 2016).

No nosso modelo, camundongos machos reativados tiveram redução na expressão hipotalâmica dessas três enzimas. Interessantemente, a única enzima que não foi normalizada após a reativação em animais jovens foi a *Hdac5*, o que sugere a interação dessa enzima com a leptina em idades mais precoces e talvez a sua redução esteja relacionada ao fenótipo de menor gasto energético observado nos machos jovens.

Além de regular o desenvolvimento do encéfalo, a leptina foi descrita de participar em processos cognitivos e de memória (HARVEY, 2007). Crianças deficientes da sinalização de leptina apresentam idade cognitiva menor à idade cronológica, e o tratamento com leptina é capaz de melhorar o desempenho em tarefas cognitivas (PAZ-FILHO et al., 2008).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um dos fatores mais importantes envolvidos sobrevivência e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento do SNC, e sua expressão no hipotálamo é notoriamente elevada em comparação a outras regiões do SNC, particularmente em vários núcleos envolvidos na regulação do balanço energético (TAPIA-ARANCIBIA et al., 2004). Por estar presente no encéfalo de animais adultos acredita-se que tenha funções relacionadas à plasticidade neuronal. No nosso modelo observamos menor expressão do *Bdnf* em animais obesos e reativados, o que sugere que a leptina no desenvolvimento seja importante para a plasticidade neuronal. A reativação do *Lepr* antes do desmame resultou em níveis semelhantes de *Bdnf* no hipotálamo dos três grupos indicando um efeito temporal da sinalização da leptina sobre a expressão desse fator.

No nosso modelo pudemos identificar diferentes memórias associadas à leptina. Memórias aversivas parecem afetadas pela falta de leptina e não são recuperadas com a reativação em animais adultos, o que sugere que a ação da

leptina sobre a formação desse comportamento em particular acontece mais precocemente na vida. Por outro lado, em testes de memória espacial, os animais reativados apresentam resposta similar aos controles; porém, como não fomos capazes de avaliar essa memória em animais obesos não podemos diferenciar se essa memória é perdida nos animais obesos e recuperada após a reativação, ou se não foi afetada pela ausência de leptina.

No presente trabalho conclui-se que a ausência da leptina durante o desenvolvimento leva à programação metabólica através de modificações na regulação central do balanço energético basal e de eixos endócrinos. Além disso, a sua ausência durante as fases iniciais da vida leva a efeitos deletérios e permanentes em indivíduos adultos como a diminuição do tamanho do encéfalo, e a formação de comportamentos específicos. A partir dessas observações, é evidente a importância do ambiente intrauterino quanto pós-natal como fator crítico no aumento da prevalência de comorbidades associadas ao sobrepeso e obesidade. Interessantemente, a homeostase glicêmica não parece depender da presença da via da leptina no começo da vida. Estudos futuros com foco nas etapas iniciais da vida serão importantes para entender com mais precisão os mecanismos por trás da programação metabólica promovida pela ausência da leptina. O conhecimento desses mecanismos contribuirá ao desenvolvimento de tratamentos e medidas preventivas mais eficientes, visando a diminuição da epidemia da obesidade.

REFERÊNCIAS

- AHIMA, R.S. et al. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. **Endocrinology**, v.140, n.6, p.2755-62, 1999.
- AHIMA, R.S. et al. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **J Clin Invest**, v.99, n.3, p.391-5, 1997.
- AHIMA, R.S.; HILEMAN, S.M. Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. **Regul Pept**, v.92, n.1-3, p.1-7, 2000.
- AHIMA, R.S. et al. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. **Endocrinology**, v.140, n.11, p.4923-31, 1999.
- AHIMA, R.S.; PRABAKARAN, D.; FLIER, J.S. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. **J Clin Invest**, v.101, n.5, p.1020-7, 1998.
- AHIMA, R.S. et al. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, v.382, n.6588, p.250-2, 1996.
- ALENGHAT, T. et al. Nuclear receptor corepressor and histone deacetylase 3 govern circadian metabolic physiology. **Nature**, v.456, n.7224, p.997-1000, 2008.
- ALFER, J. et al. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. **Mol Hum Reprod**, v.6, n.7, p.595-601, 2000.
- BALTHASAR, N. et al. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. **Neuron**, v.42, n.6, p.983-91, 2004.
- BAYOL, S.A.; FARRINGTON, S.J.; STICKLAND, N.C. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. **Br J Nutr**, v.98, n.4, p.843-51, 2007.
- BEREITER, D.A.; JEANRENAUD, B. Altered neuroanatomical organization in the central nervous system of the genetically obese (ob/ob) mouse. **Brain Res**, v.165, n.2, p.249-60, 1979.
- BERGLUND, E.D. et al. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. **J Clin Invest**, v.122, n.3, p.1000-9, 2012.
- BONEY, C.M. et al. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. **Pediatrics**, v.115, n.3, p.e290-6, 2005.
- BOURET, S.G. Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.48 Suppl.1, p.S31-8, 2009. ISSN
- BOURET, S.G. Neurodevelopmental actions of leptin. **Brain Res**, v.1350, p.2-9, 2010.
- BOURET, S.G. et al. Distinct roles for specific leptin receptor signals in the development of hypothalamic feeding circuits. **J Neurosci**, v.32, n.4, p.1244-52, 2012.
- BOURET, S.G.; DRAPER, S.J.; SIMERLY, R.B. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. **J Neurosci**, v.24, n.11, p.2797-805, 2004a.

BOURET, S.G.; DRAPER, S.J.; SIMERLY, R.B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. **Science**, v.304, n.5667, p.108-10, 2004b.

BOUYER, K.; SIMERLY, R.B. Neonatal leptin exposure specifies innervation of presympathetic hypothalamic neurons and improves the metabolic status of leptin-deficient mice. **J Neurosci**, v.33, n.2, p.840-51, 2013.

BRAY, G.A.; YORK, D.A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. **Physiol Rev**, v.59, n.3, p.719-809, 1979.

BUETTNER, C. et al. Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. **Cell Metab**, v.4, n.1, p.49-60, 2006.

CARMODY, J.S. et al. Respective contributions of maternal insulin resistance and diet to metabolic and hypothalamic phenotypes of progeny. **Obesity (Silver Spring)**, v.19, n.3, p.492-9, 2011.

CARON, E. et al. Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. **J Comp Neurol**, v.518, n.4, p.459-76, 2010.

CASES, J.A. et al. Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo. **Diabetes**, v.50, n.2, p.348-52, 2001.

CERF, M.E. Beta cell dysfunction and insulin resistance. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.4, p.37, 2013.

CHEHAB, F.F.; LIM, M.E.; LU, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nat Genet**, v.12, n.3, p.318-20, 1996.

CHEHAB, F.F. et al. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science**, v.275, n.5296, p.88-90, 1997.

CHEN, A.S. et al. Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. **Transgenic Res**, v.9, n.2, p.145-54, 2000.

COHEN, P. et al. Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. **J Clin Invest**, v.108, n.8, p.1113-21, 2001.

COLEMAN, D.L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia**, v.14, n.3, p.141-8, 1978.

COLLEDGE, W.H. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling. **Trends Endocrinol Metab**, v.20, n.3, p.115-21, 2009.

COMMINS, S.P. et al. Norepinephrine is required for leptin effects on gene expression in brown and white adipose tissue. **Endocrinology**, v.140, n.10, p.4772-8, 1999.

CRAVO, R.M. et al. Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. **PLoS One**, v.8, n.3, p.e58698, 2013.

DA SILVA, R.P. et al. Leptin resistance is not the primary cause of weight gain associated with reduced sex hormone levels in female mice. **Endocrinology**, v.155, n.11, p.4226-36, 2014.

DANIELIAN, P.S. et al. Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. **Curr Biol**, v.8, n.24, p.1323-6, 1998.

DONATO JR, J. et al. 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.355-68, 2011.

EL-HASCHIMI, K. et al. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. **J Clin Invest**, v.105, n.12, p.1827-32, 2000.

ELIAS, C.F. et al. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**, v.23, n.4, p.775-86, 1999.

ELMQUIST, J.K. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.25 Suppl.5, p.S78-82, 2001.

ERICKSON, J.C.; CLEGG, K.E.; PALMITER, R.D. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. **Nature**, v.381, n.6581, p.415-21, 1996.

ERICKSON, J.C.; HOLLOPETER, G.; PALMITER, R.D. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. **Science**, v.274, n.5293, p.1704-7, 1996.

FAROOQI, I.S. et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **J Clin Invest**, v.110, n.8, p.1093-103, 2002.

FINN, P.D. et al. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. **Endocrinology**, v.139, n.11, p.4652-62, 1998.

FUNATO, H. et al. Fasting and high-fat diet alter histone deacetylase expression in the medial hypothalamus. **PLoS One**, v.6, n.4, p.e18950, 2011.

GERMAN, J.P. et al. Leptin activates a novel CNS mechanism for insulin-independent normalization of severe diabetic hyperglycemia. **Endocrinology**, v.152, n.2, p.394-404, 2011.

GROVE, K.L. et al. Postnatal development of the hypothalamic neuropeptide Y system. **Neuroscience**, v.116, n.2, p.393-406, 2003.

GUO, K. et al. Disruption of peripheral leptin signaling in mice results in hyperleptinemia without associated metabolic abnormalities. **Endocrinology**, v.148, n.8, p.3987-97, 2007.

HAHN, T.M. et al. Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. **Nat Neurosci**, v.1, n.4, p.271-2, 1998.

HALAAS, J.L. et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, v.269, n.5223, p.543-6, 1995.

HALES, C.N.; BARKER, D.J. The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull**, v.60, p.5-20, 2001.

HARRIS, R.B. et al. A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. **Endocrinology**, v.139, n.1, p.8-19, 1998.

HARVEY, J. Leptin: a multifaceted hormone in the central nervous system. **Mol Neurobiol**, v.28, n.3, p.245-58, 2003.

HARVEY, J. Leptin regulation of neuronal excitability and cognitive function. **Curr Opin Pharmacol**, v.7, n.6, p.643-7, 2007.

INGALLS, A.M.; DICKIE, M.M.; SNELL, G.D. Obese, a new mutation in the house mouse. **J Hered**, v.41, n.12, p.317-8, 1950.

- JUAN DE SOLIS, A. et al. Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. **Mol Metab**, v.5, n.3, p.198-209, 2016.
- KABRA, D.G. et al. Hypothalamic leptin action is mediated by histone deacetylase 5. **Nat Commun**, v.7, p.10782, 2016.
- KAMITAKAHARA, A. et al. A critical period for the trophic actions of leptin on AgRP neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. **J Comp Neurol**, v.526, n.1, p.133-145, 2018.
- KOCH, C. et al. Leptin rapidly improves glucose homeostasis in obese mice by increasing hypothalamic insulin sensitivity. **J Neurosci**, v.30, n.48, p.16180-7, 2010.
- KOUTCHEROV, Y. et al. Organization of human hypothalamus in fetal development. **J Comp Neurol**, v.446, n.4, p.301-24, 2002.
- 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.621-8, 1995.
- LEONE, D.P. et al. Tamoxifen-inducible glia-specific Cre mice for somatic mutagenesis in oligodendrocytes and Schwann cells. **Mol Cell Neurosci**, v.22, n.4, p.430-40, 2003.
- LEREA, J.S. et al. Reducing Adiposity in a Critical Developmental Window Has Lasting Benefits in Mice. **Endocrinology**, v.157, n.2, p.666-78, 2016.
- LESHAN, R.L. et al. Direct innervation of GnRH neurons by metabolic- and sexual odorant-sensing leptin receptor neurons in the hypothalamic ventral premammillary nucleus. **J Neurosci**, v.29, n.10, p.3138-47, 2009.
- LI, X.L. et al. Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. **Neuroscience**, v.113, n.3, p.607-15, 2002.
- LU, X.Y. et al. Leptin: a potential novel antidepressant. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, n.5, p.1593-8, 2006.
- LUQUET, S. et al. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. **Science**, v.310, n.5748, p.683-5, 2005.
- MANSUY, I.M.; SUTER, U. Mouse genetics in cell biology. **Exp Physiol**, v.85, n.6, p.661-79, 2000.
- MCCANN, S.M. et al. Hypothalamic control of FSH and LH by FSH-RF, LHRH, cytokines, leptin and nitric oxide. **Neuroimmunomodulation**, v.5, n.3-4, p.193-202, 1998.
- MESSAGER, S. et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.102, n.5, p.1761-6, 2005.
- MISTRY, A.M.; SWICK, A.; ROMSOS, D.R. Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. **Am J Physiol**, v.277, n.3 Pt.2, p.R742-7, 1999.
- MOSCHOS, S.; CHAN, J.L.; MANTZOROS, C.S. Leptin and reproduction: a review. **Fertil Steril**, v.77, n.3, p.433-44, 2002.
- MUNZBERG, H.; FLIER, J.S.; BJORBAEK, C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. **Endocrinology**, v.145, n.11, p.4880-9, 2004.
- MUNZBERG, H.; MORRISON, C.D. Structure, production and signaling of leptin. **Metabolism**, v.64, n.1, p.13-23, 2015.

NISWENDER, K.D. et al. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. **Diabetes**, v.52, n.2, p.227-31, 2003.

OH, S.S.; KAPLAN, M.L. Early treatment of obese (ob/ob) mice with triiodothyronine increases oxygen consumption and temperature and decreases body fat content. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.207, n.3, p.260-7, 1994.

PALMITER, R.D. et al. Life without neuropeptide Y. **Recent Prog Horm Res**, v.53, p.163-99, 1998.

PAZ-FILHO, G.J. The Effects of Leptin Replacement on Neural Plasticity. **Neural Plast**, v.2016, p.8528934, 2016.

PAZ-FILHO, G.J. et al. Leptin replacement improves cognitive development. **PLoS One**, v.3, n.8, p.e3098, 2008.

PELLEYMOUNTER, M.A. et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v.269, n.5223, p.540-3, 1995.

PINTO, S. et al. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. **Science**, v.304, n.5667, p.110-5, 2004.

POCAI, A. et al. Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. **Diabetes**, v.54, n.11, p.3182-9, 2005.

QIAN, S. et al. Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. **Mol Cell Biol**, v.22, n.14, p.5027-35, 2002.

QUENNELL, J.H. et al. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. **Endocrinology**, v.150, n.6, p.2805-12, 2009.

RAMOS-LOBO, A.M.; DONATO, J., JR. The role of leptin in health and disease. **Temperature (Austin)**, v.4, n.3, p.258-291, 2017.

RAVELLI, G.P.; STEIN, Z.A.; SUSSER, M.W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **N Engl J Med**, v.295, n.7, p.349-53, 1976.

RAVUSSIN, E. et al. Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. **N Engl J Med**, v.318, n.8, p.467-72, 1988.

ROHNER-JEANRENAUD, F.; JEANRENAUD, B. Obesity, leptin, and the brain. **N Engl J Med**, v.334, n.5, p.324-5, 1996.

SCHLOGL, M. et al. Energy Expenditure Responses to Fasting and Overfeeding Identify Phenotypes Associated With Weight Change. **Diabetes**, v.64, n.11, p.3680-9, 2015.

SCHWARTZ, M.W. et al. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes**, v.45, n.4, p.531-5, 1996.

SCHWARTZ, M.W.; TSCHOP, M.; ZELTSER, L.M. A mother's influence on metabolic disorders. **Nat Med**, v.20, n.3, p.244-5, 2014.

SCOTT, M.M. et al. Leptin targets in the mouse brain. **J Comp Neurol**, v.514, n.5, p.518-32, 2009.

SENA, A.; SARLIEVE, L.L.; REBEL, G. Brain myelin of genetically obese mice. **J Neurol Sci**, v.68, n.2-3, p.233-43, 1985.

SEUFERT, J.; KIEFFER, T.J.; HABENER, J.F. Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, n.2, p.674-9, 1999.

STANLEY, B.G. et al. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. **Peptides**, v.7, n.6, p.1189-92, 1986.

STE MARIE, L. et al. A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.97, n.22, p.12339-44, 2000.

STEPPAN, C.M.; SWICK, A.G. A role for leptin in brain development. **Biochem Biophys Res Commun**, v.256, n.3, p.600-2, 1999.

TAPIA-ARANCIBIA, L. et al. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. **Front Neuroendocrinol**, v.25, n.2, p.77-107, 2004.

TARTAGLIA, L.A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v.83, n.7, p.1263-71, 1995.

UDAGAWA, J. et al. Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. **Congenit Anom (Kyoto)**, v.47, n.3, p.77-83, 2007.

VAISSE, C. et al. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. **Nat Genet**, v.14, n.1, p.95-7, 1996.

VAN DE WALL, E. et al. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. **Endocrinology**, v.149, n.4, p.1773-85, 2008.

VAN DER KROON, P.H.; SPEIJERS, G.J. Brain deviations in adult obese-hyperglycemic mice (ob/ob). **Metabolism**, v.28, n.1, p.1-3, 1979.

VOGT, M.C. et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. **Cell**, v.156, n.3, p.495-509, 2014.

VOOIJIS, M.; JONKERS, J.; BERNIS, A. A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. **EMBO Rep**, v.2, n.4, p.292-7, 2001.

WEBER, P.; METZGER, D.; CHAMBON, P. Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in the mouse brain. **Eur J Neurosci**, v.14, n.11, p.1777-83, 2001.

WILLIAMS, K.W. et al. Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. **J Neurosci**, v.30, n.7, p.2472-9, 2010.

XU, Y. et al. PI3K signaling in the ventromedial hypothalamic nucleus is required for normal energy homeostasis. **Cell Metab**, v.12, n.1, p.88-95, 2010.

YU, W.H. et al. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. **Endocrinology**, v.138, n.11, p.5055-8, 1997.

ANEXOS

Aprovação Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA)

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@ich.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 137 nas fls. 12 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 "*Estudo das funções da leptina no período neonatal e na infância em camundongos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Angela Maria Ramos Lobo, Thais Zampieri, Isadora Clivatti Furigo, João Alfredo Bolivar Pedroso, Vanessa Sayuri Nagaishi, Amanda de Alencar e a especialista de Laboratório Ana Maria P. Campos**, 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 **14.11.2013, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 18 de novembro de 2013.

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

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

Artigo 1

TEMPERATURE
2017, VOL. 4, NO. 3, 258–291
<https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1327003>

COMPREHENSIVE REVIEW

The role of leptin in health and disease

Angela M. Ramos-Lobo and Jose Donato Jr.

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT

Leptin is a master regulator of energy balance and body adiposity. Additionally, leptin exerts important control on glucose homeostasis, thermogenesis, autonomic nervous system and neuroendocrine axes. In metabolic diseases, such as obesity and diabetes mellitus, leptin signaling may be compromised, indicating the important role of this hormone in the etiology and pathophysiological manifestations of these conditions. In the present manuscript, we reviewed important concepts of leptin signaling, as well as about the effects of leptin on several biologic functions. We also discussed the possible therapeutic use of leptin administration and how our current obesogenic environment contributes to the development of leptin resistance. Our objective was to provide a comprehensive and state-of-the-art review about the importance of leptin to maintain the homeostasis and during pathological conditions.

ARTICLE HISTORY

Received 21 December 2016
Revised 27 April 2017
Accepted 2 May 2017

KEYWORDS

Hypothalamus; food intake;
energy balance; obesity;
diabetes

Leptin is a 16-kDa peptide hormone produced mainly by adipocytes, although other tissues and organs, such as mammary gland, ovary, skeletal muscle, stomach, pituitary gland and lymphoid tissue may produce lower amounts, possibly for local action.¹ Leptin is secreted proportionally to the mass of adipose tissue, thereby representing an important marker of energy storage. The adipocyte-derived leptin secretion displays a circadian profile, with highest levels at night and lowest levels at daytime in humans.² Leptin secretion also has a marked sexual dimorphism, with higher serum leptin concentration in women at any level of adiposity.³ Several hormones modulate leptin secretion. For example, insulin induces leptin secretion,^{4,5} whereas cortisol displays an inverse circadian rhythm.⁶

Remarkably, the physiologic role of leptin started to be studied before the discovery of leptin itself. This unusual situation was possible because spontaneous mutations generated leptin and leptin receptor (LepR; also known as Ob-R) deficient mice decades before the identification of their mutations.^{7–9} The first description of the leptin deficient mouse occurred in 1950 and this mouse strain was named as *ob/ob* because of its morbid

obese phenotype.¹⁰ In 1966, another mutation was described in an inbred strain of mouse that was characterized by a metabolic disturbance resembling diabetes mellitus. Consequently, homozygous mutants were named as *db/db* because they carried the *diabetes* gene.⁹ Years later, Coleman and colleagues through parabiosis experiments came to the conclusion that the obesity of *ob/ob* mice was likely caused because they lacked a circulating factor, whereas the phenotype of *db/db* mice was possibly caused by the lack of the receptor for that factor.^{7,8,11–13} It turned out that Coleman and colleagues were right, and in 1994 Jeffrey Friedman's group discovered that the *ob* gene encodes the hormone leptin.¹⁴ In two separated papers, the *Lepr* gene was identified and demonstrated that LepR is encoded by the *db* gene.^{15,16}

Growing literature shows that not only leptin is a master regulator of energy balance, but it also modulates glucose homeostasis, neuroendocrine axes, autonomic nervous system, memory, neural plasticity, and other biologic functions. The objective of this manuscript is to provide a comprehensive review about the effects of leptin on several biologic functions, its mechanisms of action and how leptin is related to several diseases, such as obesity and diabetes mellitus.

The biology of leptin

Leptin receptor and signaling pathways

Leptin acts by binding to its membrane receptor, which is expressed in many tissues. Through an expression cloning strategy, six LepR isoforms were identified (LepRa-f).¹⁵ Although all six LepR isoforms share a common extracellular ligand-binding domain at the N-terminus, they differ in their intracellular domain, and therefore in their physiologic role. LepRe lacks the transmembrane domain, representing a soluble LepR isoform. Thus, LepRe is a leptin-binding protein and possibly regulates leptin biologic activity by removing it from circulation.¹⁷ LepRa, a short isoform of the receptor, is abundantly expressed in the choroid plexus, and has been hypothesized to be implicated in leptin transport into the central nervous system (CNS) through the blood-brain barrier (BBB).¹⁸ Only the long isoform (LepRb or Ob-Rb) contains all intracellular motifs required for complete activation of the intracellular signaling pathways. LepRb is predominantly expressed in the CNS and is essential for leptin action.¹⁹⁻²² Consequently, this isoform is responsible for the main biologic effects of leptin. The obese mouse model known as *db/db* lacks exclusively the LepRb, and its phenotype is similar to mutants that have no LepR isoforms (*db^{3j}* mutation).²³ LepR belongs to the family of class 1 cytokine receptors with many similarities to the interleukin (IL)-6 receptor. This type of receptor does not contain intrinsic tyrosine enzymatic activity but signals via an associated tyrosine kinase protein from the Janus kinase family (JAK) (Fig. 1). When leptin binds to LepRb, JAK2 is recruited, activated and promotes autophosphorylation and phosphorylation of three tyrosine residues of LepRb (Y985, Y1077 and Y1138). These phosphorylated tyrosine residues act as docking sites for downstream signaling molecules, representing a Src homology 2 (SH2)-binding motif that recruits specific SH2-containing effector proteins to mediate subsequent intracellular signaling.²⁴ The major signaling pathway recruited by leptin is the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), which depends on the phosphorylation of Y1138.^{25,26} STAT3 is a transcription factor and after phosphorylation STAT3 migrates to the nucleus where the expression of target genes will be transcriptionally regulated. When the Y985 residue of LepR is phosphorylated, Src homology 2-containing tyrosine phosphatase

(Shp2; encoded by *Ptpn11* gene) is recruited to LepR, leading to the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK) signaling pathway (Fig. 1).²⁴ Y985 is also a binding site for the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), which is a protein that exerts inhibitory effects on leptin signaling. Since SOCS3 transcription is dependent on leptin signaling through STAT3, it exerts its inhibition via a classic negative feedback way. Finally, phosphorylation of Y1077 recruits STAT5. Although the activation of STAT5 is mainly dependent on the Y1077 residue, STAT5 can also be activated by phosphorylation on Y1138.²⁷ STAT5 pathway is more related to metabolic functions controlled by other cytokines like growth hormone (GH) and prolactin.²⁸ However, STAT5 pathway mediates some of the effects of leptin on the regulation of energy balance and reproduction (Fig. 1).^{28,29}

Another signaling pathway activated by leptin is the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). PI3K is a major signaling pathway for insulin and other growth factors in peripheral tissues as well as the CNS.³⁰ JAK2 phosphorylates insulin receptor substrates (IRS) leading to PI3K activation (Fig. 1). Unlike the JAK/STAT pathway, which acts through gene expression regulation, PI3K can produce fast cellular responses by promoting changes in ion channels and thereby in cell activity.³¹

For many years it was challenging to identify leptin-responsive cells. Antibodies against LepR produce poor staining frequently leading to false-positive or false-negative results.^{32,33} The use of radiolabeled leptin to identify binding sites was not able to identify many brain areas that also contain LepR expression.¹⁵ Furthermore, the LepR mRNA levels are commonly low in many brain areas, which makes it difficult the precise identification of LepR-expressing cells.³⁴⁻³⁹ Due to these limitations, many studies begun to identify leptin-responsive cells via the activation of its signaling pathways. Therefore, STAT3 phosphorylation (pSTAT3) after an acute leptin stimulus became a popular marker to identify leptin-responsive cells (Fig. 2).^{25,40-42} Additionally, STAT3 phosphorylation is also widely used as a way to evaluate leptin sensitivity.⁴³⁻⁴⁶

The physiologic role of leptin

The word leptin is derived from the Greek root *leptós* that means thin. The choice of Friedman's group to name the hormone leptin was based on the first

Figure 1. Leptin signaling pathways. Scheme summarizing the main intracellular pathways activated by the long-form of leptin receptor (LepR). Abbreviations: PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; IRS, insulin receptor substrate; JAK2, janus kinase 2; STAT, signal transducer and activator of transcription; SOCS3, suppressor of cytokine signaling-3; PTP1B, phosphotyrosine phosphatase 1B; SHP-2, src-homology-2 containing phosphotyrosine phosphatase 2; MAPK, mitogen-activated-protein-kinase; Raf, raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; Ras, family of small GTPase; ERK1/2, Extracellular signal-regulated kinases; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; PDK-1, phosphoinositide-dependent kinase-1; AKT, ak strain transforming/protein kinase FOXO-1, forkhead box protein O1.

studies that infused leptin in mice and observed a significant reduction in their body weight and adiposity.⁴⁷ Although these earlier studies may indicate that leptin could have an application in the treatment of obesity, latter evidence demonstrated that most cases of obesity are characterized by excess of leptin and leptin resistance.⁴⁸ Only in rare cases of obesity caused by congenital deficiency (similar to the *ob/ob* model) leptin treatment was a useful tool to revert obesity.^{49,50}

The deficiency of leptin or LepR produces a very characteristic phenotype of hyperphagia, morbid obesity and insulin resistance.⁵¹ As described above, leptin treatment in *ob/ob* mice reversed their obese phenotype, which led to the conclusion that the physiologic role of leptin is to reduce the body weight and food intake.⁴⁷ However, over the years, many studies have shown that leptin's role is in fact much more complex, given its participation in many other physiologic functions, from neuronal development and plasticity, memory and cognition, glucose homeostasis,

reproduction and metabolic programming, which will be detailed across this review.^{52,53} For some authors, leptin's biologic role is not to make an animal thin, as originally described, but to act as a signal to the brain to convey the energy status of the body and thereby modulate energy-demanding functions to maintain homeostasis.⁵⁴ In response to fasting, leptin levels decrease intensively, more than expected by the changes in body adiposity. This rapid reduction in leptin levels coordinates profound alterations in the metabolism and neuroendocrine axes that will save energy to ensure survival during conditions of negative energy balance. Falling in leptin levels can also trigger behaviors that will increase the search for food. When leptin is supplemented in fasted individuals, starvation-induced changes are attenuated.⁵⁵⁻⁵⁷ Therefore, leptin's main physiologic role is likely to promote survival, via neuroendocrine, behavioral and metabolic adaptations to preserve energy and increase food intake in situations of negative energy balance.

Figure 2. Distribution of leptin responsive neurons in the mouse mediobasal hypothalamus. Leptin-responsive cells could be visualized by the phosphorylation of STAT3 (black nuclear staining) 90 min after an acute peritoneal injection of mouse recombinant leptin (10 μ g/g body weight). Abbreviations: ARH, arcuate nucleus of hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of hypothalamus; LHA, lateral hypothalamic area; VMH, ventromedial nucleus of hypothalamus; VMHdm, dorsomedial part of the VMH; VMHvl, ventrolateral part of the VMH.

Because in nature is more common the need of survival mechanisms in situations of undernutrition, leptin elicits more robust physiologic responses when its levels are low (conveying a signal of low levels of energy stocks), differently than when its levels are increased (like in obesity), a rare situation in nature (reviewed in Leibel⁵⁸).

