

LUANA ANGÉLICA JANOTA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA LEPTINA NO DESENVOLVIMENTO DE
CAMUNDONGOS LEPTIN REPORTERS SUBMETIDOS A ANÓXIA NEONATAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2018

LUANA ANGÉLICA JANOTA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA LEPTINA NO DESENVOLVIMENTO DE
CAMUNDONGOS LEPTIN REPORTERS SUBMETIDOS A ANÓXIA NEONATAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: **Profa. Dra. Maria Inês Nogueira**

Versão Original

São Paulo

2018

RESUMO

A anóxia neonatal considerada relevante condição clínica mundial e vem sendo estudada no laboratório de Neurociências, ICB-USP, desde 2008. Agressões em períodos críticos de maturação do organismo, em especial do sistema nervoso, devido à sua alta demanda metabólica, podem modificar ou mesmo comprometer eventos ontogenéticos com complicações persistentes na vida adulta, sendo relacionada a retardo cognitivo e comportamental, tais como: epilepsia, déficit de atenção, hiperatividade, problemas de aprendizado, entre outros. Em ratos adultos ocorreu morte neuronal por apoptose e necrose, decréscimo da neurogênese e do volume no hipocampo após anóxia neonatal. Experimentos comportamentais evidenciaram alterações também na capacidade de aprendizagem, navegação espacial e ansiedade. Foi observado, que esse estímulo provoca retardo no desenvolvimento sensorio-motor, além de ganho de peso em relação ao controle, e aumento do diâmetro rostro-caudal e naso-anal. A fim de avaliar as causas de alterações somáticas e de desenvolvimento, decidiu-se aprofundar, neste estudo, a análise da relação do hipotálamo e da leptina com as mesmas, e com o metabolismo energético assim como, com o crescimento do organismo. Para tanto, foram utilizados camundongos *leptin reporters*, os quais apresentam os receptores para leptina naturalmente fluorescentes. Foi adaptado modelo para indução de anóxia em camundongos machos por meio de testes de avaliação da ontogenia de reflexos; da pressão de oxigênio no sangue; da frequência cardíaca e dos níveis na Escala de Apgar. Tais testes evidenciaram prejuízos dos animais anoxiados no aparecimento dos reflexos de aceleração, geotaxia negativa, recuperação de decúbito e resposta ao susto; diminuições significativas de pressão de oxigênio e batimentos cardíacos durante período de exposição ao ambiente anóxico, além de níveis indicativos de ausência de oxigênio quando avaliados os fatores que compõe a escala de Apgar, em relação aos animais controle, validando o modelo para este estudo. Em seguida, foram analisados grupos anóxia macho e fêmea e controle macho e fêmea com relação a parâmetros corpóreos durante 60 dias de vida dos animais. Foi evidenciado que a anóxia neonatal afeta os parâmetros de maneiras distintas, porém em todas as análises, o grupo anóxia macho apresentou dimensões aumentadas em relação aos outros grupos. Quando comparada a co-localização de fos com receptores de leptina fluorescentes ativados, os resultados obtidos sugerem que apesar de não ter sido detectado diferença de valores de leptina circulante no sangue, houve alteração de peso corpóreo nos animais anóxia, em relação ao seu controle, o que se atribui a possível resistência dos receptores de leptina dos núcleos arqueado e dorsomedial, hipótese que deve ser explorada em experimentos futuros. .

Palavras-chave: anóxia neonatal, desenvolvimento somático, metabolismo energético, leptina, hipotálamo