Food intake

Leptin plays a pivotal role regulating food intake. *Ob/ob* and *db/db* mice exhibit a marked hyperphagic behavior.⁴⁷ Leptin infusion, either peripherally or centrally, produces a significant suppression in food intake in *ob/ob* and wild-type animals, but not in *db/db* mice.^{47,51,59,60} A robust voluntary reduction in energy intake is also achieved in leptin-deficient humans chronically treated with leptin.^{50,61} Several intracellular signaling pathways mediate the effects of leptin on food intake. While disruption of *LepR/STAT3* pathway produces hyperphagia, pharmacological or genetic disruption of the *PI3K* pathway prevents the suppression of food intake in the 24 h following leptin administration.^{62,63}

Although different neuronal populations are likely responsible to mediate leptin's effects on food intake, the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) is certainly an important area.⁶⁴ In the ARH, leptin acts at least in two distinct neuronal populations to affect food intake. Neurons that co-express the proopiomelanocortin (POMC) prohormone and the cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) are responsive to leptin.^{36,65} ARH POMC/CART neurons are activated by leptin and these cells normally inhibit food intake.^{66–68} This occurs because CART has anorexigenic effects,⁶⁹ whereas POMC is cleaved in different peptides, including α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), which is able to activate melanocortin receptors 3 and 4 (MC3R/MC4R) leading to increased satiety.⁷⁰ MC4R ablation reproduces many of the metabolic aspects observed in *db/db* mice, including their morbid obesity and hyperphagia.⁷¹ Anatomically, POMC neurons are found predominantly in the lateral ARH (Fig. 3A).⁷² On the other hand, located in the ventromedial ARH (close to the third ventricle and median eminence), neurons that co-express the neuropeptide Y (NPY), the agouti-related protein (AgRP) and the amino acid GABA are inhibited by leptin (Fig. 3A).⁷³ The NPY/AgRP/GABA neurons are potent inducers of food intake due to several reasons.^{74,75} NPY is one of most powerful orexigenic neuropeptides as demonstrated by the robust feeding produced by intracerebroventricular NPY injections.⁷⁶ AgRP is an inverse agonist of MC3R/MC4R. Consequently, AgRP blocks the capacity of α -MSH to activate MC3R/MC4R, which also leads to an increase in food intake.^{70,77} Finally, several pieces of evidence also indicate that the inhibitory GABAergic transmission of these neurons is important to modulate neural circuits involved in feeding behavior.^{75,78,79} Therefore, via a relationship of antagonism,⁷⁷ POMC/CART and NPY/AgRP/GABA neurons form the central melanocortin system controlling the activity of second-order neurons that typically express the MC4R. It is worth mentioning though that although leptin exerts important effects on POMC/CART and NPY/AgRP/GABA neurons,⁸⁰ many pieces of evidence indicate that leptin must act on multiple neuronal populations and neurocircuits to properly regulate food intake and energy balance. For instance, disruption of *LepR* expression exclusively in POMC/CART or NPY/AgRP/GABA neurons produces relatively modest effects on food intake and energy

Figure 3. Hypothalamic distribution of key neuronal populations involved in the regulation of energy balance. (A) AgRP neurons in the ARH are located close to the third ventricle and median eminence, whereas POMC neurons are predominantly in the lateral ARH. POMC neurons were visualized by immunostaining β -endorphin peptide, while AgRP neurons were visualized using a reporter mouse that express the tdTomato fluorescent protein under the *AgRP* promoters. (B) PVH receives dense projections from LepR/AgRP neurons. Green fibers were visualized by immunostaining AgRP peptide, whereas axons from LepR-expressing neurons were visualized using a reporter mouse that express the tdTomato fluorescent protein under the *LepR* promoters, as previously shown.⁸⁶ Note the extensive colocalization (yellow color). (C, D) MCH (C) and orexin (D) neurons represent a segregate neuronal population in the LHA and do not express LepR. MCH and Orexin neurons were immunostained using specific antisera, whereas LepR-expressing neurons were visualized using a reporter mouse that express the tdTomato fluorescent protein under the *LepR* promoters. Abbreviations: 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of hypothalamus; fx, fornix; LHA, lateral hypothalamic area; ME, median eminence; PVH, paraventricular nucleus of the hypothalamus; VMH, ventromedial nucleus of hypothalamus. Scale bar: A–B = 100 μ m; C–D = 200 μ m.

balance,^{81,82} which markedly contrasts with the profound impact in the energy homeostasis caused by the complete ablation of NPY/AgRP/GABA neurons (via diphtheria toxin) or by the lack of MC4R.^{71,83}

The paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH) is an important brain structure that receives dense projections from either POMC/CART or NPY/AgRP/GABA neurons (Fig. 3B).^{84–86} Expression of MC4R exclusively in PVH neurons can rescue the increased food intake observed in *Mc4r* null mice.⁸⁴ During calorie-restricted conditions, ARH NPY/AgRP/GABA neurons are strongly activated as demonstrated by an increased intrinsic action potential frequency.⁸⁷ The increased activity of ARH NPY/AgRP/GABA neurons is mediated by the decreased levels of anorexigenic hormones, such as leptin, while the orexigenic hormone ghrelin activates these cells.⁸⁸ However, recent evidence also indicates that PVH neurons can provide a potent excitatory input to ARH NPY/AgRP/GABA

neurons during fasting, representing another way to produce hunger in calorie-restricted conditions.^{89,90} Consequently, there is a reciprocal regulation between ARH and PVH neurons to control food intake.

Other brain structures also interact directly to ARH neurons to control feeding. For example, NPY/AgRP/GABA neurons project to the parabrachial nucleus (PBN) which in turn regulates neurons in the amygdala to control food intake. This circuit is especially important in conditions when it is unfavorable to eat, such as after severe overfeeding or during illness.^{78,91,92} The lateral hypothalamic area (LHA) receives projections from different populations of LepR-expressing neurons, and it is also a critical structure that regulates feeding.⁹³ Neurons that express the neuropeptides melanin-concentrating hormone (MCH) or orexin (also known as hypocretin) are found in the LHA and these cells stimulate feeding, although they do

not express the LepR (Fig. 3C and D).⁹⁴ On the other hand, LepR expression in the LHA is found in neurotensin-positive neurons, and LepR ablation in these cells increases food intake.⁹⁵ Leptin acts in LHA neurotensin neurons leading to an inhibition of orexin neurons.⁹⁶ Neurotensin receptor-1 disruption promotes hedonic feeding.⁹⁷

The ability of leptin to regulate feeding depends on several neuronal populations and neurocircuits. Pharmacogenetic activation of LepR-expressing neurons in the median preoptic area (MPO) induces a robust suppression of food intake in mice.⁹⁸ Dopamine neurons in the ventral tegmental area (VTA) express the LepR as well.^{99,100} Direct administration of leptin to the VTA decreases food intake.⁹⁹ Additionally, long-term RNAi-mediated knockdown of LepR in the VTA strengthens the sensitivity to highly palatable food and increases food intake.⁹⁹ Leptin also modulates the activity of urocortin 1 neurons in the Edinger–Westphal (EW) nucleus.¹⁰¹ Since urocortin 1 produces anorexigenic effects, this particular neuronal population may mediate some of the leptin's effects on food intake.¹⁰¹ LepR expression is also found in brain-stem neurons, including cells of the nucleus of the solitary tract (NTS),^{102–104} which is an important sensory relay from the upper gastrointestinal tract. LepR-expressing cells in the NTS co-express different neurochemical markers including POMC, cholecystikinin (CCK) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1).¹⁰⁵ Selective inactivation of LepR in Phox2b positive cells causes LepR deletion in NTS GLP-1 neurons.¹⁰⁶ This genetic manipulation generates mice that display increased food intake after fasting, indicating that leptin action on GLP-1 neurons also controls food intake.¹⁰⁶ In line with these findings, RNAi-mediated knockdown of LepR in NTS resulted in hyperphagia for chow, high-fat or high-sucrose diets, leading to an increase in body weight and adiposity.¹⁰⁷ Recent evidence also suggests that leptin signaling in non-neuronal cells regulates feeding. Astrocyte-specific LepR deficiency leads to increased food intake.¹⁰⁸ Overall, leptin possibly acts in neurons located in the ARH, LHA, MPO, VTA and NTS, as well as in non-neuronal cells to control different aspects of feeding behavior. Fig. 4 summarizes the participation of different brain nuclei in the multiple physiologic functions regulated by leptin signaling.

Energy expenditure and thermogenesis

It is well known that leptin affects the energy balance not only through the modulation of food intake, but it also has potent effects on energy expenditure. *Ob/ob* and *db/db* mice have high metabolic efficiency because of low energy expenditure.^{51,109} These defects can be corrected by leptin replacement only in *ob/ob* mice.⁵¹ Similarly to food intake, the regulation of energy expenditure by leptin depends on multiple neuronal populations. Conditional deletion of LepR from POMC cells leads to obesity without affecting food intake.⁸¹ Actually, these mutants exhibit a tendency toward low energy expenditure.⁸¹ In accordance with these findings, selective expression of LepR only in POMC cells produces no change in food intake, while the low energy expenditure observed in LepR-deficient mice is significantly rescued.¹¹⁰ Ablation of LepR only in AgRP neurons or simultaneously in POMC and AgRP cells does not affect food intake in adult mice, although these animals develop obesity, suggesting an alteration in energy expenditure.⁸² Accordingly, the

Figure 4. Brain distribution of LepR-expressing neurons and their known biologic functions regarding leptin signaling. Abbreviations: ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; DMH, dorsomedial nucleus of the hypothalamus; EW, Edinger–Westphal nucleus; Hip, hippocampus; LHA, lateral hypothalamic area; MPO, medial preoptic area; NTS, nucleus of the solitary tract; PBN, parabrachial nucleus; PMv, ventral premammillary nucleus; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus; VTA, ventral tegmental area.

low energy expenditure of *ob/ob* mice is partially improved in NPY-deficient animals.¹¹¹

The ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) is also an important structure involved in the energy balance regulation. Since steroidogenic factor-1 (SF1)-positive neurons are found only in the VMH, SF1 became a marker to induce genetic manipulations in this nucleus. Mice carrying a selective deletion of LepR in SF1 cells show a similar degree of obesity compared with POMC specific LepR ablation.^{112,113} Notably, this obese phenotype occurs in the absence of changes in food intake. However, SF1 specific LepR knockout mice exhibit an attenuated thermogenic response to high-fat diet (HFD).^{112,113} Several reports have demonstrated that leptin action in the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH) increases sympathetic tone to brown adipose tissue (BAT) and interscapular BAT temperature.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Acute cold exposure induces c-Fos in DMH LepR-expressing neurons.¹¹⁵ Disruption of LepR selectively in DMH neurons causes obesity, reduces the energy expenditure and blocks thermogenic responses to leptin, without affecting food intake.^{116,117} Besides regulating food intake, MPO LepR-expressing neurons are also involved in temperature-dependent body weight homeostasis.^{98,115} This specific population innervates sympathetic BAT circuits.¹¹⁵ Activation of MPO LepR-expressing neurons suppresses energy expenditure leading to a reduction in body temperature.⁹⁸

It is worth mentioning that leptin can regulate energy expenditure not only by changes in autonomic nervous system, but also through neuroendocrine mechanisms. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons in the PVH are master regulators of the thyroid gland function, whose hormones exert profound impact in the cellular metabolism and consequently in energy expenditure. PVH TRH neurons receive projections from ARH LepR-expressing neurons (Fig. 3B).^{118,119} During calorie-restricted conditions, the reduction in leptin levels coordinates endocrine and metabolic changes to save energy, which includes suppression of TRH, thyroid-stimulating hormone and thyroid hormones.^{55,57} Infusion of either α -MSH or CART is able to prevent fasting-induced suppression of TRH mRNA levels in the PVH.¹¹⁸⁻¹²¹ Therefore, leptin signaling in ARH neurons controls neuroendocrine cells of the PVH to regulate thyroid axis according to nutritional status.

Ob/ob mice exhibit a reduced body temperature, and in the past this phenotype was thought to be the result of lower energy expenditure.¹²²⁻¹²⁴ However, recent findings indicate that leptin actually acts centrally to modulate thermoregulatory mechanisms raising the defended body temperature and/or reducing thermal conductance.^{125,126} BAT is the main organ that produces heat by increasing energy expenditure. BAT expresses the uncoupling protein 1 (UCP1), a mitochondrial channel that uncouples the proton motive force of the respiratory chain from ATP production to heat production.¹²⁷ BAT is innervated by the sympathetic nervous system and the activation of UCP1 is mainly regulated by β 3-adrenergic receptors.¹²⁸ Rats treated with leptin showed increased oxygen consumption and UCP1 mRNA expression, and this response is elevated after fasting.¹²⁹ In the past, it was believed that BAT's function was critical only in small rodents; however, nowadays we know that BAT is present and functional in adult humans as well and became a potential target for obesity treatment.¹³⁰ Genetic approaches enhancing leptin and insulin signaling in POMC neurons increase white adipose tissue browning and energy expenditure, conferring a protection against diet-induced obesity (DIO).¹³¹ In addition, the absence of hypothalamic insulin and leptin receptors maintains a lower body temperature (at 20–22 °C) than when either of the receptors is removed independently.¹³²

Since endotherms need to maintain their internal body temperature, a process that demands large amounts of energy, during fasting conditions small endotherms may enter a status of daily torpor, thereby suppressing their metabolic rate together with a fall of core temperature lasting for a period of several hours.¹³³ This event can also be present in situations of low energy sources or in a low temperature ambient.¹³⁴ Evidence in literature shows that the critical factor that determines the moment of entering torpor is the achievement of a critical low body mass, which drives the decrease in daytime core temperature in both DIO and lean mice facing fasting.¹³⁵

Since leptin's structure resembles a cytokine, it is not surprising that leptin has an important role in the immune system. Leptin levels increase during infections, inflammations or lipopolysaccharide (LPS) exposure as a part of the host immune response (Fig. 5). This change is mediated by IL1- β .¹³⁶ Evidence in animal models has demonstrated

that systemic inflammation caused by LPS leads to increased circulating leptin,^{137,138} and the peak of leptin is preceded by an increase in tumor necrosis factor (TNF)- α , which by itself is also capable of increasing leptin circulating levels.¹³⁹ Systemic inflammation and sepsis are closely related to changes in body temperature, both in animals and humans.^{140,141} Systemic inflammation is commonly followed by fever; however, in some situations it can evoke hypothermia.¹⁴² In animals, the response to LPS depends on the dose given and the environment temperature. In thermoneutral environment, fever is the predominant response. Low doses of LPS induce monophasic fever, which turns into polyphasic fever when the dose is increased.¹⁴³ However, if a high dose of LPS is given in a low temperature environment, the response changes to hypothermia.¹⁴⁴ Evidence shows that fever is a predominant response for mild stimuli, whereas hypothermia is a natural response for stronger inflammatory injuries.¹⁴⁵ A major regulator for these responses is TNF- α that, depending on the dose, can be thermogenic or cryogenic. LepR KO rats (Koletsky *f/f*) have the same fever response to low doses of LPS as wild-type rats, but when treated with high doses of LPS express a severe hypothermia that lasts longer, associated with increased levels of TNF- α . A possible explanation for the TNF- α increase in LepR KO rats is the fact that they are unable to fully activate their hypothalamic-pituitary-adrenal axis which has anti-inflammatory actions in response to LPS, and therefore leptin seems to be important to recover from hypothermia induced by LPS.¹⁴⁶ Further evidence for this point is that *ob/ob* mice do not activate their hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to LPS, compared with wild-type animals.^{147,148} In

leptin responsive animals, stimuli that normally evoke highly febrile responses in fed animals result in hypothermia or low fever when the animals are fasted and they show elevated TNF- α levels.¹⁴⁹⁻¹⁵² This is suggested to be related to low levels of leptin in fasted animals, because of the similar response observed in leptin-irresponsible rats (Koletsky *f/f*) (reviewed in refs.^{153,154}).

In DIO rats, in which leptin levels were blocked with specific antiserum, the later phases of the fever response were attenuated. Thus, leptin was suggested to play an important role modulating the late phase of the fever response to LPS in obese animals.¹⁵⁵ Higher levels of circulating leptin in old rats were associated with enhanced duration and degree of symptoms after LPS injection together with prolonged fever compared with young rats, showing that leptin has a role in age-dependent febrile responses to inflammation.¹⁵⁶

Another phenomenon that can alter the regulation of body temperature is the psychological stimulated hyperthermia, both in animals and humans. This condition increases BAT thermogenesis¹⁵⁷ and can be diminished by systemic administration of a β 3-adrenoceptor antagonist in rats.¹⁵⁸ However, the physiologic mechanisms involved in the hyperthermia induced by psychological stress are different from those involved in LPS-induced fever.¹⁵⁹

In summary, leptin signaling in the ARH (POMC and AgRP/NPY neurons), VMH, DMH and MPO modulates the autonomic nervous system or endocrine axes leading to changes in energy expenditure and thermogenesis. Therefore, the powerful effects of leptin on the energy balance depend on a simultaneous regulation of food intake and energy expenditure. Furthermore, there is also evidence that leptin regulates immune responses, as well as body temperature through the modulation of central

Figure 5. Physiological responses to systemic inflammation. Scheme summarizing changes in body temperature, behavior and secreted factors after LPS-induced inflammation as well as the leptin's role in the recovery of febrile or hypothermic processes.

thermoregulatory mechanisms. Fig. 5 summarizes the physiologic responses to systemic inflammation and the role of leptin in the recovery of febrile or hypothermic processes.

Regulation of cardiovascular functions via autonomic nervous system

Recent reports indicate that DMH LepR-expressing cells also control blood pressure.¹⁶⁰ Interestingly, leptin or LepR deficiency protects against hypertension, despite the morbid obese phenotype caused by these mutations. Additionally, increased leptin levels in DIO promotes increased blood pressure in rodents, which is an effect likely mediated by DMH neurons.^{114,160} The same protection against obesity-induced hypertension is observed in MC4R deficient mice, which indicates the involvement of the central melanocortin system in this dysfunction.¹⁶¹ Accordingly, MC4R expression in cholinergic neurons, which include sympathetic and parasympathetic preganglionic neurons, restores obesity-associated hypertension in MC4R deficient mice.¹⁶² Additionally, exclusive MC4R expression in cholinergic neurons is sufficient to normalize the energy expenditure abnormalities exhibited by MC4R deficiency, without affecting food intake.¹⁶³ Thus, leptin acts via the melanocortin system and DMH LepR neurons to regulate blood pressure through the modulation of the autonomic nervous system.^{160,161,164}

Glucose homeostasis

Glucose homeostasis is regulated by brain leptin signaling, independently of its effects on adiposity. For example, leptin infusion at low doses that does not affect body weight is able to correct the hyperglycemia and hyperinsulinemia of *ob/ob* mice.⁵¹ Additionally, genetic manipulation that increases leptin sensitivity in LepR-expressing cells does not prevent DIO, but protects mice from obesity-induced insulin resistance.¹⁶⁵ Since adiposity plays a major role contributing to insulin resistance, it is sometimes difficult to determine whether leptin signaling in a specific brain structure directly controls glucose homeostasis or if the observed effects are secondary to changes in body weight and adiposity. However, there is solid evidence that some specific neuronal populations are particularly important to mediate leptin's effects on glucose homeostasis. Unilateral LepR reactivation in the

ARH of otherwise LepR-deficient mice produces modest effects on body weight and adiposity, although this manipulation causes marked improvements in hyperinsulinemia and blood glucose levels.⁶⁴ Leptin signaling in POMC neurons probably explains much of these effects, since selective expression of LepR only in POMC cells also produces robust improvements in the hyperinsulinemia and hyperglycemia of LepR-deficient mice, even though it causes small effects on body weight and adiposity.^{110,166} In accordance with the role of the central melanocortin system controlling glucose homeostasis, Rossi et al.¹⁶³ found that, compared with MC4R deficient mice, re-expression of MC4R in cholinergic neurons (autonomic sympathetic and parasympathetic preganglionic neurons) produces expressive improvements in glucose control, insulin sensitivity and insulin-mediated suppression of hepatic glucose production. Interestingly, restoration of MC4R expression in the dorsal motor nucleus of the vagus (DMX), which is composed of parasympathetic preganglionic neurons, attenuates the hyperinsulinemia, but does not normalize the hyperglycemia of MC4R deficient mice, suggesting that the melanocortin system probably influences both sympathetic and parasympathetic branches to regulate different aspects of glucose homeostasis.^{162,163}

There is some evidence that leptin signaling in VMH neurons also regulates glucose homeostasis. For example, selective inactivation of SOCS3 in SF1 cells increases leptin sensitivity, leading to an improvement of glucose homeostasis, without affecting body weight.¹⁶⁷ VMH is a key area involved in counter-regulatory responses to hypoglycemia.¹⁶⁸ Excitatory glutamatergic transmission from VMH neurons is required to prevent fasting-induced hypoglycemia.¹⁶⁹ A neurocircuit between brainstem and VMH was recently described to control counter-regulatory responses to hypoglycemia. In this circuit, leptin-responsive cells in the lateral PBN express CCK and are inhibited by glucose. Leptin inhibits PBN CCK neurons and inactivation of LepR in CCK cells enhances counter-regulatory responses to hypoglycemia.^{170,171} PBN CCK neurons project to and regulate VMH SF1 cells via CCK release, and this neurocircuit is both necessary and sufficient for triggering counter-regulatory responses to hypoglycemia.^{168,170,171} Thus, several pieces of evidence indicate that leptin controls

sympathetic and parasympathetic nervous systems via the melanocortin system to regulate glucose homeostasis. PBN CCK neurons are also directly regulated by leptin to modulate counterregulatory responses to hypoglycemia via connections with VMH SF1 neurons.

Reproduction

Calorie-restricted conditions also suppress the reproductive axis and these effects are leptin dependent.^{55,57,172,173} Several studies investigated potential brain areas that could mediate leptin's effects on reproduction. Although LepR-expressing cells are located nearby gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons, there is no direct effect of leptin on these cells.¹⁷⁴ Consequently, interneurons are necessary to convey leptin signal to GnRH neurons. Kisspeptin (peptide encoded by the *Kiss1* gene) expressing neurons are required to sense estrogen levels to regulate GnRH neurons.¹⁷⁵ Although earlier reports identified LepR mRNA expression in Kisspeptin neurons,¹⁷⁶ more recent studies found a very limited LepR expression in these cells.^{177,178} Additionally, selective manipulation of LepR in Kisspeptin cells produced no significant impact on reproduction.^{177,179} On the other hand, neurons in the ventral premammillary nucleus (PMv) exhibit an abundant expression of LepR and play a critical role mediating leptin's effects on reproduction.^{180,181} PMv neurons project to GnRH cell bodies and fibers that reach median eminence, exerting an excitatory effect through their glutamatergic transmission.^{179,182,183} Excitotoxic lesions of the PMv in adult female rats disturb estrous cycle, the activation of GnRH neurons during the proestrus and GnRH and *Kiss1* mRNA expression at the night of proestrus.^{184,185} PMv-lesioned rats also failed to show the stimulatory effects of leptin on luteinizing hormone (LH) secretion during fasting.¹⁸⁵ The most substantial evidence that PMv neurons mediate the effects of leptin on reproduction came from studies that induced LepR-expression only in PMv neurons of otherwise LepR-deficient mice. In this study, unilateral re-activation of LepR in the PMv was sufficient to restore fertility, despite a complete absence of changes in body weight and food intake.¹⁷⁹

Besides the PMv, MPO LepR-expressing neurons also regulate reproduction. These cells are found close to GnRH neurons and release nitric oxide (NO).^{103,186} Neuronal NO synthase (nNOS) knockout mice are

unable to show the stimulatory effect of leptin on LH secretion, and pharmacological nNOS inhibition in the preoptic area prevents the restoration of fertility in leptin-treated *ob/ob* female mice.¹⁸⁶ NPY/AgRP neurons are also important targets of leptin to regulate reproduction. *Db/db* mice carrying inactivation in *Agrp* gene exhibit significant improvements in reproduction, including normal timing of vaginal opening and estrous cycling, as well as recovery in fertility.¹⁸⁷ In another study, NPY/AgRP neurons were ablated in *ob/ob* mice.¹⁸⁸ The authors reported a restoration in body weight, food intake and glucose tolerance to levels similar to wild-type mice. Interestingly, this manipulation recovered the fertility of either male or female *ob/ob*, indicating that under low leptin levels NPY/AgRP neurons exert an important inhibitory effect on reproductive axis.¹⁸⁸ Leptin probably acts on POMC/CART neurons to regulate reproduction as well. α -MSH is able to activate 70% of GnRH neurons, whereas approximately 15% of GnRH neurons are excited by CART.¹⁸⁹ Additionally, the combined inactivation of LepR and insulin receptor in POMC cells reduces the fertility in mice, elevates serum testosterone levels and causes ovarian abnormalities.¹⁹⁰ Therefore, the current evidence in the literature indicates that LepR-expressing neurons in the MPO, PMv and ARH (NPY/AgRP and POMC/CART cells) are able to sense leptin levels to modulate the onset of puberty and reproduction.

Locomotor activity, neuronal plasticity, development and other brain functions

The biologic effects of leptin extend beyond the regulation of energy balance and glucose homeostasis. There is plenty of information indicating that several behaviors and brain functions are regulated by leptin signaling. Voluntary locomotor activity is directly regulated by leptin signaling, independently of body weight changes. For example, *ob/ob* or LepR-deficient mice show reduced locomotor activity, which is not caused by their morbid obesity. Leptin signaling only in the ARH or specifically in POMC neurons can partially rescue the hypoactivity displayed by LepR-deficient mice.^{64,110,166} NPY/AgRP neurons also regulate locomotor activity since LepR ablation only in these cells causes decreased ambulatory activity compared with wild-type mice.⁸² Acute activation of MPO LepR-expressing neurons causes

suppression in locomotor activity.⁹⁸ However, the reduction in body temperature caused by the activation of MPO LepR neurons could impair locomotion.⁹⁸ Mice carrying LepR ablation in LHA neurotensin neurons exhibit decreased locomotor activity as well.⁹⁵ These animals show an altered regulation of orexin neurons and mesolimbic dopamine system, since they have lower fasting-induced activation of orexin neurons and reduced orexin expression in the LHA, as well as a blunted amphetamine-induced increase in locomotor activity.⁹⁵ As previously mentioned, leptin can directly regulate mesolimbic dopamine system through LepR-expressing cells in the VTA.¹⁰⁰ Knockdown of LepR in the VTA increases locomotor activity of rats.⁹⁹ In another study, LepR was selectively inactivated in dopamine neurons.¹⁹¹ These mice display anxiogenic-like behavior in the elevated plus-maze, light-dark box, social interaction and novelty suppressed feeding tests. However, depression-related behaviors were not affected by the lack of leptin signaling in dopamine neurons.¹⁹¹ Therefore, several leptin responsive neural populations are responsible to mediate leptin's effects on locomotor activity, including neurons in the ARH, MPO, LHA and VTA. In addition, the direct (through VTA) or indirect (through LHA) regulation of mesolimbic dopamine system allows leptin to control different behaviors, such as anxiety and preference to palatable foods.

Neuroplasticity is the process through which neural circuits adapt to variations in stimuli coming from the environment. Leptin-deficient mice have reduced brain mass and cortical brain volume,¹⁹² and they have an immature expression pattern of synaptic and glial proteins. Some of these defects cannot be reverted by leptin treatment at adulthood.¹⁹³ However, leptin treatment in adults with missense leptin mutations is able to increase gray matter concentration in the frontal cortex, left inferior parietal lobule and left cerebellum.¹⁹⁴

As described above, the most studied role of leptin is related to the regulation of body weight and food intake. However, this function does not begin until the first month of life in rodents. It was shown by Mistry and collaborators that leptin administration peripherally or centrally, even in high doses, has no impact in body weight, food intake or fat deposition until the first month of postnatal life.¹⁹⁵ This explains

why *ob/ob* and *db/db* mice express their obese phenotype only after that period. Therefore, leptin's role is possibly different in very young mice. Leptin is expressed in the fetus, but its production originates from diverse tissues since adipose tissue is minimal during this stage of development.¹⁹⁶ The majority of leptin-responsive neurons in adult brain are born in the first 2 weeks of embryonic life.¹⁹⁶ Leptin's transport into the brain through the LepRa is finely regulated since embryonic stage,¹⁹⁷ and leptin reaches the brain at a very young age.¹⁹⁸ Between postnatal days 6 and 14 there is a leptin surge, with concentrations significantly higher than the values exhibited in adult life.¹⁹⁹ To understand the physiologic role of this leptin surge, it is important to state that in mice and rats the hypothalamus begins to develop during mid-gestation and continues to develop during the first weeks of postnatal life.²⁰⁰ The development of the projections from ARH neurons to different hypothalamic nuclei coincides with the postnatal leptin surge, although it occurs at different moments, starting with the DMH (established by postnatal day 6, P6), whereas those to the PVH develop later, by P8–10, and finally the projections to the LHA are established by P16.^{85,201} Previous studies by Bouret and colleagues showed that leptin has an important trophic role in the mouse brain during the first weeks of life by regulating axon growth in specific neuronal populations. Consequently, *ob/ob* mice have fewer projections from the ARH to other brain regions, including the PVH. This deficiency could be reversed only when leptin was replaced in the first weeks of life, whereas leptin treatment in adult *ob/ob* mice was unable to restore these projections.⁸⁵ However, despite this critical neonatal window for leptin's neurotrophic action, leptin treatment is still able to revert the obese phenotype of adult *ob/ob* mice, indicating that further studies are still necessary to understand the biologic importance of the neurotrophic effect of leptin.¹⁷⁹ There is evidence that leptin also influences synaptic plasticity. *Ob/ob* mice have altered synaptic inputs in NPY/AgRP/GABA and POMC/CART neurons, with marked excitatory inputs on orexigenic neurons, thus stimulating food intake. In contrast to the critical leptin's neonatal window to regulate axon growth, leptin treatment reverses the altered pattern of the synaptic inputs of *ob/ob* mice within hours.²⁰²

Several studies have also identified a role of leptin in cognitive processes through activation of LepR in

the hippocampus. It has been reported that leptin regulates hippocampal excitability by modulating large-conductance calcium-activated potassium channels.²⁰³ Leptin can reduce hippocampal excitability in an animal model of epilepsy²⁰⁴ or act as pro-convulsant, depending on the target population of hippocampal cells.²⁰⁵ The hippocampus is required for learning and memory. The long-term potentiation is a form of synaptic plasticity important for learning/memory and this phenomenon is impaired in *db/db* mice.²⁰⁶ Additionally, leptin deficiency reduces brain myelination.²⁰⁷ Obese rats also show memory deficits related tasks,²⁰⁸ indicating a possible role of leptin in the formation of memory and learning. Baseline neurocognitive tests in a child with a mutation in the leptin gene indicated a developmental cognitive age lower than expected by their chronological age. Interestingly, treatment with leptin improved their neurocognitive skills.²⁰⁹ LepR-deficient mice also show depression-like and anxiolytic behaviors from a young age, as well as psychosis-like behavior, which is present only in adult animals.²¹⁰ On the other hand, animals exposed to stress paradigms have a significant decrease in leptin serum levels, and leptin administration into the hippocampus reverted depressive-like behavior in the forced swim test.^{211,212} In summary, there is evidence indicating that leptin can affect numerous cognitive processes and behaviors.

The role of leptin in disease

Potential therapeutic effects of leptin administration

Obesity

Leptin replacement in leptin-deficient subjects leads to enormous beneficial effects restoring their energy balance, glucose homeostasis, neuroendocrine and cognitive dysfunctions.^{49,50,61,209} Mutations in the leptin gene can also produce a biologically inactive leptin, in which treatment with recombinant human leptin is able to normalize the eating behavior and cause weight loss.²¹³ However, these mutations are very rare.²¹⁴ The potential therapeutic effects of leptin administration to treat obese humans, who do not carry any mutations in the *Lep* gene, were tested in several clinical trials. However, treatment with exogenous leptin resulted in no or only modest effects on body weight,²¹⁵⁻²²⁰ including obese individuals after gastric bypass surgery.²²¹ Additionally, no significant prevention in calorie restriction-induced neuroendocrine

adaptations was achieved with leptin administration.^{218,222} These results indicate that in obese individuals with already elevated leptin levels, exogenous leptin no further helps in the body weight management. Thus, leptin administration is likely a poor therapy for the obesity treatment. However, the perception of hunger/satiation was significantly improved in leptin-treated patients.^{223,224} Some reports also indicate that leptin administration induces a robust weight loss in a small percentage of patients,²¹⁵ suggesting that a subgroup of obese individuals could benefit from leptin treatment.

Lipodystrophy

Since leptin is produced by the adipose tissue, any dysfunction in this organ may affect serum leptin levels. Congenital or acquired generalized lipodystrophy (GL) is a condition characterized by abnormal or degenerative adipose tissue, leading to incapacity to accumulate fat in this tissue that is compensated with lipid deposition in other organs, such as the liver and skeletal muscle. GL can cause severe insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and hepatic steatosis. Importantly, patients with GL show low circulating leptin levels. The role of GL-induced leptin deficiency was investigated by studies that treated GL patients with leptin. Leptin administration produced profound improvements in all metabolic defects exhibited by GL patients.²²⁵⁻²²⁸ The beneficial effects of leptin therapy were observed not only in congenital GL, but also in HIV-associated lipodystrophy syndrome,^{229,230} and in type 1 diabetes mellitus (T1DM) associated with acquired GL.²³¹ These findings led the US Food & Drug Administration (FDA) to approve in 2014 Myalept® (metreleptin for injection) as replacement therapy to treat the complications of leptin deficiency in patients with congenital or acquired GL. This was the first official medical approval of leptin treatment.

Diabetes mellitus

As mentioned earlier, leptin deficiency causes severe insulin resistance, frequently associated with hyperglycemia. Leptin replacement therapy reverses the diabetic phenotype of *ob/ob* mice or leptin deficient humans.^{50,51,61} Several studies investigated whether leptin treatment produces beneficial effects on type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients.^{232,233} In a study,

metreleptin administration in patients with T2DM only reduced glycated hemoglobin (HbA_{1c}) marginally, without altering body weight or circulating inflammatory markers.²³³ In other report, recombinant methionyl human leptin for 14 d did not produce any significant effects on insulin sensitivity or body weight of obese people with T2DM.²³² Therefore, in accordance with the clinical trials to evaluate the potential efficacy of leptin to treat obesity, the data available indicates that leptin possesses poor anti-diabetic potential when used in hyperleptinemic obese people with T2DM.

In contrast to the minor effects produced in T2DM, leptin therapy in type 1 diabetic non-obese (NOD) mice normalized circulating levels of glucose, HbA_{1c}, free fatty acids, as well as a wide array of hepatic intermediary metabolites.²³⁴ Compared to insulin monotherapy, leptin lowers plasma and tissue lipids, and lipogenic and cholesterologenic transcription factors and enzymes.²³⁴ The anti-diabetic effects of leptin in T1DM depends on the CNS, since intracerebroventricular infusion of leptin has the same beneficial effects than systemic treatment.²³⁵ The mechanisms of action recruited by leptin to produce such dramatic effects resolving the metabolic dysfunctions in T1DM have been investigated. LepR expression in POMC cells or in GABA-positive neurons is sufficient to mediate the lifesaving and antidiabetic actions of leptin in insulin deficiency.²³⁶ Additionally, leptin administration improves hyperglucagonemia,²³⁴⁻²³⁶ which is a key feature that can lead to hyperglycemia and further complications of T1DM.²³⁷⁻²⁴⁰ Thus, pre-clinical studies in animal models highlight a promising therapeutic potential of leptin to treat T1DM. Regarding T2DM, leptin therapy produces small effects, possibly because of the already elevated serum leptin levels presented by the majority of type 2 diabetic individuals.

Hypothalamic amenorrhea

The reduction in leptin levels during calorie-restricted conditions is a determining factor that leads to suppression of the reproductive axis.^{55,57} Chronic energy deficiency secondary to strenuous exercise and/or decreased food intake can produce functional hypothalamic amenorrhea, which is a condition characterized by the disruption of GnRH secretion and consequently anovulation and

infertility. Therefore, under these conditions, hypothalamic amenorrhea may be caused by the relative leptin deficiency produced by chronic negative energy balance. In an elegant study, eight women with hypothalamic amenorrhea due to strenuous exercise or low body weight received recombinant human leptin for up to 3 months.¹⁷² The authors observed that leptin treatment increased mean LH levels and LH pulse frequency after 2 weeks and increased maximal follicular diameter, the number of dominant follicles, ovarian volume and estradiol levels over a period of 3 months. Remarkably, three patients had an ovulatory menstrual cycle and two others had preovulatory follicular development and withdrawal bleeding during treatment.¹⁷² Besides improvements in the reproductive axis,^{172,241} leptin treatment in patients with hypothalamic amenorrhea improved bone mineral density and content, as well as markers of bone metabolism suggestive of bone formation.^{241,242} Although larger clinical trial studies are still required to better assess the effects of leptin in the hypothalamic amenorrhea, these preliminary findings indicate that leptin treatment may be helpful to improve fertility and bone mineral density in lean hypoleptinemic women.

Leptin resistance and obesity

Definition

As previously mentioned, the high leptin levels and the decreased responsiveness to leptin led the scientific community to hypothesize that obesity is characterized by a condition of leptin resistance. It is worth mentioning that it is believed that leptin triggers more robust biologic responses when its levels decrease, such as during caloric restriction. Therefore, the reduction of leptin levels is a powerful cue to coordinate responses to save energy and increase hunger to increase survival and protect animals from food deprivation. On the other hand, nutrient excess is considered such a rare situation in nature that probably precluded evolution to select mechanisms capable of preventing efficient weight gain. A reduced capacity to respond to chronic high leptin levels is an example of this concept. However, experimental evidence points out possible mechanisms that explain the lower responsiveness to high leptin levels,⁴⁴ as described in more details in the following section and summarized in Fig. 6.

Leptin sensitivity in experimental models is normally evaluated by measuring the acute or chronic capacity of exogenous leptin infusion to reduce body weight, adiposity and/or food intake. Leptin sensitivity is also determined by measuring the activation of signaling pathways recruited by LepR after leptin administration (Fig. 2). Using the anorexigenic effects of leptin as readout to determine leptin sensitivity, numerous studies observed that DIO animals showed an attenuated response to leptin.²⁴³ However, a recent study questioned the current view of the importance of leptin resistance to induce obesity.²⁴⁴ In this study, LepR antagonist administration surprisingly increased feeding and body weight in both lean and DIO mice. As expected, this antagonist had no effect on leptin or LepR-deficient mice.²⁴⁴ Therefore, although several studies have demonstrated that obesity reduces the anorexigenic effects of leptin, DIO animals still retain some capacity to respond to LepR antagonist.

Regarding the assessment of leptin signaling pathways, Münzberg et al.⁴⁵ made a very nice observation indicating that some brain regions are more prone to develop leptin resistance compared with others. In this study, an acute peripheral (intraperitoneal) leptin infusion was able to induce an equivalent number of cells expressing pSTAT3 in the VMH, DMH, PMv and NTS of HFD-induced obese mice, compared with lean animals on normal chow diet.⁴⁵ However, the number of pSTAT3-positive cells in the ARH of obese mice was significantly lower compared with lean animals indicating a nucleus-specific leptin resistance.⁴⁵ Other studies confirmed these findings¹¹⁴ and

further indicated that NPY/AgRP neurons are first affected by DIO (2 d on HFD are enough to cause leptin resistance in these cells), whereas leptin resistance in POMC neurons requires a longer exposition to HFD.²⁴⁵ The reason for this selective leptin resistance may be caused by the anatomic position of LepR-expressing cells in relation to the BBB. NPY/AgRP neurons are very near to median eminence, which is a circumventricular organ. Therefore, median eminence presents extensive vasculature and lack of a normal BBB. Consequently, factors in the systemic circulation can affect more significantly neurons located close to this structure than cells of other brain regions. Therefore, ARH cells, especially NPY/AgRP neurons, are robustly affected by the pro-inflammatory and hyperleptinemic effects induced by HFD consumption.²⁴⁵ Besides HFD consumption, leptin resistance is also observed in other situations, such as pregnancy.^{104,246-249} As the primary cause of leptin resistance in pregnancy likely differs from what is observed in DIO, the brain nuclei exhibiting leptin resistance in pregnant animals may also be different. In fact, several studies have observed a lower responsiveness to leptin in the VMH of pregnant animals.²⁴⁷⁻²⁵⁰

The selective leptin resistance may help to explain some metabolic consequences of obesity. While the ability of leptin to regulate the energy balance, body weight and glucose homeostasis is impaired in DIO animals, since ARH is a major area that regulates these functions, others effects of leptin may be upregulated. That seems to be the case of leptin-induced activation of sympathetic nervous system.^{114,160,164} As obese animals have high leptin levels and brain nuclei that drive

Figure 6. Environmental influences on the development of obesity. Scheme summarizing the mechanisms through which an altered environment can promote obesity and type 2 diabetes mellitus.

leptin-induced activation of sympathetic nervous system maintain leptin sensitivity (e.g., DMH), the over-activation of leptin signaling can, for example, predispose obese individuals to hypertension.¹⁶⁰ Thus, leptin resistance is a complex phenomenon that probably affects some neuronal populations and leptin's functions, but not others.

Mechanisms

Some authors have suggested that leptin resistance may be caused by a limited capacity of leptin to enter into the CNS and therefore activate its cognate receptor in different brain areas. This hypothesis is supported by the fact that leptin enters into the CNS through a saturated transport system,²⁵¹ as well as because the cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio is decreased in obesity.^{252,253} Additionally, some studies have demonstrated that central leptin infusions are more efficient in inducing leptin's anorexigenic effects in obese animals in comparison with peripheral injections, suggesting that leptin transport from systemic circulation to the CNS could represent a limiting factor.^{60,243} Some pieces of evidence indicate the participation of short forms of LepR, such as the ObRa, in the leptin transport from systemic circulation to the CNS. For example, rats carrying a mutation that prevents the synthesis of short forms of LepR show decreased transport of leptin across the BBB and develop obesity.^{18,254} In addition, the short form of LepR is abundantly expressed in brain microvessels and choroid plexus, and ObRa is able to mediate a transcellular transport of leptin.^{39,255} However, other reports presented evidence that leptin transport across the BBB is not mediated by leptin receptors.²⁵⁶ In another study, mice carrying a mutation that prevents the synthesis of the ObRa isoform were studied.²⁵⁷ Although these mutants exhibited a reduced cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio, they presented very modest metabolic abnormalities suggesting that ObRa only plays a minor role in mediating leptin's effects.²⁵⁷ More recently, the participation of median eminence tanycytes was described in the leptin transport to the brain.²⁵⁸ Circulating leptin activates ERK signaling pathway in median eminence tanycytes, which allows leptin passage to the cerebrospinal fluid. Interestingly, leptin taken up by tanycytes accumulates in the median eminence of DIO or *db/db* mice, failing to reach the mediobasal hypothalamus.²⁵⁸ Therefore, although it is not totally clear the exact role of BBB

leptin transport as the primary cause of leptin resistance in DIO, defects in this mechanism seem to exert a significant role.

Some authors also suggest that leptin resistance may emerge as a secondary defect caused by the high leptin levels observed in obesity.²⁵⁹ However, studies that artificially produced high leptin levels chronically observed that animals did not defend a higher body weight, even after cessation of leptin administration, suggesting that hyperleptinemia *per se* does not produce long-term defects to maintain the energy balance and body weight.^{60,260} On the other hand, the most robust evidence to explain leptin resistance came from studies that identified intracellular proteins that are able to block the activation of leptin signaling cascades. STAT transcription factors robustly regulate the transcription of genes from the SOCS family, which includes eight intracellular proteins, named as SOCS1 to SOCS7, and CIS. These proteins have a C-terminal motif referred to as the SOCS box and a SH2 domain that allows them to bind to other proteins that contain phosphorylated tyrosine residues.²⁶¹ Therefore, SOCS proteins bind to tyrosine phosphorylated proteins leading them to proteasomal degradation or blocking their capacity to transduce intracellular effects.²⁶¹ Regarding leptin signaling that conveys its cellular effects through tyrosine phosphorylation and recruits LepR/JAK2/STAT3 pathway, previous studies have identified SOCS3 as the major protein from the SOCS family that is able to inhibit leptin signaling.²⁶² SOCS3 binds to phosphorylated JAK2 and tyrosine residue 985 of LepR, in both cases blocking the capacity of LepR/JAK2 pathway to transmit its intracellular signal (e.g., to recruit downstream proteins such as STAT3).^{263,264} Interestingly, the activation of LepR/JAK2/STAT3 signaling pathway induces a robust SOCS3 expression, indicating that SOCS3 acts as a negative feedback mechanism to modulate leptin signaling (Fig. 1).²⁶² That is the reason why hyperleptinemic conditions, like obesity, are normally associated with high hypothalamic SOCS3 expression.²⁶² Therefore, the increased SOCS3 levels in LepR-expressing cells could be a potential cause of leptin resistance in obesity. The important role of SOCS3 controlling leptin sensitivity was confirmed by studies that induced selective SOCS3 inactivation^{72,165,167,173,249,250,264-269} or super-expression.²⁷⁰ For example, brain-specific SOCS3 inactivation increases leptin sensitivity and partially protects

against DIO.²⁶⁸ SOCS3 expression in specific neuronal populations including POMC,²⁶⁵ SF1,¹⁶⁷ AgRP²⁴⁵ and LepR-expressing^{165,173,249,250} cells regulates leptin sensitivity and consequently the metabolism. Since SOCS3 also inhibits insulin signaling, and insulin and leptin act together in the CNS to control glucose homeostasis,²⁷¹ conditional SOCS3 ablation normally produces beneficial effects on glucose control, especially in obese insulin-resistant animals.^{165,265,268}

The SOCS3 capacity to affect leptin signaling and consequently the metabolism is not limited to conditions that simulate pathological states, such as DIO. Recent findings have shown that SOCS3 levels in LepR-expressing cells coordinate the typical metabolic adaptations of pregnancy.^{249,250} Pregnant animals must increase their food intake, adiposity and develop a certain level of insulin resistance to properly provide nutrients for the developing fetuses, and later for lactation. During pregnancy, changes in hormone levels (e.g., increased prolactin or placental lactogens levels) induce leptin resistance and may increase hypothalamic SOCS3 levels.²⁷²⁻²⁷⁴ Selective inactivation of SOCS3 in LepR-expressing cells prevents leptin resistance and thereby attenuates the increased food intake, adiposity and insulin resistance observed in pregnant mice.^{249,250} In another study, inactivation of SOCS3 in LepR-expressing cells mitigated post-restriction hyperphagia and weight regain in lean mice by reducing the mRNA levels of hypothalamic orexigenic neuropeptides during fasting.⁷²

Another important group of proteins that regulates leptin sensitivity is composed by protein tyrosine phosphatases (PTPs), which catalyze the dephosphorylation of tyrosine residues. Consequently, these proteins can block leptin signaling through the dephosphorylation of LepR, JAK2 or STAT3.²⁷⁵ The protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B; encoded by *Ptpn1* gene), T-cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP; encoded by *Ptpn2* gene) and protein tyrosine phosphatase epsilon (RPTPε; encoded by *Ptpre* gene) produce these effects, regulating negatively LepR signaling. Several studies have demonstrated that hypothalamic expression of PTPs is increased in obese animals and selective ablation of these proteins improves leptin sensitivity and partially prevents HFD-induced obesity and insulin resistance.^{46,131,266,276-280}

Leptin signaling can also be positively regulated by adaptor proteins and other enzymes. For example,

inactivation of the Shp2 decreases leptin sensitivity and predisposes animals to obesity.^{281,282} The cytoplasmic adaptor protein SH2B1 increases leptin sensitivity by binding to phospho-Tyr813 of JAK2 which enhances its activity and the activation of downstream leptin-signaling pathways.²⁸³ SH2B1 can also bind directly to insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS1/IRS2), stimulating leptin-induced activation of PI3K signaling pathway.²⁸³ In accordance with these effects, neuron-specific SH2B1 knockout mice exhibit leptin resistance, obesity and hyperglycemia.²⁸⁴ In summary, several intracellular proteins are able to affect either positively or negatively leptin signaling, representing potential candidates to mediate the leptin resistance observed in specific conditions, such as DIO or pregnancy.

Link between environment and obesity

The increasing prevalence of obesity and other metabolic diseases provides a link between the environmental changes that have occurred in the last decades with an impaired capacity to properly regulate the energy balance (Fig. 6). Regarding this, a frequent consumption of high-palatable/high-caloric diets, associated with a sedentary and stressful lifestyle, somehow disturb the functioning of neurocircuits responsible to control the food intake, body weight and blood glucose levels. The intake of high-palatable/high-caloric diets can disrupt the energy balance via several mechanisms.^{285,286} For example, HFD activates proinflammatory responses in the hypothalamus, which disturb the energy and glucose homeostasis.²⁸⁷ HFD can also lead to suppressed neurogenesis and apoptosis of hypothalamic neurons, especially those that induce satiety.^{288,289} The proinflammatory and proapoptotic effects of HFD may involve the activation of toll-like receptor 4 (TLR4), since TLR4 is activated by saturated fatty acids.²⁹⁰ Consequently, HFD induces the activation of IKKβ/NF-kappaB signaling pathways in the hypothalamus, which induce the production of proinflammatory cytokines, such as TNF-α.^{291,292} A high calorie/fat diet can also lead to endoplasmic reticulum (ER) stress.^{290,291,293} ER stress is caused by the accumulation of misfolded proteins, which activates the unfolded protein response.²⁸⁶ This condition, commonly caused by HFD consumption, plays a central role in the development of leptin resistance.^{291,294-297}

More recently, several studies described the participation of the gut microbiota in the predisposition to obesity and metabolic complications.^{285,298-303} Differences in our diet can change our gut microbiota, impacting in the risk to develop obesity.³⁰⁰ The gut microbiota can provide short-chain fatty acids or other nutrients after bacterial fermentation, and modulates gastrointestinal permeability and thereby the penetration of bacteria or bacterial products, such as LPS, which can induce intestinal or systemic inflammation.^{285,298,301} Interestingly, non-caloric artificial sweeteners or dietary emulsifiers, widely used food additives, can change our gut microbiota and promote metabolic syndrome.^{302,303}

Can leptin resistance be treated?

Since leptin resistance is a key feature that predisposes to obesity, the discovery of any treatment capable of preventing or restoring this condition would have a tremendous potential as anti-obesity therapy. Unfortunately, so far there is no efficient method to reestablish leptin sensitivity in obese animals. However, numerous studies have been focused in seeking for potential therapies that can increase leptin sensitivity. Obvious candidates would be compounds that inhibit proteins capable of inducing leptin resistance. Many natural products contain several lignans and flavonoids that exhibit a significant capacity to inhibit PTP1B.^{304,305} Resveratrol activates SIRT1, a NAD⁺-dependent protein deacetylase, which modulates leptin and insulin sensitivity.³⁰⁶ Using drug-screening methods, some studies found leptin sensitizer compounds with powerful anti-obesity properties, including the Celastrol, a pentacyclic triterpene, or Withaferin A, a steroidal lactone.^{307,308} Amylin is a hormone co-secreted with insulin from pancreatic β -cells, which binds specific receptors in the hind-brain. Interestingly, concurrent peripheral administration of amylin and leptin elicits synergistic anorexigenic effects in DIO animals, indicating that amylin agonists restore leptin responsiveness in DIO.³⁰⁹⁻³¹² Other studies also observed restoration of leptin responsiveness in DIO mice using an optimized leptin analog in combination with exendin-4, a long-acting GLP-1 receptor agonist, or fibroblast growth factor 21.³¹³

Not all fatty acids are pro-inflammatory. Actually, unsaturated fatty acids can revert diet-induced hypothalamic inflammation,³¹⁴ suggesting that

dietary changes prioritizing the intake of unsaturated fatty acids instead of saturated fatty acids can prevent hypothalamic dysfunctions, leptin resistance and consequently obesity. ω -3 polyunsaturated fatty acids activate the G protein-coupled receptor 120 (GPR120) and produce potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects.³¹⁵ Notably, GPR120-deficient mice are prone to develop obesity and GPR120 mutations increase the obesity risk in European populations.³¹⁶ ω -3 polyunsaturated fatty acids may also promote neurogenesis in POMC-expressing cells of the ARH, indicating the potential of ω -3 polyunsaturated fatty acids to correct obesity-associated hypothalamic neuronal loss.³¹⁷ Regarding non-pharmacological and non-dietary anti-obesity strategies, physical exercise has a great potential. The beneficial effects of exercise for the energy and glucose homeostasis are well-established. However, much less is known about the molecular mechanisms that makes physical exercise an efficient anti-obesity therapy. Previous studies have shown that both endurance,^{318,319} and voluntary³²⁰⁻³²² exercise improves leptin sensitivity in peripheral tissues or in the hypothalamus of obese animals. Additionally, acute exercise suppresses hypothalamic PTP1B protein levels, leading to a higher activation of insulin and leptin signaling pathways in obese rats.³²³

Leptin and metabolic programming

Together with the genetic background and the environment where an organism develops, the interaction between mother and fetus during gestation permanently influences the organism's metabolism in adult life, a concept known as metabolic programming.³²⁴ Hales and Baker defined the "thrifty phenotype hypothesis," which suggests that poor nutrition during gestation can permanently program the fetus to develop metabolic disorders such as metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus.³²⁵ The consequences of poor nutrition during gestation for the development of obesity were first observed during the Dutch famine of 1944–1945, where exposition to undernutrition during the first half of pregnancy resulted in high obesity rates, whereas exposition during the last trimester or first months after birth resulted in lower obesity rates.³²⁶ Therefore, depending on the moment where the exposure to

undernutrition occurs, the progeny will be programmed to a higher or lower body mass index.⁵³

A recent study using a mouse model of undernutrition during gestation showed that if food is available during the postnatal period, the undernourished offspring often displays accelerated catch-up growth. This fast recovery seems to be mediated by leptin.³²⁷ As mentioned earlier, leptin inhibits NPY/AgRP/GABA neurons in adult animals. However, there is evidence that leptin can activate NPY/AgRP/GABA neurons from postnatal days 13–15 (P13–P15). This opposite effect occurs because of the lack of functional ATP dependent potassium channels in LepR cells at that age. At P21, when pups feed independently, leptin induces depolarization in 41% of the cells, while 25% of neurons are hyperpolarized by leptin. By the fourth week of life, the NPY/AgRP/GABA circuit acquires the adult phenotype.³²⁷ In case of undernutrition followed by overnutrition during lactation, the onset of the potassium channels is delayed and instead of inhibiting food intake leptin stimulates it, favoring the accumulation of energy stores until growth and adiposity are similar to controls.³²⁸

The opposite scenario, overnutrition, also has severe consequences for the metabolism of the offspring. Several studies have shown that overnutrition before, during and shortly after gestation can induce long-term metabolic disorders in the offspring.³²⁹ Female mice fed a HFD during gestation had hyperglycemic pups with higher adiposity.³³⁰ If the HFD was extended to lactation, the offspring developed greater risk of becoming obese,³³¹ and the α -MSH and AgRP containing fibers were decreased in the hypothalamus.³³² Similarly to what was seen in rodents, children born of obese mothers have higher chances of developing metabolic syndrome.³³³ Rats treated with leptin antagonist during development presented leptin resistance in adult life, and when submitted to HFD they had higher chances to gain more weight than control rats. At 8 months, rats that received leptin antagonist during development became hyperleptinemic with higher adiposity.³³⁴

Human and animal models of retarded intrauterine growth are more susceptible to develop obesity and metabolic syndrome when challenged with HFD in adult life. Leptin levels increase at the end of embryonic development, but are decreased after birth, being lower in babies with retarded intrauterine growth

compared with control newborns,³³⁵ indicating that lower leptin during development participates in the metabolic programming. In rats, neonatal leptin treatment reverses the developmental programming induced by undernutrition during gestation, showing that the neonatal period can be influenced by serum leptin levels.³³⁶

Concluding remarks

Leptin is a master regulator of energy balance and body adiposity. The vast majority of obese individuals present leptin resistance, and recent evidence indicates that our obesogenic environment contributes to this condition. Although leptin administration is a poor therapy to treat obesity, several pathologies, such as lipodystrophy, hypothalamic amenorrhea and T1DM can benefit from leptin treatment. Leptin also has many other important effects throughout life, which includes the regulation of brain development, behaviors, neuroendocrine axes and autonomic nervous system. More than being a hormone that induces weight loss and satiety, leptin coordinates numerous biologic functions to ensure survival, especially during situations of negative energy balance. This myriad of effects depends on the coordinated action of multiple populations of LepR-expressing neurons.

Abbreviations

AgRP	agouti-related protein
ARH	arcuate nucleus of the hypothalamus
BAT	brown adipose tissue
BBB	blood–brain barrier
CART	cocaine and amphetamine regulated transcript
CCK	cholecystokinin
CNS	central nervous system
DIO	diet-induced obesity
DMH	dorsomedial nucleus of the hypothalamus
DMX	dorsal motor nucleus of the vagus
ER	endoplasmic reticulum
ERK	extracellular signal-regulated kinases
GH	growth hormone
GL	generalized lipodystrophy
GLP-1	glucagon-like peptide-1
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
GPR120	G protein-coupled receptor 120
HFD	high-fat diet

IL	interleukin
IRS	insulin receptor substrates
JAK	Janus kinase
LepR	leptin receptor
LH	luteinizing hormone
LHA	hypothalamic area
LPS	lipopolysaccharide
MCH	melanin-concentrating hormone
MCR	melanocortin receptors
MPO	median preoptic area
nNOS	neuronal NO synthase
NO	nitric oxide
NOD	non-obese diabetic mice
NPY	neuropeptide Y
NTS	nucleus of the solitary tract
Ob-R	leptin receptor
PBN	parabrachial nucleus
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PMv	ventral premammillary nucleus
POMC	proopiomelanocortin
PTP	protein tyrosine phosphatases
PTP1B	protein tyrosine phosphatase 1B
PVH	paraventricular nucleus of the hypothalamus
RPTP ϵ	protein tyrosine phosphatase epsilon
SF1	steroidogenic factor-1
SH2	Src homology 2
Shp2	Src homology 2-containing tyrosine phosphatase
SOCS	suppressor of cytokine signaling
STAT	signal transducer and activator of transcription
T1DM	type 1 diabetes mellitus
T2DM	type 2 diabetes mellitus
TCPTP	T-cell protein tyrosine phosphatase
TLR4	toll-like receptor 4
TNF	tumor necrosis factor
TRH	thyrotropin-releasing hormone
UCP1	uncoupling protein 1
VMH	ventromedial nucleus of the hypothalamus
VTA	ventral tegmental area
α -MSH	α -melanocyte-stimulating hormone.

Disclosure of potential conflicts of interest

No potential conflicts of interest are disclosed.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ana Maria P. Campos for helping to produce the mouse brain photomicrographs.

Funding

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; grants number: 2015/10992-6 to J.D. and 2014/11752-6 to A.M.R.L.).

About the authors

Jose Donato Jr., PhD, is an Associate Professor of the Department of Physiology and Biophysics at the University of São Paulo (USP), Brazil. He received his PhD in Morpho-functional Sciences from USP in 2008, followed by a postdoctorate at the University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX. Back to Brazil in 2012, Dr. Donato set up his laboratory focused in

understanding the importance of hormone signaling in the brain. So far, his group published several papers studying the effects of leptin, prolactin, estradiol and growth hormone on brain functions, especially regarding the regulation of energy balance and glucose homeostasis.

Angela M. Ramos-Lobo, MSc, is a PhD student under Dr. Donato's supervision. She graduated in Biology at the University of Buenos Aires in 2010 and received her MSc in Sciences from USP in 2013. Her PhD focuses on understanding the consequences of the absence of leptin signaling in early life.

References

- [1] Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26:1407-1433; PMID:12439643. doi:10.1038/sj.ijo.0802142.
- [2] Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C, Caro JF. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest.* 1996;97:1344-1347; PMID:8636448. doi:10.1172/JCI118551.
- [3] Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, Jinagouda SD, el-Tawil K, Rude RK, Kamdar V. Sexual dimorphism in plasma leptin

- concentration. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:579-584; PMID:9024258..
- [4] Tsai M, Asakawa A, Amitani H, Inui A. Stimulation of leptin secretion by insulin. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16:S543-S548; PMID:23565488. doi:10.4103/2230-8210.105570.
- [5] Vital P, Larrieta E, Hiriart M. Sexual dimorphism in insulin sensitivity and susceptibility to develop diabetes in rats. *J Endocrinol.* 2006;190:425-432; PMID:16899575. doi:10.1677/joe.1.06596.
- [6] Leal-Cerro A, Soto A, Martinez MA, Dieguez C, Casanueva FF. Influence of cortisol status on leptin secretion. *Pituitary.* 2001;4:111-116; PMID:11824503. doi:10.1023/A:1012903330944.
- [7] Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia.* 1978;14:141-148; PMID:350680. doi:10.1007/BF00429772.
- [8] Coleman DL. A historical perspective on leptin. *Nat Med.* 2010;16:1097-1099; PMID:20930752. doi:10.1038/nm1010-1097.
- [9] Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science.* 1966;153:1127-1128; PMID:5918576. doi:10.1126/science.153.3740.1127.
- [10] Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered.* 1950;41:317-318; PMID:14824537. doi:10.1093/oxfordjournals.jhered.a106073.
- [11] Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia.* 1973;9:294-298; PMID:4767369. doi:10.1007/BF01221857.
- [12] Coleman DL, Hummel KP. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol.* 1969;217:1298-1304; PMID:5346292.
- [13] Coleman DL, Hummel KP. The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia.* 1973;9:287-293; PMID:4588246. doi:10.1007/BF01221856.
- [14] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425-432; PMID:7984236. doi:10.1038/372425a0.
- [15] Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995;83:1263-1271; PMID:8548812. doi:10.1016/0092-8674(95)90151-5.
- [16] Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell.* 1996;84:491-495; PMID:8608603. doi:10.1016/S0092-8674(00)81294-5.
- [17] Zhang J, Scarpace PJ. The soluble leptin receptor neutralizes leptin-mediated STAT3 signalling and anorexic responses in vivo. *Br J Pharmacol.* 2009;158:475-482; PMID:19422379. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00246.x.
- [18] Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbak C, El-Haschimi K, Banks WA, Flier JS. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology.* 2002;143:775-783; PMID:11861497. doi:10.1210/endo.143.3.8669.
- [19] Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:32686-32695; PMID:9405487. doi:10.1074/jbc.272.51.32686.
- [20] Chua SC, Koutras IK, Han L, Liu S-M, Kay J, Young SJ, Chung WK, Leibel RL. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics.* 1997;45:264-270; PMID:9344648. doi:10.1006/geno.1997.4962.
- [21] Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:6093-6096; PMID:9102398. doi:10.1074/jbc.272.10.6093.
- [22] Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet.* 1996;14:95-97; PMID:8782827. doi:10.1038/ng0996-95.
- [23] Chua SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu S-M, Tartaglia L, Leibel RL. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (Leptin) receptor. *Science.* 1996;271:994-996; PMID:8584938. doi:10.1126/science.271.5251.994.
- [24] Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem.* 2000;275:14563-14572; PMID:10799542. doi:10.1074/jbc.275.19.14563.
- [25] Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature.* 2003;421:856-859; PMID:12594516. doi:10.1038/nature01388.
- [26] Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, Fu XY. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:4661-4666; PMID:15070774. doi:10.1073/pnas.0303992101.
- [27] Hekerman P, Zeidler J, Bamberg-Lemper S, Knobelspies H, Lavens D, Tavernier J, Joost HG, Becker W. Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. *FEBS J.* 2005;272:109-119; PMID:15634336. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04391.x.
- [28] Furigo IC, Ramos-Lobo AM, Frazao R, Donato J Jr Brain STAT5 signaling and behavioral control. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;438:70-76; PMID:27118133. doi:10.1016/j.mce.2016.04.019.
- [29] Patterson CM, Villanueva EC, Greenwald-Yarnell M, Rajala M, Gonzalez IE, Saini N, Jones J, Myers MG Jr Leptin action via LepR-b Tyr1077 contributes to the control of energy balance and female reproduction. *Mol*

- Metab. 2012;1:61-69; PMID:24024119. doi:10.1016/j.molmet.2012.05.001.
- [30] Niswender KD, Morrison CD, Clegg DJ, Olson R, Baskin DG, Myers MG Jr, Seeley RJ, Schwartz MW. Insulin activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of Insulin-Induced anorexia. *Diabetes*. 2003;52:227-231; PMID:12540590. doi:10.2337/diabetes.52.2.227.
- [31] Donato J Jr, Frazão R, Elias CF. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54:591-602; PMID:21085763. doi:10.1590/S0004-27302010000700002.
- [32] Diano S, Kalra SP, Sakamoto H, Horvath TL. Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. *Brain Res*. 1998;812:256-259; PMID:9813356. doi:10.1016/S0006-8993(98)00936-6.
- [33] Roy AF, Benomar Y, Bailleux V, Vacher CM, Aubourg A, Gertler A, Djiane J, Taouis M. Lack of cross-desensitization between leptin and prolactin signaling pathways despite the induction of suppressor of cytokine signaling 3 and PTP-1B. *J Endocrinol*. 2007;195:341-350; PMID:17951545. doi:10.1677/JOE-07-0321.
- [34] Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, 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*. 1996;387:113-116; PMID:8674530. doi:10.1016/0014-5793(96)00473-5.
- [35] Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 1996;98:1101-1106; PMID:8787671. doi:10.1172/JCI118891.
- [36] Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology*. 1997;138:4489-4492; PMID:9322969. doi:10.1210/endo.138.10.5570.
- [37] Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:7001-7005; PMID:9192681. doi:10.1073/pnas.94.13.7001.
- [38] Guan XM, Hess JF, Yu H, Hey PJ, van der Ploeg LH. Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;133:1-7; PMID:9359467. doi:10.1016/S0303-7207(97)00138-X.
- [39] Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology*. 1998;139:3485-3491; PMID:9681499. doi:10.1210/endo.139.8.6154.
- [40] Hubschle T, Thom E, Watson A, Roth J, Klaus S, Meyerhof W. Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *J Neurosci*. 2001;21:2413-2424; PMID:11264315.
- [41] Hosoi T, Kawagishi T, Okuma Y, Tanaka J, Nomura Y. Brain stem is a direct target for leptin's action in the central nervous system. *Endocrinology*. 2002;143:3498-3504; PMID:12193563. doi:10.1210/en.2002-220077.
- [42] Münzberg H, Huo L, Nillni EA, Hollenberg AN, Bjorbaek C. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology*. 2003;144:2121-2131; PMID:12697721. doi:10.1210/en.2002-221037.
- [43] Carpenter LR, Farruggella TJ, Symes A, Karow ML, Yancopoulos GD, Stahl N. Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:6061-6066; PMID:9600917. doi:10.1073/pnas.95.11.6061.
- [44] El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2000;105:1827-1832; PMID:10862798. doi:10.1172/JCI9842.
- [45] Münzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. 2004;145:4880-4889; PMID:15271881. doi:10.1210/en.2004-0726.
- [46] Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, Kahn BB, et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell*. 2002;2:489-495; PMID:11970898. doi:10.1016/S1534-5807(02)00148-X.
- [47] Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995;269:543-546; PMID:7624777. doi:10.1126/science.7624777.
- [48] Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334:292-295; PMID:8532024. doi:10.1056/NEJM199602013340503.
- [49] Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*. 1999;341:879-884; PMID:10486419. doi:10.1056/NEJM199909163411204.
- [50] Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002;110:1093-1103; PMID:12393845. doi:10.1172/JCI0215693.
- [51] Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 1995;269:540-543; PMID:7624776. doi:10.1126/science.7624776.
- [52] Park HK, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism.