ABSTRACT

Neonatal anoxia is considered a relevant clinical condition and has been studied in the Neuroscience Laboratory, ICB-USP, since 2008. Damage caused to an organism during its maturation, particularly the damage that affects the high-metabolic nervous system, can modify or even compromise ontogenetic events with persistent complications in adulthood. Such complications are related to cognitive and behavioral retardation, and some known examples are: epilepsy, attention deficit, hyperactivity and learning problems. In adult rats, neuronal death occurs due to apoptosis, necrosis, decreased neurogenesis and decreased volume in the hippocampus after neonatal anoxia. Behavioral experiments also revealed changes in learning ability, spatial navigation and anxiety. It was also observed that neonatal anoxia causes delay in sensorimotor development, besides weight gain in relation to the control, and increase in the rostrocaudal and naso-anal diameter. In order to evaluate the causes of such somatic and developmental changes, this study analyzed the relationship between the hypothalamus and leptin, as well as their relationship with energy metabolism and the growth of the organism. Leptin reporter mice were used, which present naturally fluorescent leptin receptors. The anoxia model was adapted for male mice by means of the following tests: evaluation of the ontogeny of reflexes, the oxygen pressure in the blood, the heart rate and the levels on the Apgar Scale. These tests revealed damages to the anoxic animals by the appearance of different reflexes: acceleration, negative geotaxis, recovery of decubitus and response to scare; there was significant decrease in oxygen pressure and heart rate during exposure to the anoxic environment, in addition to levels in the Apgar scale which are indicative of oxygen absence when contrasted with control. Male and female anoxic groups and control were analyzed with respect to body parameters for a period of 60 days, and evaluated of leptin levels, Nissl staining and c-fos cell count by stereology performed. It was verified that neonatal anoxia affected the parameters in different ways, but overall the male anoxic group presented increased dimensions in relation to the other groups. Results obtained from the co-localization of fos and activated fluorescent leptin receptors suggest that, although it is not possible to observe differences in leptin values in the blood, the change in body weight of anoxic animals was due to a lack of activation of leptin receptors in arched and dorsomedial nuclei, suggesting a resistance to the effects of this hormone, hypothesis that should be explored in future experiments.

Key words: neonatal anoxia, somatic development, energy metabolism, leptin, hypothalamus

1. INTRODUÇÃO

O oxigênio é essencial para vida aeróbica (PERRONE et al., 2017) e seu déficit no período perinatal pode causar lesões neurológicas, convulsões, alterações comportamentais e, em casos extremos, levar a óbito (GRAHAM et al. 2008). O desenvolvimento cerebral é influenciado por diversos eventos, sendo eles pré-natais, intraparto ou pós-natais, podendo afetar os sistemas neurais e psicofisiológicos relacionados às emoções, funções cognitivas específicas (como atenção, memória) e habilidades de linguagem (GIANNOPOULOU et al., 2018).

Existem diversas terminologias utilizadas para descrição do déficit de oxigênio, sendo elas pouco distinguíveis na prática clínica, porém de importância técnica. A hipóxia refere-se a baixo teor de oxigênio no sangue, enquanto a isquemia representa redução do fluxo sanguíneo tecidual. A isquemia, por sua vez, pode ser parcial ou completa em extensão e pode ser focal ou global na distribuição. Em contraste, a asfixia indica um comprometimento das trocas gasosas e é caracterizada por anóxia e extremos de hipercalemia (LAPTOOK, 2016). Nesse projeto adotamos o termo anóxia neonatal, como privação severa do fornecimento de oxigênio no momento do nascimento, sendo uma causa prevalente de mortalidade e morbidade, constituindo importante problema público frente as sequelas neurológicas comumente observadas.

O processo do nascimento já pode ser associado a leve asfixia, onde ocorre diminuição da pressão de oxigênio circulante, porém, não causa danos ao neonato. Quando alterados fatores, como por exemplo quando o cordão umbilical se enrola na criança durante o parto, quando a placenta se separa prematuramente, interrompendo o fluxo de oxigênio ao bebê, quando sedativos dados a mãe atravessam a placenta e interferem na respiração ou se o muco ingerido durante o parto ficar preso à garganta do recém-nascido, há um aumento da predisposição do neonato a lesões decorrentes dessa privação excessiva e patológica (GLUCKMAN et al., 2001; JOHNSTON et al., 2002).

É sabido que o recém-nascido tolera mais a falta de oxigênio que adolescentes e adultos, porém quando a respiração é interrompida por mais de 3 ou 4 minutos é possível o aparecimento de danos cerebrais permanentes no indivíduo (SHAFFER e KIPP, 2012).

A anóxia neonatal, considerada condição clínica mundial e relevante no Brasil, vem sendo estudada no laboratório de Neurociências, ICB-USP, desde 2008. Tal condição afeta cerca de 0,2% das crianças nascidas a termo, chegando a 60% em bebês prematuros com baixo peso corporal (VANNUCCI; VANNUCCI, 1997). Esses dados configuram a importância do desenvolvimento de modelos animais para estudo dos fatores e mecanismos envolvidos nessa injúria, assim como possibilita a busca por técnicas ou procedimentos que possam contribuir para amenizar ou diminuir as complicações daí advindas.

1.2 REVISÃO HISTÓRICA - MODELOS DE ANÓXIA NEONATAL

Para entendimento mais amplo do tema foi avaliada a evolução temporal dos modelos relacionados à anóxia neonatal a partir da descoberta do oxigênio e de sua relevância orgânica, bem como as avaliações sobre causas e efeitos de sua privação para a vida.