- Metabolism. 2015;64:24-34; PMID:25199978. doi:10.1016/j.metabol.2014.08.004.
- [53] Zeltser LM. Developmental influences on circuits programming susceptibility to obesity. *Front Neuroendocrinol.* 2015;39:17-27; PMID:26206662. doi:10.1016/j.yfrne.2015.07.002.
- [54] Khan SM, Hamnvik OP, Brinkoetter M, Mantzoros CS. Leptin as a modulator of neuroendocrine function in humans. *Yonsei Med J.* 2012;53:671-679; PMID:22665330. doi:10.3349/ymj.2012.53.4.671.
- [55] Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996;382:250-252; PMID:8717038. doi:10.1038/382250a0.
- [56] Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:3419-3423; PMID:8784108. doi:10.1210/jcem.81.9.8784108.
- [57] Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest.* 2003;111:1409-1421; PMID:12727933. doi:10.1172/JCI200317490.
- [58] Leibel RL. The role of leptin in the control of body weight. *Nutr Rev.* 2002;60:S15-S19; discussion S68-84, 5-7; PMID:12403079. doi:10.1301/002966402320634788.
- [59] Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995;269:546-549; PMID:7624778. doi:10.1126/science.7624778.
- [60] Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:8878-8883; PMID:9238071. doi:10.1073/pnas.94.16.8878.
- [61] Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F, Whitby R, Liang L, Cohen P, Bhasin S, et al. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:4531-4536; PMID:15070752. doi:10.1073/pnas.0308767101.
- [62] Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature.* 2001;413:794-795; PMID:11677594. doi:10.1038/35101657.
- [63] Hill JW, Williams KW, Ye C, Luo J, Balthasar N, Coppari R, Cowley MA, Cantley LC, Lowell BB, Elmquist JK. Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J Clin Invest.* 2008;118:1796-1805; PMID:18382766. doi:10.1172/JCI32964.
- [64] Coppari R, Ichinose M, Lee CE, Pullen AE, Kenny CD, McGovern RA, Tang V, Liu SM, Ludwig T, Chua SC Jr, et al. The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.* 2005;1:63-72; PMID:16054045. doi:10.1016/j.cmet.2004.12.004.
- [65] Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* 1998;21:1375-1385; PMID:9883730. doi:10.1016/S0896-6273(00)80656-X.
- [66] Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes.* 1997;46:2119-2123; PMID:9392508. doi:10.2337/diab.46.12.2119.
- [67] Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology.* 1997;138:5063-5066; PMID:9348241. doi:10.1210/endo.138.11.5651.
- [68] Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 2001;411:480-484; PMID:11373681. doi:10.1038/35078085.
- [69] Edwards CM, Abbott CR, Sunter D, Kim M, Dakin CL, Murphy KG, Abusnana S, Taheri S, Rossi M, Bloom SR. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagon-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat. *Brain Res.* 2000;866:128-134; PMID:10825488. doi:10.1016/S0006-8993(00)02257-5.
- [70] Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, et al. A C-terminal fragment of agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology.* 1998;139:4428-4431; PMID:9751529. doi:10.1210/endo.139.10.6332.
- [71] Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 1997;88:131-141; PMID:9019399. doi:10.1016/S0092-8674(00)81865-6.
- [72] Pedrosa JA, Silveira MA, Lima LB, Furigo IC, Zampieri TT, Ramos-Lobo AM, Buonfiglio DC, Teixeira PD, Frazão R, Donato J Jr. Changes in leptin signaling by SOCS3 modulate fasting-induced hyperphagia and weight regain in mice. *Endocrinology.* 2016;157:3901-3914; PMID:27471877. doi:10.1210/en.2016-1038.
- [73] Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.* 1998;1:271-272; PMID:10195157. doi:10.1038/1082.
- [74] Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, Maratos-Flier E, Roth BL, Lowell BB. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:1424-1428; PMID:21364278. doi:10.1172/JCI46229.

- [75] Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, et al. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci.* 2005;8:1289-1291; PMID:16158063. doi:10.1038/nn1548.
- [76] Clark JT, Kalra PS, Kalra SP. Neuropeptide Y stimulates feeding but inhibits sexual behavior in rats. *Endocrinology.* 1985;117:2435-2442; PMID:3840737. doi:10.1210/endo-117-6-2435.
- [77] Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science.* 1997;278:135-138; PMID:9311920. doi:10.1126/science.278.5335.135.
- [78] Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell.* 2009;137:1225-1234; PMID:19563755. doi:10.1016/j.cell.2009.04.022.
- [79] Tong Q, Ye C-P, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat Neurosci.* 2008;11:998-1000; PMID:19160495. doi:10.1038/nn.2167.
- [80] Hagan MM, Rushing PA, Schwartz MW, Yagaloff KA, Burn P, Woods SC, Seeley RJ. Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. *J Neurosci.* 1999;19:2362-2367; PMID:10066286.
- [81] Balthasar N, Coppari R, McMinn J, Liu SM, Lee CE, Tang V, Kenny CD, McGovern RA, Chua SC Jr, Elmquist JK, et al. Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron.* 2004;42:983-991; PMID:15207242. doi:10.1016/j.neuron.2004.06.004.
- [82] van de Wall E, Leshan R, Xu AW, Balthasar N, Coppari R, Liu SM, Jo YH, MacKenzie RG, Allison DB, Dun NJ, et al. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology.* 2008;149:1773-1785; PMID:18162515. doi:10.1210/en.2007-1132.
- [83] Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science.* 2005;310:683-685; PMID:16254186. doi:10.1126/science.1115524.
- [84] Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell.* 2005;123:493-505; PMID:16269339. doi:10.1016/j.cell.2005.08.035.
- [85] Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science.* 2004;304:108-110; PMID:15064420. doi:10.1126/science.1095004.
- [86] Lima LB, Metzger M, Furigo IC, Donato J Jr Leptin receptor-positive and leptin receptor-negative proopiomelanocortin neurons innervate an identical set of brain structures. *Brain Res.* 2016;1646:366-376; PMID:27321158. doi:10.1016/j.brainres.2016.06.024.
- [87] Takahashi KA, Cone RD. Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related protein neurons. *Endocrinology.* 2005;146:1043-1047; PMID:15591135. doi:10.1210/en.2004-1397.
- [88] Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 2001;409:194-198; PMID:11196643. doi:10.1038/35051587.
- [89] Krashes MJ, Shah BP, Madara JC, Olson DP, Strohlic DE, Garfield AS, Vong L, Pei H, Watabe-Uchida M, Uchida N, et al. An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature.* 2014;507:238-2342; PMID:24487620. doi:10.1038/nature12956.
- [90] Liu T, Kong D, Shah Bhavik P, Ye C, Koda S, Saunders A, Ding JB, Yang Z, Sabatini BL, Lowell BB. Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron.* 2012;73:511-522; PMID:22325203. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.027.
- [91] Wu Q, Clark MS, Palmiter RD. Deciphering a neuronal circuit that mediates appetite. *Nature.* 2012;483:594-597; PMID:22419158. doi:10.1038/nature10899.
- [92] Carter ME, Soden ME, Zweifel LS, Palmiter RD. Genetic identification of a neural circuit that suppresses appetite. *Nature.* 2013;503:111-114; PMID:24121436. doi:10.1038/nature12596.
- [93] Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron.* 1999;23:775-786; PMID:10482243. doi:10.1016/S0896-6273(01)80035-0.
- [94] Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature.* 1998;396:670-674; PMID:9872314. doi:10.1038/25341.
- [95] Leininger GM, Opland DM, Jo YH, Faouzi M, Christensen L, Cappellucci LA, Rhodes CJ, Gnegy ME, Becker JB, Pothos EN, et al. Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. *Cell Metab.* 2011;14:313-323; PMID:21907138. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.016.
- [96] Goforth PB, Leininger GM, Patterson CM, Satin LS, Myers MG Jr Leptin acts via lateral hypothalamic area neurotensin neurons to inhibit orexin neurons by multiple GABA-independent mechanisms. *J Neurosci.* 2014;34:11405-11415; PMID:25143620. doi:10.1523/JNEUROSCI.5167-13.2014.
- [97] Opland D, Sutton A, Woodworth H, Brown J, Bugescu R, Garcia A, Christensen L, Rhodes C, Myers M Jr, Leininger G. Loss of neurotensin receptor-1 disrupts the control of the mesolimbic dopamine system by leptin and promotes hedonic feeding and obesity. *Mol Metab.* 2013;2:423-434; PMID:24327958. doi:10.1016/j.molmet.2013.07.008.

- [98] Yu S, Qualls-Creekmore E, Rezai-Zadeh K, Jiang Y, Berthoud HR, Morrison CD, Derbenev AV, Zsombok A, Münzberg H. Glutamatergic preoptic area neurons that express leptin receptors drive temperature-dependent body weight homeostasis. *J Neurosci.* 2016;36:5034-5046; PMID:27147656. doi:10.1523/JNEUROSCI.0213-16.2016.
- [99] Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu Z-W, Gao X-B, Thurmon JJ, Marinelli M, DiLeone RJ. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron.* 2006;51:801-810; PMID:16982424. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.023.
- [100] Fulton S, Pissios P, Manchon Ramon P, Stiles L, Frank L, Pothos EN, Maratos-Flier E, Flier JS. Leptin regulation of the mesoaccumbens dopamine pathway. *Neuron.* 2006;51:811-822; PMID:16982425. doi:10.1016/j.neuron.2006.09.006.
- [101] Xu L, Scheenen WJJM, Leshan RL, Patterson CM, Elias CF, Bouwhuis S, Roubos EW, Myers MG Jr, Kozicz T. Leptin signaling modulates the activity of urocortin 1 neurons in the mouse nonpreganglionic edinger-westphal nucleus. *Endocrinology.* 2011;152:979-988; PMID:21209012. doi:10.1210/en.2010-1143.
- [102] Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, Elmquist JK. Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2009;514:518-532; PMID:19350671. doi:10.1002/cne.22025.
- [103] Donato J Jr, Frazao R, Fukuda M, Vianna CR, Elias CF. Leptin induces phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase in defined hypothalamic neurons. *Endocrinology.* 2010;151:5415-5427; PMID:20881244. doi:10.1210/en.2010-0651.
- [104] Nagaishi VS, Cardinali LI, Zampieri TT, Furigo IC, Metzger M, Donato J Jr Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neuroscience.* 2014;259:71-83; PMID:24316468. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.11.050.
- [105] Garfield AS, Patterson C, Skora S, Gribble FM, Reimann F, Evans ML, Myers MG Jr, Heisler LK. Neurochemical characterization of body weight-regulating leptin receptor neurons in the nucleus of the solitary tract. *Endocrinology.* 2012;153:4600-4607; PMID:22869346. doi:10.1210/en.2012-1282.
- [106] Scott MM, Williams KW, Rossi J, Lee CE, Elmquist JK. Leptin receptor expression in hindbrain Glp-1 neurons regulates food intake and energy balance in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:2413-2421; PMID:21606595. doi:10.1172/JCI43703.
- [107] Hayes MR, Skibicka KP, Lechner TM, Guarnieri DJ, DiLeone RJ, Bence KK, Grill HJ. Endogenous leptin signaling in the caudal nucleus tractus solitarius and area postrema is required for energy balance regulation. *Cell Metab.* 2010;11:77-83; PMID:20074530. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.009.
- [108] Kim JG, Suyama S, Koch M, Jin S, Argente-Arizon P, Argente J, Liu ZW, Zimmer MR, Jeong JK, Szigeti-Buck K, et al. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat Neurosci.* 2014;17:908-910; PMID:24880214. doi:10.1038/nn.3725.
- [109] Trayhurn P, Fuller L. The development of obesity in genetically diabetic-obese (db/db) mice pair-fed with lean siblings. The importance of thermoregulatory thermogenesis. *Diabetologia.* 1980;19:148-153; PMID:7418967. doi:10.1007/BF00421862.
- [110] Berglund ED, Vianna CR, Donato J Jr, Kim MH, Chuang JC, Lee CE, Lauzon DA, Lin P, Brule LJ, Scott MM, et al. Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J Clin Invest.* 2012;122:1000-1009; PMID:22326958. doi:10.1172/JCI59816.
- [111] Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science.* 1996;274:1704-1707; PMID:8939859. doi:10.1126/science.274.5293.1704.
- [112] Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, et al. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron.* 2006;49:191-203; PMID:16423694. doi:10.1016/j.neuron.2005.12.021.
- [113] Bingham NC, Anderson KK, Reuter AL, Stallings NR, Parker KL. Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology.* 2008;149:2138-2148; PMID:18258679. doi:10.1210/en.2007-1200.
- [114] Enriori PJ, Sinnayah P, Simonds SE, Garcia Rudaz C, Cowley MA. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J Neurosci.* 2011;31:12189-12197; PMID:21865462. doi:10.1523/JNEUROSCI.2336-11.2011.
- [115] Zhang Y, Kerman IA, Laque A, Nguyen P, Faouzi M, Louis GW, Jones JC, Rhodes C, Münzberg H. Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *J Neurosci.* 2011;31:1873-1884; PMID:21289197. doi:10.1523/JNEUROSCI.3223-10.2011.
- [116] Rezai-Zadeh K, Yu S, Jiang Y, Laque A, Schwartzburg C, Morrison CD, Derbenev AV, Zsombok A, Münzberg H. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol Metab.* 2014;3:681-693; PMID:25352997. doi:10.1016/j.molmet.2014.07.008.
- [117] Dodd GT, Worth AA, Nunn N, Korpak AK, Bechtold DA, Allison MB, Myers MG Jr, Statnick MA, Luckman SM. The thermogenic effect of leptin is dependent on a distinct population of prolactin-releasing peptide neurons in the dorsomedial hypothalamus. *Cell Metab.* 2014;20:639-649; PMID:25176149. doi:10.1016/j.cmet.2014.07.022.
- [118] Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM, Emerson CH, Lechan RM. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve

- terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci.* 2000;20:1550-1558; PMID:10662844.
- [119] Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q, Rand WM, Moss LG, Kuhar M, Emerson CH, et al. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci.* 2000;20:9224-9234; PMID:11125000.
- [120] Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DG, Seal LJ, Kong WM, Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Ghatei MA, et al. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest.* 2000;105:1005-1011; PMID:10749579. doi:10.1172/JCI8857.
- [121] Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nilni EA, Bjorbaek C, Elmquist JK, Flier JS, Hollenberg AN. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest.* 2001;107:111-120; PMID:11134186. doi:10.1172/JCI10741.
- [122] Morton GJ, Kaiyala KJ, Fisher JD, Ogimoto K, Schwartz MW, Wisse BE. Identification of a physiological role for leptin in the regulation of ambulatory activity and wheel running in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300:E392-E401; PMID:21062956. doi:10.1152/ajpendo.00546.2010.
- [123] Collins S, Kuhn CM, Petro AE, Swick AG, Chrnyk BA, Surwit RS. Role of leptin in fat regulation. *Nature.* 1996;380:677; PMID:8614460. doi:10.1038/380677a0.
- [124] Bates SH, Dundon TA, Seifert M, Carlson M, Maratos-Flier E, Myers MG Jr. LRB-STAT3 signaling is required for the neuroendocrine regulation of energy expenditure by leptin. *Diabetes.* 2004;53:3067-3073; PMID:15561935. doi:10.2337/diabetes.53.12.3067.
- [125] Kaiyala KJ, Ogimoto K, Nelson JT, Muta K, Morton GJ. Physiological role for leptin in the control of thermal conductance. *Mol Metab.* 2016;5:892-902; PMID:27689002. doi:10.1016/j.molmet.2016.07.005.
- [126] Fischer AW, Hoefig CS, Abreu-Vieira G, de Jong JM, Petrovic N, Mittag J, Cannon B, Nedergaard J. Leptin raises defended body temperature without activating thermogenesis. *Cell Rep.* 2016;14:1621-1631; PMID:26876182. doi:10.1016/j.celrep.2016.01.041.
- [127] Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp A Jr, Nicholls DG. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labeling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem.* 1978;82:515-521; PMID:624284. doi:10.1111/j.1432-1033.1978.tb12045.x.
- [128] Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(Suppl 1):S36-S42; PMID:20935665. doi:10.1038/ijo.2010.182.
- [129] Scarpace PJ, Matheny M, Pollock BH, Tumer N. Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J Physiol.* 1997;273:E226-E230; PMID:9252501.
- [130] van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009;360:1500-1508; PMID:19357405. doi:10.1056/NEJMoa0808718.
- [131] Dodd GT, Decherf S, Loh K, Simonds SE, Wiede F, Ballard E, Merry TL, Münzberg H, Zhang ZY, Kahn BB, et al. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell.* 2015;160:88-104; PMID:25594176. doi:10.1016/j.cell.2014.12.022.
- [132] Chong AC, Greendyk RA, Zeltser LM. Distinct networks of leptin- and insulin-sensing neurons regulate thermogenic responses to nutritional and cold challenges. *Diabetes.* 2015;64:137-146; PMID:25125486. doi:10.2337/db14-0567.
- [133] Geiser F. Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:239-274; PMID:14977403. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105.
- [134] Hudson JW, Scott IM. Daily torpor in the laboratory mouse, *Mus-Musculus Var Albino*. *Physiol Zool.* 1979;52:205-218. doi:10.1086/physzool.52.2.30152564.
- [135] Solymar M, Petervari E, Balasko M, Szelenyi Z. The onset of daily torpor is regulated by the same low body mass in lean mice and in mice with diet-induced obesity. *Temperature.* 2015;2:129-134. doi:10.1080/23328940.2015.1014250.
- [136] Faggioni R, Fantuzzi G, Fuller J, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C. IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation. *Am J Physiol.* 1998;274:R204-R208; PMID:9458919.
- [137] Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J, Feingold KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest.* 1996;97:2152-2157; PMID:8621806. doi:10.1172/JCI118653.
- [138] Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med.* 1997;185:171-175; PMID:8996253. doi:10.1084/jem.185.1.171.
- [139] Finck BN, Kelley KW, Dantzer R, Johnson RW. In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor-alpha in the induction of leptin by lipopolysaccharide. *Endocrinology.* 1998;139:2278-2283; PMID:9564834. doi:10.1210/endo.139.5.6012.
- [140] American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.*

- 1992;20:864-874; PMID:1597042. doi:10.1097/00003246-199206000-00025.
- [141] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. *Crit Care Med.* 2003; 31:1250-1256; PMID:12682500. doi:10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B.
- [142] Clemmer TP, Fisher CJ Jr, Bone RC, Slotman GJ, Metz CA, Thomas FO. Hypothermia in the sepsis syndrome and clinical outcome. The Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* 1992;20:1395-1401; PMID:1395659. doi:10.1097/00003246-199210000-00006.
- [143] Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:R1244-R1252; PMID:16081879. doi:10.1152/ajpregu.00370.2005.
- [144] Steiner AA, Chakravarty S, Robbins JR, Dragic AS, Pan J, Herkenham M, Romanovsky AA. Thermoregulatory responses of rats to conventional preparations of lipopolysaccharide are caused by lipopolysaccharide per se – not by lipoprotein contaminants. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:R348-R352; PMID:15860647. doi:10.1152/ajpregu.00223.2005.
- [145] Romanovsky AA, Szekely M. Fever and hypothermia: two adaptive thermoregulatory responses to systemic inflammation. *Med Hypotheses.* 1998;50:219-226; PMID:9578327. doi:10.1016/S0306-9877(98)90022-6.
- [146] Steiner AA, Dogan MD, Ivanov AI, Patel S, Rudaya AY, Jennings DH, Orchinik M, Pace TW, O'Connor KA, Watkins LR, et al. A new function of the leptin receptor: mediation of the recovery from lipopolysaccharide-induced hypothermia. *FASEB J.* 2004;18:1949-1951; PMID:15388670. doi:10.1096/fj.04-2295.fje.
- [147] Faggioni R, Fantuzzi G, Gabay C, Moser A, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C. Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am J Physiol.* 1999;276:R136-R142; PMID:9887187.
- [148] Bik W, Wolinska-Witort E, Chmielowska M, Rusiecka-Kuczalek E, Baranowska B. Does leptin modulate immune and endocrine response in the time of LPS-induced acute inflammation?. *Neuro Endocrinol Lett.* 2001;22:208-214; PMID:11449193.
- [149] Faggioni R, Moser A, Feingold KR, Grunfeld C. Reduced leptin levels in starvation increase susceptibility to endotoxic shock. *Am J Pathol.* 2000;156:1781-1787; PMID:10793089. doi:10.1016/S0002-9440(10)65049-3.
- [150] Molnar D, Milner RD. Metabolic and hormonal response to endotoxin fever in fed and starved one-week rabbits. *Biol Neonate.* 1983;44:309-314; PMID:6357299. doi:10.1159/000241732.
- [151] Shido O, Nagasaka T, Watanabe T. Blunted febrile response to intravenous endotoxin in starved rats. *J Appl Physiol.* 1989;67:963-969; PMID:2793726.
- [152] Inoue W, Luheshi GN. Acute starvation alters lipopolysaccharide-induced fever in leptin-dependent and -independent mechanisms in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299:R1709-R1719; PMID:20943858. doi:10.1152/ajpregu.00567.2010.
- [153] Steiner AA, Romanovsky AA. Leptin: at the crossroads of energy balance and systemic inflammation. *Prog Lipid Res.* 2007;46:89-107; PMID:17275915. doi:10.1016/j.plipres.2006.11.001.
- [154] Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, Turek VF. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci.* 2005;10:2193-2216; PMID:15970487. doi:10.2741/1690.
- [155] Pohl J, Woodside B, Luheshi GN. Leptin modulates the late fever response to LPS in diet-induced obese animals. *Brain Behav Immun.* 2014;42:41-47; PMID:25108212. doi:10.1016/j.bbi.2014.07.017.
- [156] Koenig S, Luheshi GN, Wenz T, Gerstberger R, Roth J, Rummel C. Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat. *Brain Behav Immun.* 2014;36:128-138; PMID:24513873. doi:10.1016/j.bbi.2013.10.019.
- [157] Timmerman RJ, Thompson J, Noordzij HM, van der Meer JW. Psychogenic periodic fever. *Nethe J Med.* 1992;41:158-160; PMID:1470287.
- [158] Lkhagvasuren B, Nakamura Y, Oka T, Sudo N, Nakamura K. Social defeat stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region. *Eur J Neurosci.* 2011;34:1442-1452; PMID:21978215. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07863.x.
- [159] Nakamura K. Neural circuit for psychological stress-induced hyperthermia. *Temperature.* 2015;2:352-361; PMID:27227049. doi:10.1080/23328940.2015.1070944.
- [160] Simonds SE, Pryor JT, Ravussin E, Greenway FL, Dileone R, Allen AM, Bassi J, Elmquist JK, Keogh JM, Henning E, et al. Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. *Cell.* 2014;159:1404-1416; PMID:25480301. doi:10.1016/j.cell.2014.10.058.
- [161] Tallam LS, Stec DE, Willis MA, da Silva AA, Hall JE. Melanocortin-4 receptor-deficient mice are not hypertensive or salt-sensitive despite obesity, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia. *Hypertension.* 2005;46:326-332; PMID:16027245. doi:10.1161/01.HYP.0000175474.99326.bf.
- [162] Sohn J-W, Harris Louise E, Berglund Eric D, Liu T, Vong L, Lowell Bradford B, Balthasar N, Williams KW, Elmquist JK. Melanocortin 4 receptors reciprocally regulate sympathetic and parasympathetic preganglionic neurons. *Cell.* 2013;152:612-619; PMID:23374353. doi:10.1016/j.cell.2012.12.022.

- [163] Rossi J, Balthasar N, Olson D, Scott M, Berglund E, Lee CE, Choi MJ, Lauzon D, Lowell BB, Elmquist JK. Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab.* 2011;13:195-204; PMID:21284986. doi:10.1016/j.cmet.2011.01.010.
- [164] Eikelis N, Schlaich M, Aggarwal A, Kaye D, Esler M. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension.* 2003;41:1072-1079; PMID:12668587. doi:10.1161/01.HYP.0000066289.17754.49.
- [165] Pedrosa JA, Buonfiglio DC, Cardinali LI, Furigo IC, Ramos-Lobo AM, Tirapegui J, Elias CF, 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.* 2014;3:608-618; PMID:25161884. doi:10.1016/j.molmet.2014.06.001.
- [166] Huo L, Gamber K, Greeley S, Silva J, Huntoon N, Leng XH, Bjørbaek C. Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons. *Cell Metab.* 2009;9:537-547; PMID:19490908. doi:10.1016/j.cmet.2009.05.003.
- [167] Zhang R, Dhillon H, Yin H, Yoshimura A, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS. Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. *Endocrinology.* 2008;149:5654-5661; PMID:18669597. doi:10.1210/en.2008-0805.
- [168] Meek TH, Nelson JT, Matsen ME, Dorfman MD, Guyenet SJ, Damian V, Allison MB, Scarlett JM, Nguyen HT, Thaler JP, et al. Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113:E2073-E2082; PMID:27001850. doi:10.1073/pnas.1521160113.
- [169] Tong Q, Ye C, McCrimmon RJ, Dhillon H, Choi B, Kramer MD, Yu J, Yang Z, Christiansen LM, Lee CE, et al. Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab.* 2007;5:383-393; PMID:17488640. doi:10.1016/j.cmet.2007.04.001.
- [170] Garfield AS, Shah BP, Madara JC, Burke LK, Patterson CM, Flak J, Neve RL, Evans ML, Lowell BB, Myers MG Jr, et al. A parabrachial-hypothalamic cholecystokinin neurocircuit controls counterregulatory responses to hypoglycemia. *Cell Metab.* 2014;20:1030-1037; PMID:25470549. doi:10.1016/j.cmet.2014.11.006.
- [171] Flak JN, Patterson CM, Garfield AS, D'Agostino G, Goforth PB, Sutton AK, Malec PA, Wong JM, Germani M, Jones JC, et al. Leptin-inhibited PBN neurons enhance responses to hypoglycemia in negative energy balance. *Nat Neurosci.* 2014;17:1744-1750; PMID:25383904. doi:10.1038/nn.3861.
- [172] Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med.* 2004;351:987-997; PMID:15342807. doi:10.1056/NEJMoa040388.
- [173] Bohlen TM, Silveira MA, Zampieri TT, Frazao R, Donato J Jr Fatness rather than leptin sensitivity determines the timing of puberty in female mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;423:11-21; PMID:26762764. doi:10.1016/j.mce.2015.12.022.
- [174] Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, Liu X, Phipps SJ, Kemp CJ, Herbison AE, Grattan DR, Anderson GM. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology.* 2009;150:2805-2812; PMID:19179437. doi:10.1210/en.2008-1693.
- [175] Frazao R, Cravo RM, Donato J Jr, Ratra DV, Clegg DJ, Elmquist JK, Zigman JM, Williams KW, Elias CF. Shift in Kiss1 cell activity requires estrogen receptor alpha. *J Neurosci.* 2013;33:2807-2820; PMID:23407940. doi:10.1523/JNEUROSCI.1610-12.2013.
- [176] Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. Kiss-1 neurons are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol.* 2006;18:298-303; PMID:16503925. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01417.x.
- [177] Cravo RM, Frazao R, Perello M, Osborne-Lawrence S, Williams KW, Zigman JM, Vianna C, Elias CF. Leptin signaling in Kiss1 neurons arises after pubertal development. *PLoS One.* 2013;8:e58698; PMID:23505551. doi:10.1371/journal.pone.0058698.
- [178] Cravo RM, Margatho LO, Osborne-Lawrence S, Donato J Jr, Atkin S, Bookout AL, Rovinsky S, Frazão R, Lee CE, Gautron L, et al. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. *Neuroscience.* 2011;173:37-56; PMID:21093546. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.11.022.
- [179] Donato J Jr, Cravo RM, Frazão R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, Castro IA, Margatho LO, Lee S, Lee C, et al. 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.* 2011;121:355-368; PMID:21183787. doi:10.1172/JCI45106.
- [180] Donato J Jr, Cravo RM, Frazão R, Elias CF. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology.* 2011;93:9-18; PMID:21099209. doi:10.1159/000322472.
- [181] Donato J Jr, Elias CF. The ventral premammillary nucleus links metabolic cues and reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2:57; PMID:22649378.
- [182] Rondini TA, Baddini SP, Sousa LF, Bittencourt JC, Elias CF. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. *Neuroscience.* 2004;125:735-748; PMID:15099687. doi:10.1016/j.neuroscience.2003.12.045.
- [183] Leshan RL, Louis GW, Jo Y-H, Rhodes CJ, Munzberg H, Myers MG Jr Direct innervation of GnRH neurons by metabolic- and sexual odorant-sensing leptin receptor neurons in the hypothalamic ventral premammillary

- nucleus. *J Neurosci.* 2009;29:3138-3147; PMID:19279251. doi:10.1523/JNEUROSCI.0155-09.2009.
- [184] Donato J Jr, Lee C, Ratra DV, Franci CR, Canteras NS, Elias CF. Lesions of the ventral premammillary nucleus disrupt the dynamic changes in Kiss1 and GnRH expression characteristic of the proestrus-estrus transition. *Neuroscience.* 2013;241:67-79; PMID:23518222. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.03.013.
- [185] Donato J Jr, Silva RJ, Sita LV, Lee S, Lee C, Lacchini S, Bittencourt JC, Franci CR, Canteras NS, Elias CF. The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. *J Neurosci.* 2009;29:5240-5250; PMID:19386920. doi:10.1523/JNEUROSCI.0405-09.2009.
- [186] Bellefontaine N, Chachlaki K, Parkash J, Vanacker C, Colledge W, d'Anglemont de Tassigny X, Garthwaite J, Bouret SG, Prevot V. Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J Clin Invest.* 2014;124:2550-2559; PMID:24812663. doi:10.1172/JCI65928.
- [187] Sheffer-Babila S, Sun Y, Israel DD, Liu SM, Neal-Perry G, Chua SC Jr Agouti-related peptide plays a critical role in leptin's effects on female puberty and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305:E1512-E1520; PMID:24169048. doi:10.1152/ajpendo.00241.2013.
- [188] Wu Q, Whiddon BB, Palmiter RD. Ablation of neurons expressing agouti-related protein, but not melanin concentrating hormone, in leptin-deficient mice restores metabolic functions and fertility. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:3155-3160; PMID:22232663. doi:10.1073/pnas.1120501109.
- [189] Roa J, Herbison AE. Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. *Endocrinology.* 2012;153:5587-5599; PMID:22948210. doi:10.1210/en.2012-1470.
- [190] Hill JW, Elias CF, Fukuda M, Williams KW, Berglund ED, Holland WL, Cho YR, Chuang JC, Xu Y, Choi M, et al. Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab.* 2010;11:286-297; PMID:20374961. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.002.
- [191] Liu J, Perez SM, Zhang W, Lodge DJ, Lu XY. Selective deletion of the leptin receptor in dopamine neurons produces anxiogenic-like behavior and increases dopaminergic activity in amygdala. *Mol Psychiatry.* 2011;16:1024-1038; PMID:21483433. doi:10.1038/mp.2011.36.
- [192] Bereiter DA, Jeanrenaud B. Altered neuroanatomical organization in the central nervous system of the genetically obese (ob/ob) mouse. *Brain Res.* 1979;165:249-260; PMID:421139. doi:10.1016/0006-8993(79)90557-2.
- [193] Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, Flier JS. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology.* 1999;140:2755-2762; PMID:10342866. doi:10.1210/endo.140.6.6774.
- [194] Matochik JA, London ED, Yildiz BO, Ozata M, Caglayan S, DePaoli AM, Wong ML, Licinio J. Effect of leptin replacement on brain structure in genetically leptin-deficient adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:2851-2854; PMID:15713712. doi:10.1210/jc.2004-1979.
- [195] Mistry AM, Swick A, Romsos DR. Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *Am J Physiol.* 1999;277:R742-R747; PMID:10484491.
- [196] Ishii Y, Bouret SG. Embryonic birthdate of hypothalamic leptin-activated neurons in mice. *Endocrinology.* 2012;153:3657-3667; PMID:22621961. doi:10.1210/en.2012-1328.
- [197] Pan W, Hsueh H, Tu H, Kastin AJ. Developmental changes of leptin receptors in cerebral microvessels: unexpected relation to leptin transport. *Endocrinology.* 2008;149:877-885; PMID:18039787. doi:10.1210/en.2007-0893.
- [198] Bouret SG. Crossing the border: developmental regulation of leptin transport to the brain. *Endocrinology.* 2008;149:875-876; PMID:18292198. doi:10.1210/en.2007-1698.
- [199] Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest.* 1998;101:1020-1027; PMID:9486972. doi:10.1172/JCI1176.
- [200] Markakis EA. Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* 2002;23:257-291; PMID:12127306. doi:10.1016/S0091-3022(02)00003-1.
- [201] Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci.* 2004;24:2797-2805; PMID:15028773. doi:10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004.
- [202] Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science.* 2004;304:110-115; PMID:15064421. doi:10.1126/science.1089459.
- [203] O'Malley D, Irving AJ, Harvey J. Leptin-induced dynamic alterations in the actin cytoskeleton mediate the activation and synaptic clustering of BK channels. *FASEB J.* 2005;19:1917-1919; PMID:16166199. doi:10.1096/fj.05-4166fj.
- [204] Shanley LJ, O'Malley D, Irving AJ, Ashford ML, Harvey J. Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J Physiol.* 2002;545:933-944; PMID:12482897. doi:10.1113/jphysiol.2002.029488.
- [205] Ayyildiz M, Yildirim M, Agar E, Baltaci AK. The effect of leptin on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Brain Res Bull.* 2006;68:374-378; PMID:16377445. doi:10.1016/j.brainresbull.2005.09.012.
- [206] Li XL, Aou S, Oomura Y, Hori N, Fukunaga K, Hori T. Impairment of long-term potentiation and spatial

- memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience*. 2002;113:607-615; PMID:12150780. doi:10.1016/S0306-4522(02)00162-8.
- [207] Sena A, Sarlieve LL, Rebel G. Brain myelin of genetically obese mice. *J Neurol Sci*. 1985;68:233-243; PMID:2989440. doi:10.1016/0022-510X(85)90104-2.
- [208] Winocur G, Greenwood CE, Piroli GG, Grillo CA, Reznikov LR, Reagan LP, McEwen BS. Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci*. 2005;119:1389-1395; PMID:16300445. doi:10.1037/0735-7044.119.5.1389.
- [209] Paz-Filho GJ, Babikian T, Asarnow R, Delibasi T, Esposito K, Erol HK, Wong M-L, Licinio J. Leptin replacement improves cognitive development. *PLoS One*. 2008;3:e3098; PMID:18769731. doi:10.1371/journal.pone.0003098.
- [210] Sharma AN, Elased KM, Garrett TL, Lucot JB. Neurobehavioral deficits in db/db diabetic mice. *Physiol Behav*. 2010;101:381-388; PMID:20637218. doi:10.1016/j.physbeh.2010.07.002.
- [211] Harvey J. Leptin regulation of neuronal excitability and cognitive function. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7:643-647; PMID:18024215. doi:10.1016/j.coph.2007.10.006.
- [212] Lu X-Y, Kim CS, Frazer A, Zhang W. Leptin: a potential novel antidepressant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:1593-1598; PMID:16423896. doi:10.1073/pnas.0508901103.
- [213] Wabitsch M, Funcke JB, Lennerz B, Kuhnle-Krahl U, Lahr G, Debatin KM, Vatter P, Gierschik P, Moepps B, Fischer-Posovszky P. Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity. *N Engl J Med*. 2015;372:48-54; PMID:25551525. doi:10.1056/NEJMoa1406653.
- [214] Farooqi S, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev*. 2006;27:710-718; PMID:17122358. doi:10.1210/er.2006-0040.
- [215] Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA*. 1999;282:1568-1575; PMID:10546697. doi:10.1001/jama.282.16.1568.
- [216] Hukshorn CJ, Saris WH, Westerterp-Plantenga MS, Farid AR, Smith FJ, Campfield LA. Weekly subcutaneous pegylated recombinant native human leptin (PEG-OB) administration in obese men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4003-4009; PMID:11095423. doi:10.1210/jcem.85.11.6955.
- [217] Hukshorn CJ, van Dielen FM, Buurman WA, Westerterp-Plantenga MS, Campfield LA, Saris WH. The effect of pegylated recombinant human leptin (PEG-OB) on weight loss and inflammatory status in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26:504-509; PMID:12075577. doi:10.1038/sj.ijo.0801952.
- [218] Hukshorn CJ, Menheere PP, Westerterp-Plantenga MS, Saris WH. The effect of pegylated human recombinant leptin (PEG-OB) on neuroendocrine adaptations to semi-starvation in overweight men. *Eur J Endocrinol*. 2003;148:649-655; PMID:12773137. doi:10.1530/eje.0.1480649.
- [219] Hukshorn CJ, Westerterp-Plantenga MS, Saris WH. Pegylated human recombinant leptin (PEG-OB) causes additional weight loss in severely energy-restricted, overweight men. *Am J Clin Nutr*. 2003;77:771-776; PMID:12663271.
- [220] Lejeune MP, Hukshorn CJ, Saris WH, Westerterp-Plantenga MS. Effect of dietary restraint during and following pegylated recombinant leptin (PEG-OB) treatment of overweight men. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27:1494-1499; PMID:14634680. doi:10.1038/sj.ijo.0802431.
- [221] Korner J, Conroy R, Febres G, McMahon DJ, Conwell I, Karmally W, Aronne LJ. Randomized double-blind placebo-controlled study of leptin administration after gastric bypass. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21:951-956; PMID:23512892. doi:10.1002/oby.20433.
- [222] Shetty GK, Matarese G, Magkos F, Moon HS, Liu X, Brennan AM, Mylvaganam G, Sykoutri D, Depaoli AM, Mantzoros CS. Leptin administration to overweight and obese subjects for 6 months increases free leptin concentrations but does not alter circulating hormones of the thyroid and IGF axes during weight loss induced by a mild hypocaloric diet. *Eur J Endocrinol*. 2011;165:249-254; PMID:21602313. doi:10.1530/EJE-11-0252.
- [223] Kissileff HR, Thornton JC, Torres MI, Pavlovich K, Mayer LS, Kalari V, Leibel RL, Rosenbaum M. Leptin reverses declines in satiation in weight-reduced obese humans. *Am J Clin Nutr*. 2012;95:309-317; PMID:22237063. doi:10.3945/ajcn.111.012385.
- [224] Rosenbaum M, Sy M, Pavlovich K, Leibel RL, Hirsch J. Leptin reverses weight loss-induced changes in regional neural activity responses to visual food stimuli. *J Clin Invest*. 2008;118:2583-2591; PMID:18568078. doi:10.1172/JCI35055.
- [225] Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*. 1999;401:73-76; PMID:10485707. doi:10.1038/43448.
- [226] Oral EA, Simha V, Ruiz E, Andewelt A, Premkumar A, Snell P, Wagner AJ, DePaoli AM, Reitman ML, Taylor SI, et al. Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med*. 2002;346:570-578; PMID:11856796. doi:10.1056/NEJMoa012437.
- [227] Petersen KF, Oral EA, Dufour S, Befroy D, Ariyan C, Yu C, Cline GW, DePaoli AM, Taylor SI, Gorden P, et al. Leptin reverses insulin resistance and hepatic steatosis in patients with severe lipodystrophy. *J Clin Invest*. 2002;109:1345-1350; PMID:12021250. doi:10.1172/JCI0215001.
- [228] Javor ED, Cochran EK, Musso C, Young JR, DePaoli AM, Gorden P. Long-term efficacy of leptin replacement in patients with generalized lipodystrophy.

- Diabetes. 2005;54:1994-2002; PMID:15983199. doi:10.2337/diabetes.54.7.1994.
- [229] Sekhar RV, Jahoor F, Iyer D, Guthikonda A, Paraniham J, Elhaj F, Coraza I, Balasubramanyam A. Leptin replacement therapy does not improve the abnormal lipid kinetics of hypoleptinemic patients with HIV-associated lipodystrophy syndrome. *Metabolism*. 2012;61:1395-1403; PMID:22542724. doi:10.1016/j.metabol.2012.03.013.
- [230] Magkos F, Brennan A, Sweeney L, Kang ES, Doweiko J, Karchmer AW, Mantzoros CS. Leptin replacement improves postprandial glycemia and insulin sensitivity in human immunodeficiency virus-infected lipotrophic men treated with pioglitazone: a pilot study. *Metabolism*. 2011;60:1045-1049; PMID:21081243. doi:10.1016/j.metabol.2010.10.002.
- [231] Park JY, Chong AY, Cochran EK, Kleiner DE, Haller MJ, Schatz DA, Gordon P. Type 1 diabetes associated with acquired generalized lipodystrophy and insulin resistance: the effect of long-term leptin therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:26-31; PMID:17940115. doi:10.1210/jc.2007-1856.
- [232] Mittendorfer B, Horowitz JF, DePaoli AM, McCamish MA, Patterson BW, Klein S. Recombinant human leptin treatment does not improve insulin action in obese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011;60:1474-1477; PMID:21411512. doi:10.2337/db10-1302.
- [233] Moon HS, Matarese G, Brennan AM, Chamberland JP, Liu X, Fiorenza CG, Mylvaganam GH, Abanni L, Carbone F, Williams CJ, et al. Efficacy of metreleptin in obese patients with type 2 diabetes: cellular and molecular pathways underlying leptin tolerance. *Diabetes*. 2011;60:1647-1656; PMID:21617185. doi:10.2337/db10-1791.
- [234] Wang MY, Chen L, Clark GO, Lee Y, Stevens RD, Ilkayeva OR, Wenner BR, Bain JR, Charron MJ, Newgard CB, et al. Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:4813-4819; PMID:20194735. doi:10.1073/pnas.0909422107.
- [235] Fujikawa T, Chuang JC, Sakata I, Ramadori G, Coppari R. Leptin therapy improves insulin-deficient type 1 diabetes by CNS-dependent mechanisms in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107:17391-17396; PMID:20855609. doi:10.1073/pnas.1008025107.
- [236] Fujikawa T, Berglund ED, Patel VR, Ramadori G, Vianna CR, Vong L, Thorel F, Chera S, Herrera PL, Lowell BB, et al. Leptin engages a hypothalamic neurocircuitry to permit survival in the absence of insulin. *Cell Metab*. 2013;18:431-444; PMID:24011077. doi:10.1016/j.cmet.2013.08.004.
- [237] Raskin P, Unger RH. Hyperglucagonemia and its suppression. Importance in the metabolic control of diabetes. *N Engl J Med*. 1978;299:433-436; PMID:683275. doi:10.1056/NEJM197808312990901.
- [238] Lee Y, Wang MY, Du XQ, Charron MJ, Unger RH. Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice. *Diabetes*. 2011;60:391-397; PMID:21270251. doi:10.2337/db10-0426.
- [239] Lee Y, Berglund ED, Wang MY, Fu X, Yu X, Charron MJ, Burgess SC, Unger RH. Metabolic manifestations of insulin deficiency do not occur without glucagon action. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:14972-14976; PMID:22891336. doi:10.1073/pnas.1205983109.
- [240] Lee Y, Berglund ED, Yu X, Wang MY, Evans MR, Scherer PE, Holland WL, Charron MJ, Roth MG, Unger RH. Hyperglycemia in rodent models of type 2 diabetes requires insulin-resistant alpha cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:13217-13222; PMID:25157166. doi:10.1073/pnas.1409638111.
- [241] Chou SH, Chamberland JP, Liu X, Matarese G, Gao C, Stefanakis R, Brinkoetter MT, Gong H, Arampatzis K, Mantzoros CS. Leptin is an effective treatment for hypothalamic amenorrhea. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:6585-6590; PMID:21464293. doi:10.1073/pnas.1015674108.
- [242] Sienkiewicz E, Magkos F, Aronis KN, Brinkoetter M, Chamberland JP, Chou S, Arampatzis KM, Gao C, Koniaris A, Mantzoros CS. Long-term metreleptin treatment increases bone mineral density and content at the lumbar spine of lean hypoleptinemic women. *Metabolism*. 2011;60:1211-1221; PMID:21741057. doi:10.1016/j.metabol.2011.05.016.
- [243] Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis HR Jr. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest*. 1997;99:385-390; PMID:9022070. doi:10.1172/JCI119171.
- [244] Ottaway N, Mahbod P, Rivero B, Norman LA, Gertler A, D'Alessio DA, Perez-Tilve D. Diet-induced obese mice retain endogenous leptin action. *Cell Metab*. 2015;21:877-882; PMID:25980347. doi:10.1016/j.cmet.2015.04.015.
- [245] Olofsson LE, Unger EK, Cheung CC, Xu AW. Modulation of AgRP-neuronal function by SOCS3 as an initiating event in diet-induced hypothalamic leptin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110:E697-E706; PMID:23386726. doi:10.1073/pnas.1218284110.
- [246] Mounzih K, Qiu J, Ewart-Toland A, Chehab FF. Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology*. 1998;139:5259-5262; PMID:9832467. doi:10.1210/endo.139.12.6523.
- [247] Ladyman SR, Grattan DR. Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. *Endocrinology*. 2005;146:3868-3874; PMID:15905318. doi:10.1210/en.2005-0194.
- [248] Ladyman SR, Fieldwick DM, Grattan DR. Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse.

- Reproduction. 2012;144:83-90; PMID:22580369. doi:10.1530/REP-12-0112.
- [249] Zampieri TT, Ramos-Lobo AM, Furigo IC, Pedrosa JA, Buonfiglio DC, Donato J Jr SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes. *Mol Metab.* 2015;4:237-245; PMID:25737950. doi:10.1016/j.molmet.2014.12.005.
- [250] Zampieri TT, da Silva TE, de Paula Romeu D, da Silva Torrao A, Donato J Jr SOCS3 expression within leptin receptor-expressing cells regulates food intake and leptin sensitivity but does not affect weight gain in pregnant mice consuming a high-fat diet. *Physiol Behav.* 2016;157:109-115; PMID:26828039. doi:10.1016/j.physbeh.2016.01.039.
- [251] Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides.* 1996;17:305-311; PMID:8801538. doi:10.1016/0196-9781(96)00025-3.
- [252] Caro JF, Kolarzynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 1996;348:159-161; PMID:8684156. doi:10.1016/S0140-6736(96)03173-X.
- [253] Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med.* 1996;2:589-593; PMID:8616722. doi:10.1038/nm0596-589.
- [254] Kastin AJ, Pan W, Maness LM, Koletsky RJ, Ernberger P. Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides.* 1999;20:1449-1453; PMID:10698121. doi:10.1016/S0196-9781(99)00156-4.
- [255] Hileman SM, Tornøe J, Flier JS, Bjorbaek C. Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby canine kidney cells. *Endocrinology.* 2000;141:1955-1961; PMID:10830277. doi:10.1210/endo.141.6.7450.
- [256] Banks WA, Niehoff ML, Martin D, Farrell CL. Leptin transport across the blood-brain barrier of the Koletsky rat is not mediated by a product of the leptin receptor gene. *Brain Res.* 2002;950:130-136; PMID:12231237. doi:10.1016/S0006-8993(02)03013-5.
- [257] Li Z, Ceccarini G, Eisenstein M, Tan K, Friedman JM. Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor. *Mol Metab.* 2013;2:364-375; PMID:24327953. doi:10.1016/j.molmet.2013.07.007.
- [258] Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, et al. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* 2014;19:293-301; PMID:24506870. doi:10.1016/j.cmet.2013.12.015.
- [259] Myers MG Jr, Leibel RL, Seeley RJ, Schwartz MW. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21:643-651; PMID:20846876. doi:10.1016/j.tem.2010.08.002.
- [260] Ravussin Y, LeDuc CA, Watanabe K, Mueller BR, Skowronski A, Rosenbaum M, Leibel RL. Effects of chronic leptin infusion on subsequent body weight and composition in mice: can body weight set point be reset?. *Mol Metab.* 2014;3:432-440; PMID:24944902. doi:10.1016/j.molmet.2014.02.003.
- [261] Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cell.* 2001;19:378-387; PMID:11553846. doi:10.1634/stemcells.19-5-378.
- [262] Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell.* 1998;1:619-625; PMID:9660946. doi:10.1016/S1097-2765(00)80062-3.
- [263] Bjorbaek C, El-Hashimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem.* 1999;274:30059-30065; PMID:10514492. doi:10.1074/jbc.274.42.30059.
- [264] Bjornholm M, Munzberg H, Leshan RL, Villanueva EC, Bates SH, Louis GW, Jones JC, Ishida-Takahashi R, Bjorbaek C, Myers MG Jr. Mice lacking inhibitory leptin receptor signals are lean with normal endocrine function. *J Clin Invest.* 2007;117:1354-1360; PMID:17415414. doi:10.1172/JCI30688.
- [265] Kievit P, Howard JK, Badman MK, Balthasar N, Coppari R, Mori H, Lee CE, Elmquist JK, Yoshimura A, Flier JS. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metab.* 2006;4:123-132; PMID:16890540. doi:10.1016/j.cmet.2006.06.010.
- [266] Briancon N, McNay DE, Maratos-Flier E, Flier JS. 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.* 2010;59:3074-3084; PMID:20876718. doi:10.2337/db10-0481.
- [267] Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjorbaek C, Flier JS. Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med.* 2004;10:734-738; PMID:15220914. doi:10.1038/nm1072.
- [268] Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med.* 2004;10:739-743; PMID:15208705. doi:10.1038/nm1071.
- [269] Matarazzo V, Schaller F, Nedelec E, Benani A, Penicaud L, Muscatelli F, Moysé E, Bauer S. Inactivation of Socs3 in the hypothalamus enhances the hindbrain response to endogenous satiety signals via oxytocin signaling. *J Neurosci.* 2012;32:17097-17107; PMID:23197703. doi:10.1523/JNEUROSCI.1669-12.2012.

- [270] Reed AS, Unger EK, Olofsson LE, Piper ML, Myers MG Jr, Xu AW. Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes*. 2010;59:894-906; PMID:20068134. doi:10.2337/db09-1024.
- [271] Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17:365-371; PMID:17010638. doi:10.1016/j.tem.2006.09.007.
- [272] Augustine RA, Grattan DR. Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. *Endocrinology*. 2008;149:1049-1055; PMID:18063686. doi:10.1210/en.2007-1018.
- [273] Naef L, Woodside B. Prolactin/leptin interactions in the control of food intake in rats. *Endocrinology*. 2007;148:5977-5983; PMID:17872372. doi:10.1210/en.2007-0442.
- [274] Anderson GM, Beijer P, Bang AS, Fenwick MA, Bunn SJ, Grattan DR. 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*. 2006;147:4996-5005; PMID:16857756. doi:10.1210/en.2005-0755.
- [275] St-Pierre J, Tremblay ML. Modulation of leptin resistance by protein tyrosine phosphatases. *Cell Metab*. 2012;15:292-297; PMID:22405067. doi:10.1016/j.cmet.2012.02.004.
- [276] Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, Kahn BB. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat Med*. 2006;12:917-924; PMID:16845389. doi:10.1038/nm1435.
- [277] Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger PE, White DW, Jirousek MR, Trevillyan JM. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;195:109-118; PMID:12354677. doi:10.1016/S0303-7207(02)00178-8.
- [278] Loh K, Fukushima A, Zhang X, Galic S, Briggs D, Enriori PJ, Simonds S, Wiede F, Reichenbach A, Hauser C, et al. Elevated hypothalamic TCPTP in obesity contributes to cellular leptin resistance. *Cell Metab*. 2011;14:684-699; PMID:22000926. doi:10.1016/j.cmet.2011.09.011.
- [279] Rousso-Noori L, Knobler H, Levy-Apter E, Kuperman Y, Neufeld-Cohen A, Keshet Y, Akepati VR, Klinghoffer RA, Chen A, Elson A. Protein tyrosine phosphatase epsilon affects body weight by downregulating leptin signaling in a phosphorylation-dependent manner. *Cell Metab*. 2011;13:562-572; PMID:21531338. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.017.
- [280] Tsou RC, Zimmer DJ, De Jonghe BC, Bence KK. Deficiency of PTP1B in leptin receptor-expressing neurons leads to decreased body weight and adiposity in mice. *Endocrinology*. 2012;153:4227-4237; PMID:22802463. doi:10.1210/en.2012-1548.
- [281] Zhang EE, Chapeau E, Hagihara K, Feng GS. Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:16064-16069; PMID:15520383. doi:10.1073/pnas.0405041101.
- [282] Banno R, Zimmer D, De Jonghe BC, Atienza M, Rak K, Yang W, Bence KK. PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:720-734; PMID:20160350. doi:10.1172/JCI39620.
- [283] Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E1247-E1259; PMID:19724019. doi:10.1152/ajpendo.00274.2009.
- [284] Ren D, Zhou Y, Morris D, Li M, Li Z, Rui L. Neuronal SH2B1 is essential for controlling energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2007;117:397-406; PMID:17235396. doi:10.1172/JCI29417.
- [285] Velloso LA, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota, and metabolic inflammation. *Endocr Rev*. 2015;36:245-271; PMID:25811237. doi:10.1210/er.2014-1100.
- [286] Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*. 2012;18:59-68; PMID:21889406. doi:10.1016/j.molmed.2011.07.010.
- [287] De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146:4192-4199; PMID:16002529. doi:10.1210/en.2004-1520.
- [288] Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carnevali JB, Oliveira AL, Saad MJ, et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One*. 2009;4:e5045; PMID:19340313. doi:10.1371/journal.pone.0005045.
- [289] McNay DEG, Briancon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest*. 2012;122:142-152; PMID:22201680. doi:10.1172/JCI43134.
- [290] Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. 2009;29:359-370; PMID:19144836. doi:10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009.
- [291] Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135:61-73; PMID:18854155. doi:10.1016/j.cell.2008.07.043.