A importância do oxigênio para a vida é condição crucial descrita por Aristóteles (384-322 a.C.), quando observou que o ar no alto das montanhas não era ideal para a vida (COURVILLE, 1947). A descoberta desse gás ocorreu entre 1772 e 1774 por Carl Wilhelm Scheele (1742-1786) e Joseph Priestley (1733-1804), sendo denominado oxigênio por Antoine Lavoisier (1743-1794). Os romanos, destacando Marcos Vitruvio (COURVILLE, 1947), foram talvez os primeiros a observar sua relação com a chama da vela para identificar condição adequada à respiração em minas longas e profundas; caso a chama continuasse acesa era evidência de que o ambiente continha suficiente oxigênio para manutenção da vida.

A partir de então, diversos pesquisadores observaram as características do quadro de 'sulfocacione' (John Chenk, 1644); Thomas Platter (1574-1628); Jean Riolan (1577-1657); Thomas Bartholin (1616-1680); Richard Lower (1631-1691); Johann Jakob Wepfer (1620-1695) e Charles Bonnet (1720-1793); O fisiologista britânico Sir Joseph Barcroft (1920) foi provavelmente um dos primeiros a definir algumas propriedades para o fenômeno da anóxia, previamente denominada como sufocação do recém-nascido por (Roederer, 1760, *asphyxia neophytorum* por Ehrhart entre 1785/1789, *asphyxia neonatorum* por Regnier em 1789 e morte aparente do recém-nascido por Lofler em 1792). O tema passou a ser abordado com modelos de

experimentação animal no decorrer do século XX, em diferentes espécies: Windle (1942/43) com cobaias, Morrison (1946) com cachorros e macacos, Campbell et al. (1968) com coelhos, e então, Rice et al. (1981), Levine (1960), Hershkowitz et al. (1983), Nyakas et al. (1991), Takada et al. (2011) e outros com estudos em ratos.

Tabela 1. Sumário de alguns Modelos de anóxia e suas características conforme revisão descrita

Pesquisador	Ano	Título	Animal	Idade (PN)	Método
Windle,	1942	Effects of anoxia at birth on the central nervous system of the guinea pig	Guinea Pig	Prévio ao nascimento	Clampeamento do vaso uterino ou pequenas incisões no útero em tempos variados de anóxia.
Morrison	1946	Histopathologic effects of anoxia on central nervous system	Cachorros e macacos	Não descrito	Câmara de aço e vidro com nitrogênio 50% ou gás introduzido através de máscara acoplada ao focinho do animal. Animal exposto a anóxia por dias consecutivos.
Levine	1960	Anoxic-Ischemic Encephalopathy in Rats	Ratos	Fêmeas de 100 a 300 gr	Ligação da carótida, onde a direita era isolada e a esquerda, cortada; a exposição ao óxido nítrico e ao nitrogênio.
Campbell et al.	1968	The effect of pretreatment with pentobarbital, meperidine, or hyperbaric oxygen on the response to anoxia and resuscitation in newborn rabbits	Coelhos	Menos de 48h pós natal	Câmara semi-hermética mantida entre 36 e 39°C, inflada com ambiente em nitrogênio a 35L/min por 2 minutos e 1,5 l/min por mais 8 minutos.
Hershkowitz et al.	1983	The effects of postnatal anoxia on behaviour and on the muscarinic and beta-adrenergic receptors in the hippocampus of the developing rat	Ratos	PN1	No primeiro dia pós natal, o animal era colocado em uma câmara de vidro com entrada e saída de gás e exposto a gás nitrogênio 100% por 25 minutos
Nyakas et al.	1991	Impaired Learning and Abnormal Open-field Behaviours of Rats After Early Postnatal Anoxia and the Beneficial Effect of the Calcium Antagonist Nimodipine	Ratos	PN 2 a 4	O animal, entre 2 e 4 dias pós-natal, era colocado em câmara com entrada e saída de gás nitrogênio 100% por 20 minutos e a temperatura ambiente a 28 °C.
Vannucci et al.	1997	A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage	Ratos	PN 7	Ligadura da artéria carótida unilateral, seguida de hipóxia sistêmica produzida pela inalação de Nitrogênio com equilíbrio de oxigênio a 8%.
Takada et al.	.2011	A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos-IR	Ratos	PN2	Câmara semi-hermética aquecida a 37°C por 25 minutos em ambiente a 100% de nitrogênio gasoso, fluxo de 3L/minuto a pressão de 101,7 kPa.

Desde 2008 foi desenvolvido e adaptado um modelo animal de anóxia em ratos Wistar neonatos no Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (TAKADA et al., 2011), por ser global e não invasivo, com o qual se tem buscado caracterizar o modelo em diferentes aspectos.