- [292] Amaral ME, Barbuio R, Milanski M, Romanatto T, Barbosa HC, Nadruz W, Bertolo MB, Boschero AC, Saad MJ, Franchini KG, et al. Tumor necrosis factor- α activates signal transduction in hypothalamus and modulates the expression of pro-inflammatory proteins and orexigenic/anorexigenic neurotransmitters. *J Neurochem.* 2006;98:203-212; PMID:16638016. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03857.x.
- [293] Nakamura T, Furuhashi M, Li P, Cao H, Tuncman G, Sonenberg N, Gorgun CZ, Hotamisligil GS. Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. *Cell.* 2010;140:338-348; PMID:20144759. doi:10.1016/j.cell.2010.01.001.
- [294] Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.* 2009;9:35-51; PMID:19117545. doi:10.1016/j.cmet.2008.12.004.
- [295] Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol Pharmacol.* 2008;74:1610-1619; PMID:18755873. doi:10.1124/mol.108.050070.
- [296] de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev.* 2015;16:207-224; PMID:25589226. doi:10.1111/obr.12243.
- [297] Balland E, Cowley MA. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Front Neuroendocrinol.* 2015;39:59-65; PMID:26410445. doi:10.1016/j.yfrne.2015.09.004.
- [298] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444:1027-1031; PMID:17183312. doi:10.1038/nature05414.
- [299] Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature.* 2012;488:178-184; PMID:22797518. doi:10.1038/nature11319.
- [300] Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, Almeida M, Quinquis B, Levenez F, Galleron N, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature.* 2013;500:585-588; PMID:23985875. doi:10.1038/nature12480.
- [301] Johnson AM, Olefsky JM. The origins and drivers of insulin resistance. *Cell.* 2013;152:673-684; PMID:23415219. doi:10.1016/j.cell.2013.01.041.
- [302] Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 2014;514:181-186; PMID:25231862. doi:10.1038/nature13793.
- [303] Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, Gewirtz AT. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature.* 2015;519:92-96; PMID:25731162. doi:10.1038/nature14232.
- [304] Donato J Jr. The central nervous system as a promising target to treat diabetes mellitus. *Curr Top Med Chem.* 2012;12:2070-2081; PMID:23167796. doi:10.2174/156802612804910214.
- [305] Hung HY, Qian K, Morris-Natschke SL, Hsu CS, Lee KH. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Nat Prod Rep.* 2012;29:580-606; PMID:22491825. doi:10.1039/c2np00074a.
- [306] Sasaki T. Age-associated weight gain, Leptin, and SIRT1. A possible role for hypothalamic SIRT1 in the prevention of weight gain and aging through modulation of leptin sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:109; PMID:26236282. doi:10.3389/fendo.2015.00109.
- [307] Lee J, Liu J, Feng X, Salazar Hernandez MA, Mucka P, Ibi D, Choi JW, Ozcan U. Withaferin A is a leptin sensitizer with strong antidiabetic properties in mice. *Nat Med.* 2016;22:1023-1032; PMID:27479085. doi:10.1038/nm.4145.
- [308] Liu J, Lee J, Salazar Hernandez MA, Mazitschek R, Ozcan U. Treatment of obesity with celastrol. *Cell.* 2015;161:999-1011; PMID:26000480. doi:10.1016/j.cell.2015.05.011.
- [309] Roth JD, Roland BL, Cole RL, Trevaskis JL, Weyer C, Koda JE, Anderson CM, Parkes DG, Baron AD. Leptin responsiveness restored by amylin agonism in diet-induced obesity: evidence from nonclinical and clinical studies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105:7257-7262; PMID:18458326. doi:10.1073/pnas.0706473105.
- [310] Trevaskis JL, Coffey T, Cole R, Lei C, Wittmer C, Walsh B, Weyer C, Koda J, Baron AD, Parkes DG, et al. Amylin-mediated restoration of leptin responsiveness in diet-induced obesity: magnitude and mechanisms. *Endocrinology.* 2008;149:5679-5687; PMID:18669592. doi:10.1210/en.2008-0770.
- [311] Trevaskis JL, Lei C, Koda JE, Weyer C, Parkes DG, Roth JD. Interaction of leptin and amylin in the long-term maintenance of weight loss in diet-induced obese rats. *Obesity.* 2009;18:21-26; PMID:19543217. doi:10.1038/oby.2009.187.
- [312] Kusakabe T, Ebihara K, Sakai T, Miyamoto L, Aotani D, Yamamoto Y, Yamamoto-Kataoka S, Aizawa-Abe M, Fujikura J, Hosoda K, et al. Amylin improves the effect of leptin on insulin sensitivity in leptin-resistant diet-induced obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012;302:E924-E931; PMID:22275759. doi:10.1152/ajpendo.00198.2011.
- [313] Muller TD, Sullivan LM, Habegger K, Yi CX, Kabra D, Grant E, Ottaway N, Krishna R, Holland J, Hembree J, et al. Restoration of leptin responsiveness in diet-induced obese mice using an optimized leptin analog in combination with exendin-4 or FGF21. *J Pept Sci.* 2012;18:383-393; PMID:22565812. doi:10.1002/psc.2408.
- [314] Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, de Souza CT, Grimaldi R, Stahl M, Carvalheira JB, Saad MJ,

- et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PLoS One*. 2012;7:e30571; PMID:22279596. doi:10.1371/journal.pone.0030571.
- [315] Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010;142:687-698; PMID:20813258. doi:10.1016/j.cell.2010.07.041.
- [316] Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I, Leloire A, Liu N, Iida K, et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012;483:350-354; PMID:22343897. doi:10.1038/nature10798.
- [317] Nascimento LF, Souza GF, Morari J, Barbosa GO, Solon C, Moura RF, Victório SC, Ignácio-Souza LM, Razolli DS, Carvalho HF, et al. n-3 fatty acids induce neurogenesis of predominantly POMC-Expressing cells in the hypothalamus. *Diabetes*. 2016;65:673-686; PMID:26512023. doi:10.2337/db15-0008.
- [318] Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C, Dyck DJ. Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;286:E57-E63; PMID:14662513. doi:10.1152/ajpendo.00302.2003.
- [319] Kang S, Kim KB, Shin KO. Exercise training improves leptin sensitivity in peripheral tissue of obese rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;435:454-459; PMID:23669042. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.007.
- [320] Carhuatanta KAK, Demuro G, Tschöp MH, Pfluger PT, Benoit SC, Obici S. Voluntary exercise improves high-fat diet-induced leptin resistance independent of adiposity. *Endocrinology*. 2011;152:2655-2664; PMID:21586558. doi:10.1210/en.2010-1340.
- [321] Laing BT, Do K, Matsubara T, Wert DW, Avery MJ, Langdon EM, Zheng D, Huang H. Voluntary exercise improves hypothalamic and metabolic function in obese mice. *J Endocrinol*. 2016;229:109-122; PMID:26931136. doi:10.1530/JOE-15-0510.
- [322] Patterson CM, Bouret SG, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Three weeks of postweaning exercise in DIO rats produces prolonged increases in central leptin sensitivity and signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296:R537-R548; PMID:19158409. doi:10.1152/ajpregu.90859.2008.
- [323] Chiarreotto-Ropelle EC, Pauli LS, Katashima CK, Pimentel GD, Picardi PK, Silva VR, de Souza CT, Prada PO, Cintra DE, Carvalheira JB, et al. Acute exercise suppresses hypothalamic PTP1B protein level and improves insulin and leptin signaling in obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305:E649-E659; PMID:23880311. doi:10.1152/ajpendo.00272.2013.
- [324] McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*. 2005;85:571-633; PMID:15788706. doi:10.1152/physrev.00053.2003.
- [325] Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*. 2001;60:5-20; PMID:11809615. doi:10.1093/bmb/60.1.5.
- [326] Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*. 1976;295:349-353; PMID:934222. doi:10.1056/NEJM197608122950701.
- [327] Baquero AF, de Solis AJ, Lindsley SR, Kirigiti MA, Smith MS, Cowley MA, Zeltser LM, Grove KL. Developmental switch of leptin signaling in arcuate nucleus neurons. *J Neurosci*. 2014;34:9982-9994; PMID:25057200. doi:10.1523/JNEUROSCI.0933-14.2014.
- [328] Juan De Solis A, Baquero AF, Bennett CM, Grove KL, Zeltser LM. Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. *Mol Metab*. 2016;5:198-209; PMID:26977392. doi:10.1016/j.molmet.2016.01.003.
- [329] Ralevski A, Horvath TL. Developmental programming of hypothalamic neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 2015;39:52-58; PMID:26391503. doi:10.1016/j.yfrne.2015.09.002.
- [330] Guo F, Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav*. 1995;57:681-686; PMID:7777603. doi:10.1016/0031-9384(94)00342-4.
- [331] Bayol SA, Farrington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr*. 2007;98:843-851; PMID:17697422. doi:10.1017/S0007114507812037.
- [332] Vogt Merly C, Paeger L, Hess S, Steculorum Sophie M, Awazawa M, Hampel B, Neupert S, Nicholls HT, Mauer J, Hausen AC, et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell*. 2014;156:495-509; PMID:24462248. doi:10.1016/j.cell.2014.01.008.
- [333] Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*. 2005;115:e290-e296; PMID:15741354. doi:10.1542/peds.2004-1808.
- [334] Attig L, Solomon G, Ferezou J, Abdennebi-Najar L, Taouis M, Gertler A, Djiane J. Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32:1153-1160; PMID:18379577. doi:10.1038/ijo.2008.39.
- [335] Jaquet D, Leger J, Levy-Marchal C, Oury JF, Czernichow P. Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:1243-1246; PMID:9543149. doi:10.1210/jcem.83.4.4731.
- [336] Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, Gertler A, Breier BH, Harris M. Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology*. 2005;146:4211-4216; PMID:16020474. doi:10.1210/en.2005-0581.

Artigo 2

Physiological Reports

Open Access

Physiological Reports ISSN 2051-817X

ORIGINAL RESEARCH

Maternal metabolic adaptations are necessary for normal offspring growth and brain development

Angela M. Ramos-Lobo*, Isadora C. Furigo*, Priscila D. S. Teixeira, Thais T. Zampieri, Frederick Wasinski, Daniella C. Buonfiglio & Jose Donato Jr.

Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Keywords

Energy balance, glucose homeostasis, hypothalamus, metabolic programming.

Correspondence

Jose Donato Jr., Av. Prof. Lineu Prestes, 1524, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.
 Tel: +55-11-3091-0929
 Fax: +55-11-3091-7285
 E-mail: jdonato@icb.usp.br

Funding Information

This study was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Brazil) via grants (2015/10992-6) and fellowships (2012/15517-6, 2014/11752-6, 2016/09679-4, and 2016/20897-3).

Received: 16 November 2017; Revised: 7 February 2018; Accepted: 12 February 2018

doi: 10.14814/phy2.13643

Physiol Rep, 6 (5), 2018, e13643,
<https://doi.org/10.14814/phy2.13643>

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

Abstract

Several metabolic adaptations emerge during pregnancy and continue through lactation, including increases in food intake and body weight, as well as insulin and leptin resistance. These maternal adaptations are thought to play a role in offspring viability and success. Using a model of attenuated maternal metabolic adaptations induced by ablation of the *Socs3* gene in leptin receptor expressing cells (SOCS3 KO mice), our study aimed to investigate whether maternal metabolic changes are required for normal offspring development, and if their absence causes metabolic imbalances in adulthood. The litters were subjected to a cross-fostering experimental design to distinguish the pre-natal and postnatal effects caused by maternal metabolic adaptations. Males either born or raised by SOCS3 KO mice showed reduced body weight until 8 weeks of life. Both adult males and females born or raised by SOCS3 KO mice also had lower body adiposity. Despite that, no significant changes in energy expenditure, glucose tolerance or insulin resistance were observed. However, males either born or raised by SOCS3 KO mice showed reduced brain mass in adulthood. Furthermore, animals born from SOCS3 KO mice also had lower proopiomelanocortin fiber density in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. In conclusion, these findings indicate that the commonly observed metabolic changes in pregnancy and lactation are necessary for normal offspring growth and brain development.

Introduction

Pregnancy and lactation are exceptional moments, in which females not only need to attend their own energetic demands but also provide energy to their offspring (Ladyman et al. 2010; Woodside et al. 2012). Several metabolic adaptations emerge during these periods, helping to supply the additional energy required. For example, pronounced increases in food intake are observed during gestation and lactation (Ladyman et al. 2010; Woodside et al. 2012). Pregnancy also leads to insulin resistance which is thought to play a role to ensure a high placental glucose uptake (Catalano 2014). Furthermore, pregnant

animals develop leptin resistance which is perceived by a reduced anorexigenic response to this hormone and by a lower leptin's capacity to recruit STAT3 signaling pathway in the hypothalamus in comparison to virgin animals (Ladyman and Grattan 2005, 2016; Ladyman et al. 2009, 2012; Trujillo et al. 2011; Nagaishi et al. 2014).

Leptin resistance has been better characterized in diet-induced obese animals and this condition is a key feature of obesity (Balland and Cowley 2015). Some authors suggest that leptin resistance can emerge from defects in the transduction of leptin receptor (LepR) signaling pathways (Balland and Cowley 2015). Accordingly, obese animals show increased hypothalamic expression of regulatory

proteins that inhibit LepR signaling (Balland and Cowley 2015). Among different factors, LepR signaling can be inhibited by the suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS3) (Bjorbaek et al. 1998). Obese animals show high SOCS3 expression in the hypothalamus and SOCS3 ablation in the brain or in specific neuronal populations prevents leptin resistance and partially protects against diet-induced obesity (Mori et al. 2004; Kievit et al. 2006; Briancon et al. 2010; Reed et al. 2010; Matarazzo et al. 2012; Pedrosa et al. 2014). Pregnant animals also exhibit increased hypothalamic SOCS3 expression (Zampieri et al. 2015). Notably, SOCS3 inactivation in LepR-expressing cells prevents leptin resistance and attenuates the increases in food intake, adiposity, and insulin resistance typically observed in pregnant mice (Zampieri et al. 2015). Therefore, SOCS3 expression in LepR-expressing cells coordinates maternal metabolic adaptations.

Although the metabolic adaptations of pregnancy and lactation are well described, the actual importance of these changes for the offspring's development is still unclear. A lower food intake during pregnancy and lactation could decrease the energy supply for the offspring, leading to reduced growth. Indeed, calorie or protein-restricted diets during pregnancy or lactation impair offspring growth (Zhan et al. 2007; Teodoro et al. 2012; Aiken and Ozanne 2013). Previous studies have shown that either under or overnutrition during gestation and/or lactation can affect the predisposition of the offspring to metabolic diseases in adulthood, a concept known as metabolic programming (Ozanne 2001; Heerwagen et al. 2010). The formation of hypothalamic neurocircuits relevant to energy and glucose homeostasis is also sensitive to nutrient availability during pregnancy and lactation (Bouret et al. 2008; Vogt Merly et al. 2014). In this study, we studied mice deficient of SOCS3 in LepR-expressing cells since these females have a diminished development of maternal metabolic changes (Zampieri et al. 2015, 2016). Using this mouse model, our study aimed to investigate the long-term metabolic consequences in mice born and/or raised by females presenting attenuated pregnancy- and lactation-induced metabolic adaptations. Thus, we tested whether maternal metabolic changes are required for normal offspring development and if their absence causes metabolic imbalances in adulthood.

Material and Methods

Animals

The deletion of *Socs3* gene in LepR-expressing cells was achieved by breeding the LepR-IRES-Cre strain (B6.129-LepR^{tm2(cre)Rck}/J, Jackson Laboratories) with the

SOCS3-floxed mouse (B6;129S4-SOCS3^{tm1Ayo}/J, Jackson Laboratories), as previously described and validated (Pedrosa et al. 2014, 2016; Zampieri et al. 2015, 2016; Bohlen et al. 2016). Animals carrying the SOCS3 conditional deletion in LepR-expressing cells (SOCS3 KO group) were homozygous for the loxP-flanked *Socs3* and LepR-Cre alleles. The control group was composed of littermate animals carrying only the LepR-Cre allele in homozygosity. Control and SOCS3 KO mice were weaned at 3–4 weeks of age and their mutations were confirmed by genotyping the DNA that had been previously extracted from the tail tip (REDEExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit, Sigma). Mice were maintained under standard conditions of light (12-h light/dark cycle) and temperature (23 ± 1°C). 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, and were performed according to the ethical guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Evaluation of gestation and lactation

In all experiments, virgin SOCS3 KO females were bred with control males, whereas control females were bred with SOCS3 KO males. Consequently, all pups carried a similar genotype (heterozygosity for the loxP-flanked *Socs3* allele and homozygosity for the LepR-Cre allele). After the detection of copulatory plugs, females were single-housed and this was considered to be the first day of pregnancy. Food intake and body weight were monitored daily during the entire gestation and for 3 weeks during lactation. The litter size was recorded on the day of birth and standardized to five pups to ensure comparable metabolic demands during lactation. The offspring weight was determined on days 2, 8, and 12 of lactation. Postpartum maternal behaviors were assessed on days 8 and 12 of lactation. Before the behavioral test, the litter (5 pups) was weighted and separated from the mother for 4 h. Then, the litter was weighted again and distributed in the corners of the female's cage. We evaluated the time required to contact, retrieve, and group the pups into the nest and to crouch over them. After 1 h from the beginning of the test, the offspring were weighted, and the difference from the beginning to the end of the test represented the milk consumption. A subgroup of control and SOCS3 KO females were killed on the 12th day of lactation to collect the mammary tissue (inguinal gland) for gene expression analyses using a protocol described previously (Buonfiglio et al. 2015, 2016). The numbers of fetuses and uterine reabsorptions were analyzed in subgroups of control and SOCS3 KO females killed on the 16th day of gestation.

Energy balance and glucose homeostasis of the offspring

To investigate the specific effects of either gestation or lactation, the litters were subjected to a cross-fostering experimental design on the day of birth in order to produce four groups: (1) CON-CON: mice born and raised by control females; (2) CON-KO: mice born from control females, but raised by SOCS3 KO females; (3) KO-CON: mice born from SOCS3 KO females, but raised by control females; and (4) KO-KO: mice born and raised by SOCS3 KO females. We studied male and female mice consuming regular rodent chow (2.99 kcal/g; 9.4% calories from fat; Quimtia, Brazil), and a subgroup of male mice consuming high-fat diet (HFD; 5.31 kcal/g; 58% kcal derived from fat; Pragsoluções, Brazil) from 8 weeks of age. Initially, the body weight was monitored weekly until approximately 30 weeks of age. Then, mice were single-housed to evaluate food intake for 1 week. Next, mice were subjected to a glucose tolerance test (2 g glucose/kg; i.p.) and to an insulin tolerance test (1 IU insulin/kg; i.p.). Male mice on HFD were placed in the Oxymax/Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA) to analyze O_2 consumption, CO_2 production, respiratory exchange ratio (RER), water intake, and locomotor activity (through infrared beam sensors). After 3 days of adaptation inside the CLAMS, the metabolic parameters of each mouse were evaluated for four consecutive days. Therefore, the results presented here were the average of this period. Mice were killed after 4 h of food deprivation to collect different fat depots (perigonadal, subcutaneous, and retroperitoneal) in order to determine body adiposity. The nose-anus length and brain mass were also assessed in male mice consuming regular chow.

Quantification of neuronal fibers

Subgroups of male mice consuming regular chow were perfused transcardially with saline, followed by 4% formaldehyde fixative solution. Subsequently, brains were cut in 30- μ m-thick sections using a freezing microtome. Brain sections of CON-CON, CON-KO, KO-CON, and KO-KO groups were subjected to immunofluorescence staining in order to evaluate the integrated optical density (IOD) of proopiomelanocortin (POMC) or agouti-related peptide (AgRP) immunoreactive fibers in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH), dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH), and lateral hypothalamic area (LHA). Briefly, brain sections were rinsed in 0.02 mol/L potassium PBS, pH 7.4 (KPBS), followed by incubation in 3% normal donkey serum for

1 h. Next, sections were incubated overnight in anti- β -endorphin antisera (1:2000; Phoenix Pharmaceuticals), since β -endorphin is a POMC-derived peptide, or anti-AgRP antisera (1:2000, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.). Subsequently, sections were incubated for 90 min in Alexa Fluor⁴⁸⁸-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch). After rinses in KPBS, sections were mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped using Fluoromount G mounting medium (E.M.S.). The IOD obtained in the PVH, DMH, and PVH were analyzed using the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) and subtracted by the IOD assessed in adjacent areas with low staining (background). One representative rostrocaudal level was analyzed for each hypothalamic nucleus. Brain sections were analyzed using a Zeiss Axioimager A1 microscope (Zeiss, Germany) and epifluorescence photomicrographs were captured using a Zeiss AxioCam HRC camera (Zeiss) and the Axiovision software (Zeiss; version 4.8.2). Image processing and lettering was carried out with the Photoshop software (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA).

Statistical analysis

The comparisons between control and SOCS3 KO females were performed using the unpaired two-tailed Student's *t* test. The differences among CON-CON, CON-KO, KO-CON, and KO-KO groups were analyzed using one-way or two-way ANOVA, followed by Newman-Keuls post hoc test. GraphPad Prism software was used for the statistical analyses and the results were expressed as mean $\pm$ SEM. Only *P* values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Maternal metabolic adaptations are attenuated in SOCS3 KO mice

As previously described (Zampieri *et al.* 2015), ablation of SOCS3 in LepR-expressing cells caused a significant decrease in weight gain and hyperphagia during pregnancy (Fig. 1A–B). Conditional SOCS3 deletion also increased pregnancy duration (Fig. 1C). The analysis of the uterus on the 16th day of gestation indicated a decreased number of fetuses and an equivalent increase in reabsorptions in mutant mice, compared to control animals (Fig. 1D). Despite the lower number of fetuses in pregnant SOCS3 KO mice, no significant differences in mean fetus weight (Control: 0.436 ± 0.036 g; SOCS3 KO: 0.391 ± 0.014 ; *P* = 0.3034) or in total weight of fetuses (Control: 3.43 ± 0.48 g; SOCS3 KO: 2.30 ± 0.50 ; *P* = 0.1383) were observed between the groups.

Figure 1. Ablation of SOCS3 in LepR cells leads to metabolic alterations in gestation. (A–B) Bar graphs comparing the increase in body weight ($n = 17$ – 19 /group) and food intake ($n = 9$ – 17 /group) during pregnancy in control and SOCS3 KO mice. (C) Bar graph comparing gestation time (days) in control ($n = 24$) and SOCS3 KO mice ($n = 23$). (D) Number of embryos and uterine reabsorptions of late pregnant control ($n = 12$) and SOCS3 KO ($n = 12$) mice. *Significantly different ($P < 0.05$) compared to control group.

Ablation of SOCS3 in LepR-expressing cells decreased lactation performance

In accordance with the lower number of fetuses during late pregnancy, SOCS3 KO mice had a smaller litter size on the day of birth (Fig. 2A). The sex ratio of the litters was not affected in SOCS3 KO mice since no significant difference between the percentage of male and female puppies was observed comparing SOCS3 KO mice and control mice (data not shown). Litter size was then standardized to five pups to ensure comparable metabolic demands during lactation. SOCS3 KO mice showed a reduced weight gain during lactation (compared to the body weight at the first day of pregnancy) and an attenuated increase in food intake throughout lactation (Fig. 2B–C). The reduced food intake during lactation probably affected the capacity of SOCS3 KO to meet the energetic demands of the pups, since the offspring weight gain was significantly reduced compared to control group (Fig. 2D). The impaired offspring growth in SOCS3 KO mice may be a consequence of a lower capacity to provide milk to the offspring, as shown on days 8 and 12 of lactation (Fig. 2E–F). An mRNA expression analysis was performed in the inguinal mammary tissue of mice on 12th day of lactation and we observed a decreased mRNA

expression of α -lactalbumin (Lactalb), whey protein (Wap), and β -casein (Csn2), transcripts that encode major milk proteins, in SOCS3 KO mice compared to control animals (Fig. 2G). Additionally, the mRNA expression of the prolactin receptor (Prlr) and estrogen receptor α (ER α), key hormone receptors involved in mammary gland development and lactogenesis, was also suppressed in the mammary gland of SOCS3 KO mice (Fig. 2G). Despite the decreased lactation performance exhibited by SOCS3 KO mice, maternal behavior was not affected by the conditional deletion (Fig. 3). Thus, control and SOCS3 KO mice showed similar latencies to contacting, recovering, grouping, and crouching the pups on days 8 and 12 of lactation (Fig. 3A–D).

Changes in energy balance in mice born and/or raised by females presenting attenuated maternal metabolic adaptations

After characterizing the effects of SOCS3 ablation during pregnancy and lactation, we studied the long-term metabolic consequences in the offspring. For this purpose, we initially investigated possible body weight changes in animals from CON-CON, CON-KO, KO-CON, and KO-KO groups. No significant differences in the body weight (Fig. 4A) and weight gain (Fig. 4B) among the groups of female mice were observed. In contrast, male mice either born or raised by SOCS3 KO mice (CON-KO, KO-CON, and KO-KO groups) exhibited a lower body weight ($P < 0.05$) until the 8th week of life compared to CON-KO animals consuming regular chow (Fig. 4C). However, body weight of all groups became similar along time (Fig. 4C). When the weight gain was compared among the groups of male mice on regular chow, KO-KO group showed the highest increase in comparison with the remaining groups (Fig. 4D). The diet-induced obesity protocol started at the 8th week of life in subgroups of male mice (Fig. 4E–F). By this age the initial body weight difference among the groups was not statistically significant (Fig. 4E). Interestingly, the CON-KO group exhibited an attenuated body weight and weight gain with time, compared to other groups consuming HFD (Fig. 4E–F).

After monitoring body weight, baseline food intake was assessed. No differences were observed among the experimental groups consuming regular chow (Fig. 5A–B). Among male mice on HFD, KO-CON had significantly higher food intake compared to all groups. In addition, KO-KO group also showed increased food intake compared to CON-CON and CON-KO groups (Fig. 5C). Energy expenditure, spontaneous ambulatory activity, and respiratory exchange ratio were also analyzed in male mice on HFD, but no significant differences were

Figure 2. Ablation of SOCS3 in LepR cells causes metabolic alterations during lactation. (A) Litter size of control ($n = 30$) and SOCS3 KO ($n = 28$) mice. (B–C). Bar graphs comparing the increase in body weight ($n = 18$ – 20 /group) and food intake ($n = 6$ – 8 /group) during lactation in control and SOCS3 KO mice. (D) Body weight of litter of five pups at postnatal days 2, 8, and 12 from control ($n = 7$) and SOCS3 KO dams ($n = 6$). (E–F) Milk consumption of litter of five pups at postnatal days 8 (E) and 12 (F) of control ($n = 7$) and SOCS3 KO mice ($n = 6$). (G) Real-time PCR to determine changes in mRNA expression in the mammary tissue (inguinal gland) of a subgroup of control ($n = 7$) and SOCS3 KO ($n = 6$) females that were killed on the 12th day of lactation. *Significantly different ($P < 0.05$) compared to control group.

Figure 3. Postpartum maternal behavior in control and SOCS3 KO mice. (A–D) Latency to contact and retrieve all pups, to group them into the nest and to crouch over on days 8 and 12 of lactation ($n = 6$ – 7 /group).

observed among the groups (Fig. 5D–F). The perigonadal or periovarian fat depots of CON-KO, KO-CON, and KO-KO females were significantly lighter than those of CON-CON female mice (Fig. 5G). KO-CON and KO-KO

males consuming regular chow also exhibited a lower body fat accumulation compared to CON-CON animals (Fig. 5H). However, in male mice consuming HFD, no significant differences in body adiposity were observed among the groups (Fig. 5I).

Similar glucose tolerance and insulin sensitivity in mice born and/or raised by females presenting maternal metabolic adaptations

The glucose homeostasis was also evaluated in the experimental animals. However, no significant differences in glucose tolerance were observed among the groups of female or male mice consuming regular chow (Fig. 6A–B), or in male mice on HFD (Fig. 6C). Subsequently, an insulin tolerance test was performed. In accordance with previous results, no differences in the insulin sensitivity were observed among the experimental groups (Fig. 6D–F).

Changes in brain mass and AgRP and POMC fibers

Nutrient availability during intrauterine or perinatal periods not only can induce long-term metabolic alterations,

Figure 4. Body weight changes in females and males on regular chow, and in males on HFD. (A–B) Body weight (A) and body weight gain (B) of CON-CON ($n = 26$), CON-KO ($n = 18$), KO-CON ($n = 11$), and KO-KO ($n = 21$) females on regular chow from weaning until 30 weeks of age. (C–D) Body weight (C) and body weight gain (D) of CON-CON ($n = 20$), CON-KO ($n = 7$), KO-CON ($n = 14$), and KO-KO ($n = 11$) males on regular chow from weaning until 30 weeks of age. (E–F) Body weight (E) and body weight gain (F) of CON-CON ($n = 10$), CON-KO ($n = 13$), KO-CON ($n = 13$), and KO-KO ($n = 11$) males on HFD. Mice started to consume the HFD at the 8th week of life. *All groups are significantly different ($P < 0.05$) compared to CON-CON group. #KO-KO group is significantly different ($P < 0.05$) compared to CON-CON group. †CON-KO group is significantly different ($P < 0.05$) compared to all group.

but it may also cause permanent changes in brain development (Bouret *et al.* 2008; Vogt Merly *et al.* 2014). Therefore, we evaluated the brain mass in male mice consuming regular chow. Notably, CON-KO, KO-CON, and KO-KO males showed a significant reduction in brain mass compared to CON-CON animals (Fig. 7A). This difference was observed despite similar body weight (Fig. 4C) and naso-anal length (Fig. 7B) at the time of tissue collection. Next, the density of AgRP and POMC fibers was evaluated in several hypothalamic nuclei of male mice consuming regular chow (Figs. 8, 9, and 10). The density of AgRP fibers to PVH, LHA, and DMH were not different among the groups (Figs. 8A–C, 9A–D, I–L, and 10A–D). Although no changes in the density of POMC fibers were observed in the LHA and DMH

(Figs. 8E–F and 9E–H, M–P), a reduction in POMC fibers in the PVH was found in the KO-CON group (Figs. 8D and 10E–H). This reduction was not caused by changes in the number of POMC neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH; CON-CON: 28.7 ± 1.6 cells; CON-KO: 31.4 ± 2.5 cells; KO-CON: 25.3 ± 1.4 cells; KO-KO: 27.4 ± 2.3 cells; $P = 0.2199$; Fig. 10I–L).

Discussion

Since gestation and lactation are situations of high-energy demand (Augustine *et al.* 2008; Woodside *et al.* 2012), several metabolic adaptations emerge during these periods, supposedly to improve offspring viability and

Figure 5. Food intake, energy expenditure, ambulatory activity, respiratory exchange ratio, and body adiposity. (A) Food intake in females on regular chow of CON-CON ($n = 25$), CON-KO ($n = 17$), KO-CON ($n = 9$), and KO-KO ($n = 16$) groups. (B) Food intake in males on regular chow of CON-CON ($n = 10$), CON-KO ($n = 7$), KO-CON ($n = 12$), and KO-KO ($n = 11$) groups. (C) Food intake in males on HFD of CON-CON ($n = 8$), CON-KO ($n = 11$), KO-CON ($n = 12$), and KO-KO ($n = 11$) groups. (D–F) Energy expenditure (VO₂), ambulatory activity, and respiratory exchange ratio (RER) in males on HFD of CON-CON, CON-KO, KO-CON, and KO-KO groups ($n = 5$ – 7 /group). These data represent the mean of five consecutive days and were presented as dark phase (from 8 pm to 8 am), light phase (from 8 am to 8 pm), and 24 h cycle. (G–I) Adiposity from subcutaneous (SC), perigonadal (PG), and retroperitoneal (RP) fat pads of (G) females on regular chow (CON-CON $n = 21$, CON-KO $n = 5$, KO-CON $n = 9$, and KO-KO $n = 12$), (H) males on regular chow (CON-CON $n = 18$, CON-KO $n = 5$, KO-CON $n = 11$, and KO-KO $n = 4$), and (I) males on HFD (CON-CON $n = 8$, CON-KO $n = 12$, KO-CON $n = 12$, and KO-KO $n = 11$). *Significantly different ($P < 0.05$) compared to CON-CON group. #Significantly different ($P < 0.05$) compared to CON-KO group. †Significantly different ($P < 0.05$) compared to KO-CON group.

success. However, the actual importance of these metabolic adaptations for normal offspring development has not been fully evaluated. Furthermore, it is also unclear whether the absence of maternal metabolic changes can predispose the offspring to metabolic imbalances in adulthood. Therefore, we developed a mouse model in which females exhibit attenuated maternal metabolic adaptations via inactivation of the *Socs3* gene in LepR-expressing cells (Zampieri *et al.* 2015, 2016). These females showed reduced food intake and weight gain during pregnancy and lactation. As previously described (Zampieri *et al.*

2015), these females also have improved leptin and insulin sensitivity, leading to lower body fat accumulation during these periods. In this manuscript, we observed that attenuation of maternal metabolic changes caused a significant impact on the offspring. SOCS3 KO females showed a reduced number of embryos and smaller litter size. This reduction was not likely caused by decreased ovulation, since a concomitant increase in the number of uterine reabsorptions was found in late pregnant SOCS3 KO mice. Thus, in a uterine environment with less available energy, a reduction in the number of viable embryos

Figure 6. Glucose homeostasis of CON-CON, CON-KO, KO-CON, and KO-KO groups. (A–C) Glucose tolerance test of (A) females on regular chow (CON-CON $n = 25$ CON-KO $n = 9$, KO-CON $n = 17$, and KO-KO $n = 16$), (B) males on regular chow (CON-CON $n = 10$ CON-KO $n = 12$, KO-CON $n = 7$, and KO-KO $n = 11$), and (C) males on HFD (CON-CON $n = 6$ CON-KO $n = 10$, KO-CON $n = 11$, and KO-KO $n = 9$). (D–F) Insulin tolerance test of females on regular chow (D), males on regular chow (E), and males on HFD (F).

Figure 7. Brain mass and body length in males on regular chow. (A–B) Bar graphs comparing the brain mass (A) and the naso-anal length (B) in CON-CON ($n = 18$), CON-KO ($n = 5$), KO-CON ($n = 12$), and KO-KO ($n = 9$) male mice on regular chow. *Significantly different ($P < 0.05$) compared to CON-CON group.

seems to be a positive adaptation to ensure the successful birth of fewer pups. However, although some studies have shown reduced litter size in protein- or energy-restricted dams (Young and Widdowson 1975), others found no significant influence on the number of pups on the day of birth (Kang-Lee and Harper 1975; Park et al. 1994). Thus, a lower number of viable embryos found in SOCS3 KO females may not be caused only by decreased energy availability during gestation. Since previous studies have shown that SOCS3 regulates inflammatory responses in the placenta and embryonic lethality (Roberts et al. 2001; Robb et al. 2005), possible changes in placental SOCS3 expression in our conditional knockout model could have led to a reduced number of viable embryos.

In this study, we used homozygous animals for the LepR-IRES-Cre allele in both control and conditional knockout group. Our intention was to improve Cre-mediated recombination since LepR transcription is normally very low and reports in the literature indicates an enhanced LepR-IRES-Cre-mediated recombination in homozygous animals, reflecting more accurately the expected pattern of LepR expression in the brain (Leininger et al. 2009; Leshan et al. 2009). Although high levels of Cre activity may result in nonspecific recombination (Morrison and Münzberg 2012) or cause brain development defects (Forni et al. 2006), these problems are unlikely in homozygous LepR-IRES-Cre mouse since no brain development defects have been observed in earlier

Figure 8. Axonal projections of ARH neurons. (A–C) Bar graph comparing AgRP fiber density in the PVH (A), LHA (B), and DMH (C) in males consuming regular chow ($n = 7/\text{group}$). (D–F) Bar graph comparing POMC (β -endorphin) fiber density in the PVH (D), LHA (E), and DMH (F) in males consuming regular chow ($n = 6/\text{group}$). *Significantly different ($P < 0.05$) compared to CON-CON group. †Significantly different ($P < 0.05$) compared to CON-KO group. ‡Significantly different ($P < 0.05$) compared to KO-CON group.

studies (Pedroso *et al.* 2014, 2016; Zampieri *et al.* 2015, 2016; Bohlen *et al.* 2016). Additionally, in a previous study, we co-localized a Cre-mediated reporter protein (tdTomato) with leptin-induced pSTAT3 using the LepR-IRES-Cre allele in homozygosity and we found a high degree of colocalization, which indicates that nonspecific recombination does not occur significantly in homozygous LepR-IRES-Cre (Nagaishi *et al.* 2014). Finally, a breeding strategy was chosen to guarantee a similar phenotype among the pups which carried the loxP-flanked *Socs3* allele in heterozygosity and the LepR-IRES-Cre allele in homozygosity. Whether this genotype could affect the observed results remains unknown.

Lactation performance was impaired in SOCS3 KO females, leading to reduced offspring weight gain. Since no defects in postpartum maternal behavior were observed in SOCS3 KO females, the reduced offspring growth is likely explained by a lower capacity to produce milk. Accordingly, the mammary gland of SOCS3 KO dams showed lower expression of key proteins involved in mammaryogenesis and lactogenesis, and their offspring consumed less milk during the 1-hour test period. A massive caloric intake, along with the use of body fat reserves, is required to meet the high-energy demands of a mouse offspring (Woodside *et al.* 2012). Thus, reduction in food intake during lactation became maladaptive in SOCS3 KO mice, possibly restricting the energy supply for the

offspring. Thus, our findings suggest that SOCS3 ablation in LepR cells affected neuronal populations involved in energy balance control (Ramos-Lobo and Donato 2017), but had no effect in neural circuits that regulate maternal behavior. This result is in accordance with the lack of LepR-expressing cells and consequently SOCS3 ablation in key brain areas associated with parental care (Scott *et al.* 2009; Dulac *et al.* 2014; Nagaishi *et al.* 2014).

By evaluating the metabolic consequences in mice born and/or raised by SOCS3 KO mice, we observed that males were more affected than females. Evidence in the literature in fact indicates a sexually dimorphic impact in the metabolism and immune system caused by dietary changes during pregnancy and lactation (Zambrano *et al.* 2006; Oertelt-Prigione 2012; Makarova *et al.* 2013; Sanchez-Garrido *et al.* 2013; Sardinha *et al.* 2013; Morselli *et al.* 2016). Of note, higher morbidity and mortality rate during early life have been reported in males than in females (Hammond 1965; Naeye *et al.* 1971; Wells 2000), and this sexually dimorphic bias depends on caloric availability (Williams and Gloster 1992). Thus, since males are more vulnerable to early life stressors than females (Wells 2000), males may also be more prone to metabolic programming and other developmental deficiencies. Accordingly, while neonatal overfeeding influences the development of hypothalamic connectivity in male rats (Sominsky *et al.* 2017), female rats subjected to a similar

Figure 9. AgRP and POMC fibers in the DMH and LHA. (A–D) Representative photomicrographs of AgRP fibers in the DMH of CON-CON (A), CON-KO (B), KO-CON (C), and KO-KO (D) males on regular chow. (E–H) Representative photomicrographs of POMC (β -endorphin) fibers in the DMH of CON-CON (E), CON-KO (F), KO-CON (G), and KO-KO (H) males on regular chow. (I–L) Representative photomicrographs of AgRP fibers in the LHA of CON-CON (I), CON-KO (J), KO-CON (K), and KO-KO (L) males on regular chow. (M–P) Representative photomicrographs of POMC fibers in the LHA of CON-CON (M), CON-KO (N), KO-CON (O), and KO-KO (P) males on regular chow. Scale bar = 100 μ m.

nutritional manipulation showed no significant changes (Ziko et al. 2017). Shortly after weaning (4 weeks old), males either born or raised by SOCS3 KO animals exhibited lower body weight compared to mice born and raised by control dams. This result supports the idea that limited energy supplies either prenatally or postnatally impaired offspring growth in male mice born or raised by SOCS3 KO mice. Therefore, our mouse model caused a type of undernutrition, especially in male pups, which is not dependent of food restriction, dietary manipulations and other stressors, but induced by a reduction in maternal metabolic adaptations. Therefore, while the natural increases in food intake, body adiposity, and insulin resistance observed during pregnancy or lactation could be considered metabolic stressors to the female's organism, these adaptations produce intrauterine and postnatal

benefits for the offspring. Consequently, our findings confirm the general assumption that the typical metabolic changes in pregnancy and lactation are indeed required for normal offspring development.

Previous studies that investigated dietary-induced metabolic programming found long-term consequences in glucose homeostasis (Chen et al. 2009; Vogt Merly et al. 2014). However, no differences in glucose tolerance or insulin sensitivity were observed in CON-KO, KO-CON, and KO-KO groups, compared to CON-CON animals. On the other hand, energy balance was affected by our genetic manipulation. Although male mice from CON-KO, KO-CON, and KO-KO groups exhibited lower body weight until 8 weeks of life, these animals were able to recover the body weight, indicating a catch-up, particularly in the KO-KO group consuming regular chow.

Figure 10. POMC but not AgRP fibers in the PVH are altered by maternal SOCS3 ablation in LepR cells. (A–D) Representative photomicrographs of AgRP fibers in the PVH of CON-CON (A), CON-KO (B), KO-CON (C), and KO-KO (D) males on regular chow. (E–H) Representative photomicrographs of POMC (β -endorphin) fibers in the PVH of CON-CON (E), CON-KO (F), KO-CON (G), and KO-KO (H) males on regular chow. (I–L) Representative photomicrographs of POMC neurons in the ARH of CON-CON (I), CON-KO (J), KO-CON (K), and KO-KO (L) males on regular chow. 3V, third ventricle. Scale bars = 100 μ m.

Nevertheless, CON-KO, KO-CON, and KO-KO groups still showed lower body adiposity compared to CON-CON animals. In males on HFD, the only notable differences were an increased food intake in KO-CON and KO-KO groups, as well as a reduced body weight in the CON-KO group, although no statistically differences among the groups were observed in body adiposity, energy expenditure, ambulatory activity or RER. The lack of additional metabolic changes, despite the differences in weight gain, body adiposity or food intake in some groups, may be caused by the time these measurements were performed (after the long-term body weight analysis). Thus, it is possible that younger animals could exhibit other metabolic alterations, but these changes became

harder to detect in older mice. In addition, several variables that also affect the energy balance were not evaluated in this study. For example, changes in meal pattern (Nicklas et al. 2001; Farley et al. 2003) or microbiota (Turnbaugh et al. 2006; Shen et al. 2013) can have a significant impact in the metabolism, without necessarily affecting food intake or energy expenditure. Thus, future studies are still necessary to investigate in more detail the primary cause of the differences in weight gain, body adiposity or food intake observed in some experimental groups. Overall, despite the clear indication of reduced growth and undernutrition in pups born or raised by SOCS3 KO dams, no evidence of metabolic programming was found. Therefore, the attenuation of maternal

metabolic adaptations seems to be insufficient to cause metabolic disorders in the offspring later in life.

We found a remarkable reduction in the brain mass of CON-KO, KO-CON, and KO-KO males compared to CON-CON animals. Therefore, either intrauterine or post-natal deficiencies can affect brain development in mice born or raised by SOCS3 KO mice, although no additive or synergic effect was found because KO-KO group showed a similar brain mass compared to CON-KO or KO-CON animals. Dietary protein restriction is able to reduce brain growth in mice (Hoppe *et al.* 2007). Leptin-deficient mice also have a reduced brain mass, which can be reverted by early leptin administration (Bereiter and Jeanrenaud 1979; Ahima *et al.* 1999). Since CON-KO, KO-CON, and KO-KO males showed reduced body weight until 8 weeks of life and remained leaner even in adulthood, the reduced maternal metabolic adaptations possibly led to hypoleptinemia, which may have affected brain development. The long-term consequences of the reduced brain mass in these animals are uncertain, but it is possible that several neurological functions may have been compromised. For example, maternal dietary changes can disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function in the offspring (Page *et al.* 2014). In addition, future studies could investigate what regions account for the difference in brain mass among the experimental groups.

Former studies have also indicated that the formation of hypothalamic neurocircuits involved in energy balance is sensitive to nutrient availability during pregnancy and lactation (Bouret *et al.* 2008; Vogt Merly *et al.* 2014; Johnson *et al.* 2016). Thus, in this study the density of AgRP and POMC fibers to post synaptic targets was also investigated since this innervation represents important neurocircuits that regulate body weight and other metabolic aspects (Ramos-Lobo and Donato 2017), and they are particularly affected by nutritional cues during development (Bouret *et al.* 2004, 2008; Vogt Merly *et al.* 2014; Johnson *et al.* 2016). We found a reduced density of POMC fibers in the PVH of KO-CON males. This defect was not caused by changes in the number of POMC cells in the ARH. Interestingly, the KO-CON groups consuming regular chow also exhibited the lowest body adiposity compared to the other groups, indicating that the absence of metabolic changes during pregnancy was critical for these deficiencies. Therefore, the reduced density of POMC fibers in the PVH of KO-CON mice probably reflects their undernutrition and development deficiencies, rather than being the cause of their lower body adiposity.

Conclusions

In summary, our findings provide robust evidence that the commonly observed metabolic changes during

pregnancy and lactation are necessary for normal offspring development. The absence of maternal metabolic adaptations caused long-term consequences in the energy balance and brain development of the offspring. However, mice born or raised by SOCS3 KO females presented a phenotype closer to that of undernutrition, rather than exhibiting evidence of metabolic programming that could lead to metabolic disorders in adulthood. Altogether, these findings contribute to the understanding of the importance of an adequate nutrition during pre- and postnatal periods, and how situations of altered maternal metabolic adaptations could have an impact in offspring development and metabolism.

Acknowledgment

We thank Ana Maria P. Campos for the technical assistance.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Ahima, R. S., C. Bjorbaek, S. Osei, and J. S. Flier. 1999. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* 140:2755–2762.
- Aiken, C. E., and S. E. Ozanne. 2013. Sex differences in developmental programming models. *Reproduction* 145:R1–R13.
- Augustine, R. A., S. R. Ladyman, and D. R. Grattan. 2008. From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *J. Physiol.* 586:387–397.
- Balland, E., and M. A. Cowley. 2015. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Front. Neuroendocrinol.* 39:59–65.
- Bereiter, D. A., and B. Jeanrenaud. 1979. Altered neuroanatomical organization in the central nervous system of the genetically obese (ob/ob) mouse. *Brain Res.* 165:249–260.
- Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, J. D. Frantz, S. E. Shoelson, and J. S. Flier. 1998. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell* 1:619–625.
- Bohlen, T. M., M. A. Silveira, T. T. Zampieri, R. Frazao, and J. Donato Jr. 2016. Fatness rather than leptin sensitivity determines the timing of puberty in female mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 423:11–21.
- Bouret, S. G., S. J. Draper, and R. B. Simerly. 2004. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304:108–110.

- Bouret, S. G., J. N. Gorski, C. M. Patterson, S. Chen, B. E. Levin, and R. B. Simerly. 2008. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell Metab.* 7:179–185.
- Briancon, N., D. E. McNay, E. Maratos-Flier, and J. S. Flier. 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* 59:3074–3084.
- Buonfiglio, D. C., A. M. Ramos-Lobo, M. A. Silveira, I. C. Furigo, L. Hennighausen, R. Frazao, et al. 2015. Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice. *Horm. Behav.* 71:60–68.
- Buonfiglio, D. C., A. M. Ramos-Lobo, V. M. Freitas, T. T. Zampieri, V. S. Nagaishi, M. Magalhaes, et al. 2016. Obesity impairs lactation performance in mice by inducing prolactin resistance. *Sci. Rep.* 6:22421.
- Catalano, P. M. 2014. Trying to understand gestational diabetes. *Diabet. Med.* 31:273–281.
- Chen, H., D. Simar, and M. J. Morris. 2009. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *PLoS ONE* 4:e6259.
- Dulac, C., L. A. O'Connell, and Z. Wu. 2014. Neural control of maternal and paternal behaviors. *Science* 345:765–770.
- Farley, C., J. A. Cook, B. D. Spar, T. M. Austin, and T. J. Kowalski. 2003. Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats. *Obes. Res.* 11:845–851.
- Forni, P. E., C. Scuoppo, I. Imayoshi, R. Taulli, W. Dastru, V. Sala, et al. 2006. High levels of Cre expression in neuronal progenitors cause defects in brain development leading to microencephaly and hydrocephaly. *J. Neurosci.* 26:9593–9602.
- Hammond, E. L. 1965. Studies in fetal and infant mortality. II. Differentials in mortality by sex and race. *Am. J. Public Health Nation's Health* 55:1152–1163.
- Heerwagen, M. J., M. R. Miller, L. A. Barbour, and J. E. Friedman. 2010. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 299:R711–R722.
- Hoppe, C. C., R. G. Evans, J. F. Bertram, and K. M. Moritz. 2007. Effects of dietary protein restriction on nephron number in the mouse. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292:R1768–R1774.
- Johnson, M. D., S. G. Bouret, A. A. Dunn-Meynell, C. N. Boyle, T. A. Lutz, and B. E. Levin. 2016. Early postnatal amylin treatment enhances hypothalamic leptin signaling and neural development in the selectively bred diet-induced obese rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 311: R1032–R1044.
- Kang-Lee, Y. A., and A. E. Harper. 1975. Effect of maternal protein deprivation on enzymatic development in newborn rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149:610–614.
- Kievit, P., J. K. Howard, M. K. Badman, N. Balthasar, R. Coppari, H. Mori, et al. 2006. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. *Cell Metab.* 4:123–132.
- Ladyman, S. R., and D. R. Grattan. 2005. Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 146:3868–3874.
- Ladyman, S. R., and D. R. Grattan. 2016. Central effects of leptin on glucose homeostasis are modified during pregnancy in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 28:1–13.
- Ladyman, S. R., A. Tups, R. A. Augustine, A. Swahn-Azavedo, I. C. Kokay, and D. R. Grattan. 2009. Loss of hypothalamic response to leptin during pregnancy associated with development of melanocortin resistance. *J. Neuroendocrinol.* 21:449–456.
- Ladyman, S. R., R. A. Augustine, and D. R. Grattan. 2010. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. *J. Neuroendocrinol.* 22:805–817.
- Ladyman, S. R., D. M. Fieldwick, and D. R. Grattan. 2012. Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse. *Reproduction* 144:83–90.
- Leininger, G. M., Y. H. Jo, R. L. Leshan, G. W. Louis, H. Yang, J. G. Barrera, et al. 2009. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab.* 10:89–98.
- Leshan, R. L., G. W. Louis, Y.-H. Jo, C. J. Rhodes, H. Munzberg, and M. G. Myers Jr. 2009. Direct innervation of GnRH neurons by metabolic- and sexual odorant-sensing leptin receptor neurons in the hypothalamic ventral premammillary nucleus. *J. Neurosci.* 29:3138–3147.
- Makarova, E. N., E. V. Chepeleva, P. E. Panchenko, and N. M. Bazhan. 2013. Influence of abnormally high leptin levels during pregnancy on metabolic phenotypes in progeny mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305: R1268–R1280.
- Matarazzo, V., F. Schaller, E. Nedelec, A. Benani, L. Penicaud, F. Muscatelli, et al. 2012. Inactivation of Socs3 in the hypothalamus enhances the hindbrain response to endogenous satiety signals via oxytocin signaling. *J. Neurosci.* 32:17097–17107.
- Mori, H., R. Hanada, T. Hanada, D. Aki, R. Mashima, H. Nishinakamura, et al. 2004. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat. Med.* 10:739–743.
- Morrison, C. D., and H. Münzberg. 2012. Capricious Cre: the devil is in the details. *Endocrinology* 153:1005–1007.

- Morselli, E., A. P. Frank, R. S. Santos, L. A. Fatima, B. F. Palmer, and D. J. Clegg. 2016. Sex and gender: critical variables in pre-clinical and clinical medical research. *Cell Metab.* 24:203–209.
- Naeye, R. L., L. S. Burt, D. L. Wright, W. A. Blanc, and D. Tatter. 1971. Neonatal mortality, the male disadvantage. *Pediatrics* 48:902–906.
- Nagaishi, V. S., L. I. Cardinali, T. T. Zampieri, I. C. Furigo, M. Metzger, and J. Donato Jr. 2014. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neuroscience* 259:71–83.
- Nicklas, T. A., T. Baranowski, K. W. Cullen, and G. Berenson. 2001. Eating patterns, dietary quality and obesity. *J. Am. Coll. Nutr.* 20:599–608.
- Oertelt-Prigione, S. 2012. The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun. Rev.* 11:A479–A485.
- Ozanne, S. E. 2001. Metabolic programming in animals. *Br. Med. Bull.* 60:143–152.
- Page, K. C., E. K. Jones, and E. K. Anday. 2014. Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306:R527–R537.
- Park, C. S., M. G. Baik, W. L. Keller, and W. D. Slinger. 1994. Dietary energy restriction-mediated growth and mammary development in rats. *J. Anim. Sci.* 72:2319–2324.
- Pedroso, J. A., D. C. Buonfiglio, L. I. Cardinali, I. C. Furigo, A. M. Ramos-Lobo, J. Tirapegui, et al. 2014. Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. *Mol. Metab.* 3:608–618.
- Pedroso, J. A., M. A. Silveira, L. B. Lima, I. C. Furigo, T. T. Zampieri, A. M. Ramos-Lobo, et al. 2016. Changes in leptin signaling by SOCS3 modulate fasting-induced hyperphagia and weight regain in mice. *Endocrinology* 157:3901–3914.
- Ramos-Lobo, A. M., and J. Donato Jr. 2017. The role of leptin in health and disease. *Temperature* 4:258–291.
- Reed, A. S., E. K. Unger, L. E. Olofsson, M. L. Piper, M. G. Myers Jr., and A. W. Xu. 2010. Functional role of suppressor of cytokine signaling 3 upregulation in hypothalamic leptin resistance and long-term energy homeostasis. *Diabetes* 59:894–906.
- Robb, L., K. Boyle, S. Rakar, L. Hartley, J. Lochland, A. W. Roberts, et al. 2005. Genetic reduction of embryonic leukemia-inhibitory factor production rescues placentation in SOCS3-null embryos but does not prevent inflammatory disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102:16333–16338.
- Roberts, A. W., L. Robb, S. Rakar, L. Hartley, L. Cluse, N. A. Nicola, et al. 2001. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98:9324–9329.
- Sanchez-Garrido, M. A., J. M. Castellano, F. Ruiz-Pino, D. Garcia-Galiano, M. Manfredi-Lozano, S. Leon, et al. 2013. Metabolic programming of puberty: sexually dimorphic responses to early nutritional challenges. *Endocrinology* 154:3387–3400.
- Sardinha, F. L., F. S. Fernandes, M. G. Tavares do Carmo, E. Herrera. 2013. Sex-dependent nutritional programming: fish oil intake during early pregnancy in rats reduces age-dependent insulin resistance in male, but not female, offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304:R313–R320.
- Scott, M. M., J. L. Lachey, S. M. Sternson, C. E. Lee, C. F. Elias, J. M. Friedman, et al. 2009. Leptin targets in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 514:518–532.
- Shen, J., M. S. Obin, and L. Zhao. 2013. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol. Aspects Med.* 34:39–58.
- Sominsky, L., I. Ziko, T. X. Nguyen, J. Quach, and S. J. Spencer. 2017. Hypothalamic effects of neonatal diet: reversible and only partially leptin dependent. *J. Endocrinol.* 234:41–56.
- Teodoro, G. F., D. Vianna, F. L. Torres-Leal, L. C. Pantaleao, E. M. Matos-Neto, J. Donato Jr., et al. 2012. Leucine is essential for attenuating fetal growth restriction caused by a protein-restricted diet in rats. *J. Nutr.* 142:924–930.
- Trujillo, M. L., C. Spuch, E. Carro, and R. Senaris. 2011. Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* 152:1355–1365.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I. Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444:1027–1031.
- Vogt Merly, C., L. Paeger, S. Hess, M. Steculorum Sophie, M. Awazawa, B. Hampel, et al. 2014. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell* 156:495–509.
- Wells, J. C. 2000. Natural selection and sex differences in morbidity and mortality in early life. *J. Theor. Biol.* 202:65–76.
- Williams, R. J., and S. P. Gloster. 1992. Human sex ratio as it relates to caloric availability. *Soc. Biol.* 39:285–291.
- Woodside, B., R. Budin, M. K. Wellman, and A. Abizaid. 2012. Many mouths to feed: the control of food intake during lactation. *Front. Neuroendocrinol.* 33:301–314.
- Young, M., and E. M. Widdowson. 1975. The influence of diets deficient in energy, or in protein, on conceptus weight, and the placental transfer of a non-metabolisable amino acid in the guinea pig. *Biol. Neonate* 27:184–191.
- Zambrano, E., C. J. Bautista, M. Deas, P. M. Martinez-Samayoa, M. Gonzalez-Zamorano, H. Ledesma, et al. 2006. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J. Physiol.* 571:221–230.
- Zampieri, T. T., A. M. Ramos-Lobo, I. C. Furigo, J. A. Pedroso, D. C. Buonfiglio, and J. Donato Jr. 2015. SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the

- development of pregnancy-induced metabolic changes. *Mol. Metab.* 4:237–245.
- Zampieri, T. T., T. E. da Silva, D. de Paula Romeu, A. da Silva Torrao, and J. Donato Jr. 2016. SOCS3 expression within leptin receptor-expressing cells regulates food intake and leptin sensitivity but does not affect weight gain in pregnant mice consuming a high-fat diet. *Physiol. Behav.* 157:109–115.
- Zhan, X. A., M. Wang, H. Ren, R. Q. Zhao, J. X. Li, and Z. L. Tan. 2007. Effect of early feed restriction on metabolic programming and compensatory growth in broiler chickens. *Poult. Sci.* 86:654–660.
- Ziko, I., L. Sominsky, T. X. Nguyen, K. Y. Yam, S. De Luca, A. Korosi, et al. 2017. Hyperleptinemia in neonatally overfed female rats does not dysregulate feeding circuitry. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 8:287.

Artigo 3

Neuroscience 365 (2017) 114–124

SOCS3 ABLATION IN SF1 CELLS CAUSES MODEST METABOLIC EFFECTS DURING PREGNANCY AND LACTATION

ANGELA M. RAMOS-LOBO, PRYSCILA D. S. TEIXEIRA,
ISADORA C. FURIGO AND JOSE DONATO Jr. *

Department of Physiology and Biophysics, Institute of
Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo,
SP 05508-000, Brazil

Key words: gestation, cytokine receptor, hypothalamus,
energy balance, food intake, glucose homeostasis.

Abstract—Previous studies have shown that leptin resistance is a key feature that leads to gestational metabolic adaptations. We hypothesized that leptin sensitivity in the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) plays a critical role regulating gestational metabolic changes. In the present study, we generated a mouse model carrying ablation of the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in steroidogenic factor-1 (SF1) cells, which include the VMH, in order to investigate whether increased leptin sensitivity in this neuronal population prevents at least part of the metabolic changes typically observed during gestation and lactation. As predicted by the inhibitory effects of SOCS3 in leptin signaling, pregnant SF1 SOCS3 KO mice exhibited increased leptin sensitivity in the VMH, since an acute leptin injection induced a 95% increase in the STAT3 phosphorylation in this nucleus, compared to control animals ($p = 0.02$). Despite that, SF1 SOCS3 KO mice showed similar weight gain, food intake, hypothalamic neuropeptide expression and serum leptin levels during pregnancy compared to control littermates. Unexpectedly, SF1 SOCS3 KO mice exhibited glucose intolerance during pregnancy. SF1 SOCS3 KO mice also presented a lower body weight (-3% ; $p < 0.05$) during mid and late lactation, although food intake, litter size and offspring growth were not affected. Our findings suggest that increased leptin sensitivity in the VMH causes modest metabolic effects and is not sufficient to prevent major metabolic adaptations of pregnancy and lactation.
© 2017 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

INTRODUCTION

Several metabolic adaptations occur during pregnancy, including increases in food intake, adiposity and insulin resistance (Augustine et al., 2008; Ladyman et al., 2010). A progressive attenuation in the responses to leptin is also observed along gestation (Mounzih et al., 1998; Ladyman and Grattan, 2005; Ladyman et al., 2009; Trujillo et al., 2011; Ladyman et al., 2012; Nagaishi et al., 2014). Recently, our group found increased suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA levels in the hypothalamus of pregnant mice (Zampieri et al., 2015). SOCS3 is a well-known inhibitor of leptin receptor (LepR) signaling (Bjorbaek et al., 1998; Howard et al., 2004; Mori et al., 2004). Thus, mice lacking SOCS3 in LepR-expressing cells were generated and, remarkably, these animals exhibited improved leptin sensitivity and a reduced food intake, body weight gain and insulin resistance during pregnancy (Zampieri et al., 2015). However, LepR-expressing cells are found in several brain areas (Scott et al., 2009) and a more precise identification of the neuronal population responsible for these effects is of interest.

The ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) abundantly expresses the LepR (Scott et al., 2009) and plays an important role regulating energy and glucose homeostasis (Dhillon et al., 2006; Zhang et al., 2008; Kim et al., 2012). Previous studies have suggested that VMH neurons are potential candidates to mediate gestational metabolic adaptations since they become less responsive to leptin during pregnancy (Ladyman and Grattan, 2005; Ladyman et al., 2012; Zampieri et al., 2015; Ladyman and Grattan, 2016). However, no study so far directly assessed the importance of leptin signaling in the VMH for gestational metabolic adaptations. In the present study, we hypothesized that changes in leptin sensitivity in the VMH modulate key metabolic aspects during pregnancy and lactation. Therefore, we generated a mouse model carrying ablation of SOCS3 in VMH neurons and our objective was to investigate whether increased leptin sensitivity in these neurons prevents the metabolic changes typically observed during gestation and lactation.

*Corresponding author. Address: Av. Prof. Lineu Prestes, 1524 São Paulo, SP 05508-000, Brazil. Fax: +55-11-3091-7285.

E-mail address: jdonato@icb.usp.br (J. Donato Jr.).

Abbreviations: 3V, third ventricle; AgRP, agouti-related peptide; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; CART, cocaine and amphetamine regulated transcript; CRH, corticotropin-releasing hormone; fx, fornix; GTT, glucose tolerance test; ITT, insulin tolerance test; KPBS, 0.02 M potassium PBS, pH 7.4; LepR, leptin receptor; MCH, melanin-concentrating hormone; MPO, median preoptic area; NPY, neuropeptide Y; NTS, nucleus of the solitary tract; ORX, orexin; OXT, oxytocin; PMv, ventral premammillary nucleus; POMC, proopiomelanocortin; pSTAT3, phosphorylation of the signal transducer and activator of transcription 3; RCA, retrochiasmatic area; SF1, steroidogenic factor-1; SOCS3, suppressor of cytokine signaling 3; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus; VMHc, central part of the VMH; VMHdm, dorsomedial part of the VMH; VMHvl, ventrolateral part of the VMH.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.09.048>

0306-4522/© 2017 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and genotyping

To generate animals carrying SOCS3 ablation in VMH neurons, mice expressing the enzyme Cre recombinase under steroidogenic factor-1 (SF1) promoters (Tg(Nr5a1-cre)7Lowl/J, The Jackson Laboratory) were bred with mice carrying loxP-flanked *Socs3* alleles (B6.129S4-*Socs3*^{tm1Ayo}/J, The Jackson Laboratory). Therefore, SF1-specific SOCS3 knockout (SF1 SOCS3 KO) mice carried the Cre transgene and were homozygous for the loxP-flanked *Socs3* allele. Littermate controls did not carry the Cre transgene (Fig. 1A). 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 (Fig. 1A). The SF1-Cre transgene was identified by the presence of the 250-bp PCR fragment. The 200-bp band represents a positive control of the PCR reaction and appears in both control and SF1 SOCS3 KO mice (Fig. 1A). Mice were weaned at 3–4 weeks of age and genotyped through PCR using DNA extracted from the tail tip (REDEExtract-N-AmpTM Tissue PCR Kit, Sigma). Mice were bred and maintained in standard conditions of light (12-h light/dark cycle) and temperature (23 ± 1 °C), and received a standard rodent chow diet. All experiments were carried out in compliance with national guidelines for the care and use of laboratory animals and received the approval of our Ethics Committee on the Use of Animals.

Experiment 1: Evaluation of leptin responsiveness in SF1 cells of the VMH

Previous studies have described that SF1 expression in the central nervous system is essentially restricted to the VMH (Segal et al., 2005). Consequently, SF1-Cre mouse has been used as a model to study leptin signaling in this particular neuronal population (Dhillon et al., 2006; Zhang et al., 2008). To confirm the recombination efficacy of our mouse model and the brain distribution of SF1-positive cells, SF1-Cre animals were bred with the Cre-inducible tdTomato-reporter mouse (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze/J, The Jackson Laboratory). The SF1-Cre/tdTomato-reporter mice (*n* = 3) were used to analyze the brain distribution of SF1-expressing cells and to identify the percentage of leptin-responsive cells in the VMH that express SF1. For this experiment, mice received an intraperitoneal injection of mouse recombinant leptin (2.5 µg leptin/g; from Dr. A.F. Parlow, National Hormone and Peptide Program – NHPP, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases – NIDDK) and were perfused 90 min later with saline, followed by 4% formaldehyde fixative solution. Subsequently, brains were cut in 30-µm thick sections using a freezing microtome. The phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3) was used as a marker of leptin-responsive cells, and pSTAT3 staining was co-localized with the tdTomato reporter protein.

Fig. 1. Generation of SF1-specific SOCS3 knockout mice. (A) PCR genotyping from tail biopsies to identify the loxP-flanked *Socs3* allele (left picture) or the SF1-Cre allele (right picture) in wild-type (wt), control (Con) and SF1 SOCS3 KO mice. (B) DAPI staining illustrating a normal VMH cytoarchitecture of SF1 SOCS3 KO mice. (C) Epifluorescence photomicrograph illustrating the distribution of SF1 neurons in the hypothalamus, through a reporter mouse that expresses the red fluorescent tdTomato protein under Cre recombination. DAPI staining was used as an anatomical reference. (D-F) Photomicrographs showing the co-localization between leptin-induced pSTAT3 (black nuclear staining) and tdTomato (marker of SF1 cells). *Abbreviations:* 3V, third ventricle; ARH, arcuate nucleus of the hypothalamus; VMHc, central part of the VMH; VMHdm, dorsomedial part of the VMH; VMHvl, ventrolateral part of the VMH.

Experiment 2: Evaluation of energy balance and glucose homeostasis in non-pregnant mice

Before investigating the energy and glucose homeostasis during pregnancy and lactation, we initially evaluated possible metabolic changes in 8-week-old virgin females. Food intake and body weight were recorded daily for 1 week in control ($n = 18$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 18$) mice. Then, subgroups of control ($n = 8$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 5$) mice were subjected to a glucose tolerance test (GTT; 2 g glucose/kg; s.c.) and an insulin tolerance test (ITT; 0.75 IU insulin/kg; s.c.) to determine possible changes in glucose control.

Experiment 3: Evaluation of energy balance during pregnancy and lactation

Sexually experienced wild-type males were introduced in the female's cage. The presence of mating plugs was analyzed daily and was considered the first day of pregnancy. Control ($n = 16$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 19$) females with plugs were put in individual cages and food intake and body weight were assessed daily during the entire pregnancy period (approximately 19 days) and lactation (21 days). Females that did not mate within 3 weeks were not used in the study. Additionally, we standardized litter size to 5 pups on the day of birth to ensure comparable metabolic demands during lactation. Three weeks after weaning the pups, the dams were euthanized to determine adiposity through the sum of fat pad weights (subcutaneous, uterine, ovarian and retroperitoneal).

Experiment 4: Evaluation of glucose homeostasis and sample collection during pregnancy

Another group of control ($n = 12$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 14$) mice were produced to evaluate changes in glucose homeostasis during pregnancy. These mice were subjected to GTT and ITT on days 13–14 and 16–17 of pregnancy, respectively. On day 18 of pregnancy, these females were euthanized to collect the serum and the hypothalamus. Body adiposity and the number of embryos and uterine resorptions were also evaluated in these animals.

Experiment 5: Leptin sensitivity during pregnancy

To determine leptin sensitivity during pregnancy, mice on day 17 of pregnancy were distributed into four groups: control mice that received a subcutaneous (s.c.) injection of sterile PBS ($n = 4$), SOCS3 KO mice that received a s.c. injection of sterile PBS ($n = 4$), control mice that received a s.c. injection of mouse recombinant leptin (2 μ g leptin/g; NHPP, NIDDK; $n = 3$) and SOCS3 KO mice that received a s.c. injection leptin ($n = 3$). After 3 h, these animals were perfused to detect pSTAT3 or pSTAT5 cells in different hypothalamic nuclei. The number of pSTAT3- or pSTAT5-positive cells in each area was plotted electronically and counted in two rostral-caudal levels of the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) and the VMH (bregma: -1.255 and -1.455), and in one level of the ventral

premamillary nucleus (PMV; bregma: -2.055), using the ImageJ Cell Counter software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). The values presented were the average obtained in each nucleus. We only counted one side of each nucleus.

Immunohistochemistry and image collection

Brain sections of control and SF1 SOCS3 KO pregnant mice were rinsed in 0.02 M potassium PBS, pH 7.4 (KPBS) and pretreated with a 1% NaOH and 1% H₂O₂ (pH > 13) aqueous solution for 20 min. The sections were then rinsed in KPBS and treated with 0.3% glycine followed by 0.03% lauryl sulfate, 10 min each. Sections were blocked with 3% donkey serum for 60 min and incubated in antibodies against pSTAT3^{Tyr715} or STAT5^{Tyr694} (1:1000, Cell Signaling Technology) for 2 days. After rinsing in KPBS, sections were incubated for 60 min in biotin-conjugated secondary antibody (1:1000, Jackson Laboratories) followed by 60 min in avidin–biotin complex (1:500, Vector Labs). For the peroxidase reaction we used 0.05% 3'-diaminobenzidine, 0.25% nickel sulfate and 0.03% hydrogen peroxide solution. Sections were photographed with a Zeiss Axiocam HRc camera coupled to a Zeiss Axioimager A1 microscope (Zeiss, Munich, Germany).

Hormone assessment

Using serum samples from late pregnant control ($n = 10$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 14$) mice from the experiment 4 we analyzed leptin and insulin levels by ELISA. Leptin and insulin ELISA kits (Crystal Chem) have a detection limit of 0.2 ng/mL and 0.1 ng/mL, respectively, and an intra- and inter-assay C.V. $\leq 10\%$.

Hypothalamic mRNA expression

We extracted the total RNA with TRIzol® reagent (Invitrogen) from the hypothalamus of late pregnant control ($n = 7$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 9$) mice from the experiment 4. Quantification and quality control of RNA was assessed with an Epoch Microplate Spectrophotometer (Biotek®). RNA samples were treated with RNase-free DNase I (Roche Applied Science), followed by reverse transcription using 2 μ g of total RNA, SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and random primers p(dN)6 (Roche Applied Science). Real-time polymerase chain reaction was performed using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with Power SYBR Green PCR Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers for targeted genes (Table 1). Relative quantification of mRNA was calculated by $2^{-\Delta\Delta C_t}$ and data were normalized by the geometric mean of housekeeping gene expression (β -actin, cyclophilin A and GAPDH) and reported as fold-change from control group.

Statistical analysis

The unpaired two-tailed Student's *t*-test was used to compare control and SF1 SOCS3 KO groups. The one-way ANOVA and the Newman-Keuls post hoc test were

Table 1. Primer sequences

Target gene	Reference sequence	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product size (bp)
β-Actin	NM_031144.3	cctctgaaccctaaggccaa	agcctggatggctacgtaca	90
Cyclophilin A	NM_008907.1	tatctgcactgccaagactgagt	cttctgtgtgtctgccattcc	128
GAPDH	NM_017008.4	gggcagcccagaacatcat	ccgttcagctctgggatgac	76
POMC	NM_139326.2	atagacgtgtgagctgggtgc	gcaagccagcaggttgct	75
CART	NM_013732.7	cagtcacacagctcccgat	cgatcgaagcgttgcaaga	149
NPY	NM_012614.2	ccgccgccatgatgctaggta	ccctcagccagaatgcccaa	73
AgRP	NM_001271806.1	cttggcggagggtgctagat	aggactcgtgcagccttacac	75
CRH	NM_205769.3	ccgataatctccatcagttcctg	tggatctcacctccaccttctg	106
OXT	NM_011025.4	ctccgagaaggcagactcag	ctgcagcccggatggc	65
MCH	NM_029971.2	ccagctgagaatggagttcaga	gtcggtagactcttccagcat	139
Orexin	NM_010410.2	ggcaccatgaacttctctc	gacagcagctgggcagag	124

used to compare the groups in the leptin sensitivity test. GraphPad Prism software was used for the statistical analyses and the results were expressed as mean $\pm$ S EM. Only p values < 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Characterization of SF1-specific SOCS3 knockout mice

To study the role of VMH neurons on the regulation of gestational metabolic adaptations, control and SF1 SOCS3 KO mice were produced (Fig. 1A). Using DAPI staining to visualize the brain cytoarchitecture, we observed no apparent changes in the cellular structure of VMH in SF1 SOCS3 KO mice (Fig. 1B). To confirm the recombination efficacy of our mouse model and the brain distribution of SF1-positive cells, we used the SF1-Cre/tdTomato-reporter mice. Through the inspection of the tdTomato distribution in the mouse brain we confirmed that SF1 cells are abundantly expressed in the VMH (Fig. 1C). Only scattered tdTomato cells were observed in other brain areas.

To assess the percentage of leptin-responsive cells that also express SF1 in the VMH, SF1-Cre/tdTomato-reporter mice received an acute leptin injection and a co-localization between leptin-induced pSTAT3 and tdTomato was performed. Practically all leptin-induced pSTAT3-positive cells were restricted to the dorsomedial part of the VMH (VMHdm; Fig. 1D). tdTomato cells, representing SF1 expression, outnumbered leptin-responsive neurons in the VMH (Fig. 1E). Importantly, $80.9 \pm 2.4\%$ of pSTAT3-positive cells co-expressed tdTomato (Fig. 1F), indicating that SF1-Cre mouse allows *in vivo* genetic manipulation of a high percentage of VMH leptin-responsive neurons.

SF1 SOCS3 KO females exhibited higher leptin sensitivity in the VMH during late pregnancy

We hypothesized that SOCS3 inactivation would improve leptin sensitivity, especially during pregnancy due to the leptin resistance that emerges during this period (Mounzih et al., 1998; Ladyman and Grattan, 2005; Ladyman et al., 2009; Trujillo et al., 2011; Ladyman et al., 2012; Nagaishi et al., 2014). Therefore, late pregnant control and SF1 SOCS3 KO females received an

acute PBS or leptin injection and we initially determined the number of pSTAT3-positive cells in several hypothalamic areas. PBS-treated control and SF1 SOCS3 KO pregnant mice exhibited a small amount of pSTAT3-positive cells in the brain which were mainly restricted to the ARH (Fig. 2A–G). Leptin injection induced a robust increase in pSTAT3-positive cells in several brain areas, including the VMHdm, ARH and PMv. However, while the ARH (Fig. 2I, L) and the PMv (Fig. 2J, M) showed similar numbers of pSTAT3-positive cells comparing control and SF1 SOCS3 KO females, SF1 SOCS3 KO mice exhibited a higher responsiveness to leptin in the VMH (Fig. 2H, K).

SOCS3 ablation in SF1 cells does not change the amount of pSTAT5-positive cells in the hypothalamus of pregnant mice

We also analyzed the number of pSTAT5-positive cells in the brain of PBS- and leptin-treated pregnant mice. PBS-injected pregnant mice already exhibited a significant amount of pSTAT5-positive cells in the ventrolateral part of the VMH (VMHvl; Fig. 3A, B, E) and in the ARH (Fig. 3C, F). Although leptin administration did not change the amount of pSTAT5-positive cells in the VMH of both groups (Fig. 3H, K), the number of cells in the ARH increased significantly compared to PBS-treated mice in control and SF1 SOCS3 KO pregnant mice (Fig. 3). A very low amount of pSTAT5-positive cells was observed in the PMv, independently of the experimental group or treatment (Fig. 3D, G, J and M).

Non-pregnant SF1 SOCS3 KO females have improved glucose tolerance

We did not find significant changes in body weight (Fig. 4A) or food intake (Fig. 4B) of adult virgin females comparing control and SF1 SOCS3 KO mice. SF1 SOCS3 KO females exhibited improved glucose tolerance compared to control animals (Fig. 4C). However, no changes in insulin sensitivity were observed in mutant females (Fig. 4D).

SOCS3 inactivation in SF1 cells was unable to prevent major pregnancy-induced metabolic changes

Subsequently, control and SF1 SOCS3 KO females were mated with wild-type males and after confirming the

Fig. 2. SF1 SOCS3 KO females exhibit higher leptin sensitivity in the VMH during late pregnancy. (A) Bar graphs showing the number of pSTAT3-positive cells in several hypothalamic nuclei after an acute s.c. injection of PBS or leptin (2 μ g/g) on late pregnant mice. (B–M) Brightfield photomicrographs of coronal brain sections showing PBS-induced or leptin-induced pSTAT3 in the VMH (B, E, H and K), ARH (C, F, I and L) and PMv (D, G, J and M) of control and SF1 SOCS3 KO mice on day 18 of pregnancy. *Abbreviations:* 3V, third ventricle; fx, fornix; VMHdm, part of the VMH; VMHvl, ventrolateral part of the VMH. *, significantly different ($p < 0.05$) compared to Control – PBS and SF1 SOCS3 KO – PBS groups. [†], significantly different ($p < 0.05$) compared to Control – Leptin group.

Fig. 3. Ablation of SOCS3 in SF1 cells does not affect the distribution of pSTAT5-positive cells in the brain of pregnant mice. (A) Bar graphs showing the number of pSTAT5-positive cells in several hypothalamic nuclei after an acute s.c. injection of PBS or leptin (2 μ g/g) on late pregnant mice. (B–M) Brightfield photomicrographs of coronal brain sections showing PBS-induced or leptin-induced pSTAT5 in the VMH (B, E, H and K), ARH (C, F, I and L) and PMv (D, G, J and M) of control and SF1 SOCS3 KO mice on day 18 of pregnancy. *Abbreviations:* 3V, third ventricle; fx, fornix; VMHdm, part of the VMH; VMHvl, ventrolateral part of the VMH. [†], significantly different ($p < 0.05$) compared to Control – PBS and SF1 SOCS3 KO – PBS groups.

Fig. 4. Ablation of SOCS3 in SF1 cells increases glucose tolerance of non-pregnant female mice. (A, B) Body weight (A) and food intake (B) in virgin adult control and SF1 SOCS3 KO female mice ($n = 18/\text{group}$). (C, D) Glucose tolerance test (C) and insulin tolerance test (D) in virgin adult control ($n = 8$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 8$) female mice. *, significantly different ($p < 0.05$) compared to control group.

copulatory plug we assessed daily their body weight and food intake during gestation. As expected, females exhibited a marked weight gain during gestation. However, control and SF1 SOCS3 KO mice showed a similar body weight throughout pregnancy (Fig. 5A). No changes in food intake were observed, except on day 16 of pregnancy when SF1 SOCS3 KO mice showed a reduced food intake compared to control animals (Fig. 5B, C). Glucose homeostasis was assessed during pregnancy through a GTT and an ITT. Contrary to our expectations, SF1 SOCS3 KO mice exhibited higher baseline glycemia and glucose intolerance during pregnancy (Fig. 5D). No significant changes were observed between groups in the response to an ITT (Fig. 5E). Females were euthanized on day 18 of pregnancy to determine adiposity. SF1 SOCS3 KO mice tended to have a lower body adiposity ($p = 0.06$) on late gestation compared to control animals (Fig. 5F). Serum leptin levels were not different between groups (Fig. 5G). However, serum insulin levels in SF1 SOCS3 KO mice showed tendency ($p = 0.06$) toward an increase compared to control animals (Fig. 5H). The number of embryos and uterine resorptions were also determined on late pregnancy, and control and SF1 SOCS3 KO mice showed similar values (Fig. 5I).

mRNA levels of different transcripts in the hypothalamus of pregnant SF1 SOCS3 KO mice

Next, mRNA levels of different transcripts involved in the regulation of energy balance were assessed in the hypothalamus of late pregnant control and SF1 SOCS3 KO mice (Fig. 6). However, we found no significant changes between groups in the hypothalamic mRNA levels of proopiomelanocortin (POMC), cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), neuropeptide Y (NPY), agouti-related peptide (AgRP), corticotropin-releasing hormone (CRH), oxytocin (OXT), melanin-concentrating hormone (MCH) and orexin (ORX; Fig. 6).

Lower body weight during mid and late lactation in SF1 SOCS3 KO mice

The energy balance changes were also investigated during lactation. After giving birth, control and SF1

SOCS3 KO mice exhibited a similar body weight during the first 6 days of lactation (Fig. 7A). However, from days 7 to 12 of lactation and from days 15 to 19 of lactation, SF1 SOCS3 KO mice had a lower body weight compared to control animals (Fig. 7A). On the other hand, control and SF1 SOCS3 KO mice exhibited a comparable lactation-induced hyperphagia (Fig. 7B). To assess the consequences of gestation and lactation on the long-term energy homeostasis, adiposity was determined three weeks after weaning the pups. Nonetheless, no differences between the groups were observed (Fig. 7C). We also investigated possible metabolic consequences in the pups. Control and SF1 SOCS3 KO mice gave birth to a similar number of pups in each litter (Fig. 7D). Additionally, the litter weight at birth and at days 7, 14 and 21 of life was comparable between control and SF1 SOCS3 KO dams (Fig. 7E).

DISCUSSION

In the present study, we investigated the hypothesis that SOCS3 expression in the VMH could exert an important role regulating the metabolic changes typically observed during pregnancy and lactation. However, contrary to our initial expectations, SOCS3 ablation from SF1 cells was not sufficient to prevent major pregnancy-induced metabolic changes, even though leptin responsiveness was improved in the VMH. During lactation, we actually observed a lower body weight in SF1 SOCS3 KO mice, but only in some periods and without any changes in lactation-induced hyperphagia.

Classical studies established the ventromedial hypothalamus as a critical region involved in the regulation of food intake and body adiposity since lesions in this area were able to produce severe obesity (Brobeck, 1946; Powley, 1977). Later, studies investigating the SF1 observed that VMH neurons present an abundant expression of this nuclear receptor which is required for VMH development (Ikeda et al., 1995; Segal et al., 2005). Consequently, SF1 knockout mice show drastic abnormalities in VMH cytoarchitecture, which leads to an obese phenotype similar to that previously described in VMH-lesioned animals (Ikeda et al., 1995; Majdic et al., 2002). In the present study, we used the Cre-loxP system to produce selective inactivation of SOCS3 in

Fig. 5. Energy balance and glucose homeostasis changes during pregnancy in SF1 SOCS3 KO mice. (A–C) Changes in body weight (A) and food intake (B, C) along pregnancy in control ($n = 16$) and SF1 SOCS3 KO mice ($n = 19$). (D, E) Glucose tolerance test (D) and insulin tolerance test (E) on days 13–14 and 16–17 of pregnancy, respectively, in control ($n = 12$) and SF1 SOCS3 KO mice ($n = 14$). (F) Bar graphs comparing the adiposity (sum of fat pad masses) of late pregnant control ($n = 13$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 15$) mice. (G, H) Serum leptin (G) and insulin (H) levels of late pregnant control ($n = 10$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 10$) mice. (I) Number of embryos and uterine resorption of late pregnant control ($n = 13$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 15$) mice. *, significantly different ($p < 0.05$) compared to control group.

Fig. 6. Hypothalamic mRNA levels at late pregnancy. Gene expression analyses in the hypothalamus of control ($n = 7$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 9$) females on day 18 of pregnancy.

VMH neurons. Former studies also used SF1-Cre mouse to study leptin signaling in VMH neurons, via inactivation of LepR (Dhillon et al., 2006) or SOCS3 (Zhang et al., 2008). As shown in the present study, SOCS3 ablation in VMH neurons caused no apparent changes in VMH

cytoarchitecture. Furthermore, using a reporter mouse to identify SF1-positive cells in the brain, we confirmed that SF1 expression is essentially limited to the VMH and show a large co-localization with leptin-responsive cells. Importantly, SF1 SOCS3 KO mice had improved leptin sensitivity in the VMH, when pSTAT3 was used as a marker of leptin responsiveness. Thus, the major caveat of using this mouse model refers to the SF1 expression outside the brain, which includes several endocrine glands such as the adrenal cortex and the gonads (Ikeda et al., 1995; Kim et al., 2011). However, we found no impairment in the fertility of either male or female SF1 SOCS3 KO mice, as well as an overall normal gestation or lactation period. Therefore, although we cannot precisely determine the potential impact of SOCS3 ablation from these endocrine glands, the lack of important changes between controls and mutant mice suggests that SOCS3 expression in the adrenal cortex or gonads exerts no significant effects on the evaluated parameters.

As mentioned earlier, SOCS3 inactivation in LepR-expressing cells was sufficient to attenuate

Fig. 7. Energy balance changes during lactation in SF1 SOCS3 KO mice. (A, B) Changes in body weight (A) and food intake (B) along 21 days of lactation in control ($n = 16$) and SF1 SOCS3 KO mice ($n = 19$). (C) Bar graphs comparing the adiposity (sum of fat pad masses) of control ($n = 16$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 19$) mice three weeks after weaning. (D, E) Litter size at birth (D) and offspring weight during the first three weeks of life (E) in the control ($n = 17$) and SF1 SOCS3 KO ($n = 19$) group. *, significantly different ($p < 0.05$) compared to control group.

pregnancy-induced increases in food intake, adiposity and insulin resistance (Zampieri et al., 2015; Zampieri et al., 2016). Since most of SF1-positive cells also co-express LepR in the VMH, these earlier studies also deleted SOCS3 from VMH SF1 cells. Therefore, here we postulated that VMH-specific deletion could reproduce the effects observed in our previous studies. This hypothesis was based on the fact that VMH neurons are prone to develop leptin resistance during pregnancy (Ladyman and Grattan, 2005; Ladyman et al., 2012; Zampieri et al., 2015; Ladyman and Grattan, 2016). In addition, VMH presents a large amount of prolactin-responsive cells (Brown et al., 2010; Furigo et al., 2014; Nagaishi et al., 2014), and prolactin secretion during pregnancy is thought to play an important role regulating energy balance during pregnancy (Ladyman et al., 2010). Regarding that, central prolactin infusion causes leptin resistance in pseudo-pregnant female rats and thereby abolishes the anorexigenic effects induced by leptin administration (Naef and Woodside, 2007; Augustine and Grattan, 2008). However, only a small percentage of LepR-expressing cells in the VMH is responsive to prolactin (Nagaishi et al., 2014). This occurs because VMH LepR-expressing cells are restricted to the VMHdm, whereas prolactin-responsive cells are mostly distributed in the VMHvl (Scott et al., 2009; Brown et al., 2010; Furigo et al., 2014; Nagaishi et al., 2014; Furigo et al., 2017). Therefore, assuming that an interaction between prolactin and leptin is critical to induce gestational metabolic adaptations (Ladyman et al., 2010), other brain nuclei might be involved in this response, instead of the VMH. Possible candidates include the median preoptic area, the retrochiasmatic area, the ARH and the nucleus of the solitary tract because these areas show leptin and prolactin-responsive neurons, as well as a pronounced degree of co-localization (Nagaishi et al., 2014). Thus, future studies could investigate the potential participation of these nuclei in the development of the metabolic changes observed during pregnancy and lactation.

Previous studies have shown leptin-induced pSTAT5 in several hypothalamic nuclei, including the VMH, ARH and PMv (Singireddy et al., 2013). However, we observed that leptin led to an increased number of pSTAT5-positive cells only in the ARH, and SOCS3 ablation caused no effect on the amount of pSTAT5-positive cells. Intriguingly, it is well-established that LepR mRNA is found only in the VMHdm (Scott et al., 2009; Ladyman et al., 2010), whereas the distribution of pSTAT5-positive cells was confined to the VMHvl. Therefore, STAT5 phosphorylation in some brain areas was probably induced by other hormones that are secreted during pregnancy, which may include prolactin/placental lactogens or growth hormone (Augustine et al., 2008; Furigo et al., 2017).

Although our findings refute the hypothesis that VMH SF1 neurons play a critical role in gestational metabolic adaptations, we found some interesting results that may have biological importance despite no statistical significance. SF1 SOCS3 KO mice exhibited tendency ($p = 0.06$) toward a lower adiposity at late pregnancy. Food intake also showed a tendency toward a reduction in several days during gestation, especially at late pregnancy. It is worth mentioning that we studied a large group of mice (at least 16 animals per group), indicating that the lack of statistically significant results was not due to small sample size. Thus, perhaps our analyses were not sensitive enough to detect small changes between the groups. Nonetheless, a reduced weight gain was found in several days of lactation. The lack of changes in food intake is in accordance with previous findings indicating that VMH neurons can regulate energy balance and body adiposity, without causing significant effects on food intake (Dhillon et al., 2006; Xu et al., 2010; Kim et al., 2011; Ramadori et al., 2011; Xu et al., 2011; Kim et al., 2012). For example, despite the marked obese phenotype of SF1 knockout mice, these mutants show no changes in food intake indicating that VMH abnormalities cause metabolic dysfunctions, independently of alterations in feeding (Majdic et al., 2002). The modest metabolic effects observed in SF1 SOCS3 KO mice may explain the lack of changes between groups in the hypothalamic gene expression during pregnancy.

Surprisingly, SF1 SOCS3 KO mice showed evidence of a worsening in glycemic control during pregnancy, even though virgin SF1 SOCS3 KO mice had a better glucose tolerance than control animals. Previous studies that induced selective SOCS3 inactivation in males observed improved glucose homeostasis (Howard et al., 2004; Mori et al., 2004; Zhang et al., 2008; Pedrosa et al., 2014; Zampieri et al., 2015). VMH neurons present receptors for several hormones that are regulated by SOCS3 and whose levels change during pregnancy or

lactation. So the resulting effects on glucose control and other aspects regulated by these hormones during pregnancy might be complex in SF1 SOCS3 KO mice.

CONCLUSIONS

Our findings suggest that increased leptin sensitivity in the VMH, via SOCS3 ablation, causes modest metabolic effects and is not sufficient to prevent key metabolic adaptations that take place during pregnancy and lactation. Thus, although the VMH may regulate to some extent these metabolic changes, other neuronal populations probably play a major role in inducing these biological effects. The identification of the neural circuitry involved in these metabolic adaptations is required to explain in detail this biological phenomenon and may provide important information that helps in the prevention and treatment of gestational metabolic imbalances.

Acknowledgments—We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support and fellowships (grants number: 2010/18086-0, 2013/21722-4, 2014/11752-6 and 2015/10992-6), and Ana Maria P. Campos for technical assistance.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

A.M.R.L. and J.D.J. designed the study; A.M.R.L., P.D.S.T. and I.C.F. conducted the research; A.M.R.L. and J.D.J. analyzed the data; A.M.R.L. and J.D.J. wrote the paper. All authors revised and approved the final manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Augustine RA, Grattan DR (2008) Induction of central leptin resistance in hyperphagic pseudopregnant rats by chronic prolactin infusion. *Endocrinology* 149:1049–1055.
- Augustine RA, Ladyman SR, Grattan DR (2008) From feeding one to feeding many: hormone-induced changes in bodyweight homeostasis during pregnancy. *J Physiol* 586:387–397.
- Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS (1998) Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1:619–625.
- Brobeck JR (1946) Mechanisms of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions. *Physiol Rev* 25:541–559.
- Brown RS, Kokay IC, Herbison AE, Grattan DR (2010) Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol* 518:92–102.
- Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua Jr S, Elmquist JK, Lowell BB (2006) Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 49:191–203.
- Furigo IC, Kim KW, Nagaishi VS, Ramos-Lobo AM, de Alencar A, Pedrosa JA, Metzger M, Donato Jr J (2014) Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. *Brain Res* 1566:47–59.
- Furigo IC, Metzger M, Teixeira PD, Soares CR, Donato Jr J (2017) Distribution of growth hormone-responsive cells in the mouse brain. *Brain Struct Funct* 222:341–363.
- Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzameli I, Bjorbaek C, Flier JS (2004) Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 10:734–738.
- Ikeda Y, Luo XR, Abbud R, Nilson JH, Parker KL (1995) The nuclear receptor steroidogenic factor-1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 9:478–486.
- Kim KW, Donato Jr J, Berglund ED, Choi YH, Kohno D, Elias CF, Depinho RA, Elmquist JK (2012) FOXO1 in the ventromedial hypothalamus regulates energy balance. *J Clin Invest* 122:2578–2589.
- Kim KW, Zhao L, Donato Jr J, Kohno D, Xu Y, Elias CF, Lee C, Parker KL, Elmquist JK (2011) Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:10673–10678.
- Ladyman SR, Augustine RA, Grattan DR (2010) Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. *J Neuroendocrinol* 22:805–817.
- Ladyman SR, Fieldwick DM, Grattan DR (2012) Suppression of leptin-induced hypothalamic JAK/STAT signalling and feeding response during pregnancy in the mouse. *Reproduction* 144:83–90.
- Ladyman SR, Grattan DR (2005) Suppression of leptin receptor messenger ribonucleic acid and leptin responsiveness in the ventromedial nucleus of the hypothalamus during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 146:3868–3874.
- Ladyman SR, Grattan DR (2016) Central leptin effects on glucose homeostasis are modified during pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol*.
- Ladyman SR, Tups A, Augustine RA, Swahn-Azavedo A, Kokay IC, Grattan DR (2009) Loss of hypothalamic response to leptin during pregnancy associated with development of melanocortin resistance. *J Neuroendocrinol* 21:449–456.
- Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, McGarry JD, Parker KL (2002) Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143:607–614.
- Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A (2004) Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med* 10:739–743.
- Mounzih K, Qiu J, Ewart-Toland A, Chehab FF (1998) Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology* 139:5259–5262.
- Naef L, Woodside B (2007) Prolactin/Leptin interactions in the control of food intake in rats. *Endocrinology* 148:5977–5983.
- Nagaishi VS, Cardinali LI, Zampieri TT, Furigo IC, Metzger M, Donato Jr J (2014) Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neuroscience* 259:71–83.
- Pedrosa JA, Buonfiglio DC, Cardinali LI, Furigo IC, Ramos-Lobo AM, Tirapegui J, Elias CF, Donato Jr J (2014) Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. *Mol Metab* 3:608–618.
- Powley TL (1977) The ventromedial hypothalamic syndrome, satiety, and a cephalic phase hypothesis. *Psychol Rev* 84:89–126.
- Ramadori G, Fujikawa T, Anderson J, Berglund ED, Frazao R, Michan S, Vianna CR, Sinclair DA, Elias CF, Coppari R (2011) SIRT1 deacetylase in SF1 neurons protects against metabolic imbalance. *Cell Metab* 14:301–312.
- Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, Elmquist JK (2009) Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol* 514:518–532.
- Segal JP, Stallings NR, Lee CE, Zhao L, Socci N, Viale A, Harris TM, Soares MB, Childs G, Elmquist JK, Parker KL, Friedman JM (2005) Use of laser-capture microdissection for the identification

- of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurosci* 25:4181–4188.
- Singireddy AV, Inglis MA, Zuure WA, Kim JS, Anderson GM (2013) Neither signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) or STAT5 signaling pathways are required for leptin's effects on fertility in mice. *Endocrinology* 154:2434–2445.
- Trujillo ML, Spuch C, Carro E, Senaris R (2011) Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* 152:1355–1365.
- Xu Y, Hill JW, Fukuda M, Gautron L, Sohn J-W, Kim K-W, Lee CE, Choi MJ, Lauzon DA, Dhillon H, Lowell BB, Zigman JM, Zhao JJ, Elmquist JK (2010) PI3K signaling in the ventromedial hypothalamic nucleus is required for normal energy homeostasis. *Cell Metab* 12:88–95.
- Xu Y, Nedungadi TP, Zhu L, Sobhani N, Irani BG, Davis KE, Zhang X, Zou F, Gent LM, Hahner LD, Khan SA, Elias CF, Elmquist JK, Clegg DJ (2011) Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metab* 14:453–465.
- Zampieri TT, da Silva TE, de Paula Romeu D, da Silva Torrao A, Donato Jr J (2016) SOCS3 expression within leptin receptor-expressing cells regulates food intake and leptin sensitivity but does not affect weight gain in pregnant mice consuming a high-fat diet. *Physiol Behav* 157:109–115.
- Zampieri TT, Ramos-Lobo AM, Furigo IC, Pedrosa JA, Buonfiglio DC, Donato Jr J (2015) SOCS3 deficiency in leptin receptor-expressing cells mitigates the development of pregnancy-induced metabolic changes. *Mol Metab* 4:237–245.
- Zhang R, Dhillon H, Yin H, Yoshimura A, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS (2008) Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. *Endocrinology* 149:5654–5661.

(Received 8 July 2017, Accepted 25 September 2017)
(Available online 5 October 2017)