1.3 EFEITOS DA ANÓXIA NEONATAL

Agressões em períodos críticos de maturação do organismo, em especial do sistema nervoso, devido à sua alta demanda metabólica (OLIVERIA-ALONSO et al., 2007) podem modificar e mesmo comprometer eventos ontogenéticos com complicações persistentes na vida adulta (MORGANE et al., 1993). A anóxia neonatal, clinicamente, tem sido relacionada a retardos cognitivos e comportamentais, tais como: epilepsia, déficit de atenção, hiperatividade e problemas de aprendizado.

Estudos prévios deste laboratório com o modelo proposto para ratos encontraram prejuízos decorrentes desse estímulo em populações gliais (ALLEMANDI, 2011) e neuronais dessa região em animais com 7 dias de vida pós-natal, morte neuronal por apoptose e necrose através de Transmission electron microscopy (TEM ANALYSIS) (TAKADA et al., 2011, 2015) e decréscimo da neurogênese e do volume no hipocampo após anóxia neonatal demonstrada pelas técnicas de Fluoro-Jade B (FJB) em CA2-3 e Terminal Deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labeling assay (TUNEL) em CA1 e DG em regiões do hipocampo com o animal de 2 dias de vida (TAKADA et al., 2015).

Experimentos comportamentais evidenciaram que a anóxia neonatal altera também a capacidade de aprendizagem e memória (DELL'ANNA et al., 1997; CANNON et al., 2002; CAPUTA et al., 2005; ROGALSK et al., 2006; BUWALDA et al., 1995; ITO, 2010; TAKADA et al., 2015).

As consequências da privação de oxigênio estão relacionadas a alterações no metabolismo energético, desequilíbrio ácido-base, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular, perda do equilíbrio de água celular, processos inflamatórios e início de apoptose (LOIDL et al., 2000).

Foi observado, também, que esse estímulo provoca retardo na ontogênese da instalação de reflexos neonatais e no desenvolvimento sensório-motor, além de ganho de peso em relação ao controle e aumento dos diâmetros rostro-caudal e naso-anal,

evidentes já nas primeiras semanas de amamentação e que persistiram até a vida adulta (VASCONCELOS, 2013; KUMAR, 2017).

Portanto, a fim de avaliar as possíveis causas de alterações somáticas e de desenvolvimento, decidiu-se aprofundar neste estudo a análise da relação do hipotálamo com as mesmas, estrutura diretamente relacionada com o desenvolvimento do animal e o metabolismo energético, sendo utilizados camundongos *leptin reporters*, nos quais os receptores para leptina apresentam fluorescência sem necessidade de técnicas específicas. Para tal se fez necessário a validação do método de anóxia neonatal nesses animais.

1.4 HIPOTÁLAMO E LEPTINA

O hipotálamo, além de constituir região integradora dos sistemas nervoso, autonômico, endócrino e imunológico, possui íntima relação com o metabolismo energético. Este é evidenciado pelas vias eferentes do complexo nuclear hipotalâmico (núcleos paraventricular e supra-óptico) à neurohipófise e pelos fatores de liberação que controlam a produção hormonal da adeno-hipófise (LUNDY–EKMAN, 2004, p. 353 a 477).

Possui participação na manutenção da homeostase; expressão emocional de prazer, raiva, medo e aversão; regulação dos ritmos circadianos; regulação endocrinológica do crescimento, metabolismo e dos órgãos reprodutivos assim como do comportamento alimentar, assunto de interesse neste projeto, (LUNDY–EKMAN, 2004, p. 353 a 477).

Ambas as porções hipofisárias desempenham relevância metabólica exercem influência emocional e de desenvolvimento somático, assim como atuam nas respostas comportamentais, tais como: fome, saciedade, sede e comportamentos reprodutivos e defensivos (MORRISON; MADDEN, 2014; WEE ET AL., 2015), Os peptídeos de vasopressina e oxitocina, por exemplo, mamíferos podem atuar como mediadores do sistema nervoso central de comportamentos sociais, incluindo cuidado parental, pareamento, cognição social e agressão (YOUNG; WANG, 2004; MEYER-LINDENBERG ET AL., 2011). A região hipotalâmica compreende a porção ventral desde a lâmina terminal até o plano vertical posterior aos corpos mamilares e abaixo do sulco hipotalâmico até a superfície pial do assoalho do terceiro ventrículo, em ratos.

(PAXINOS, 2004). A relação do hipotálamo com o peso corpóreo foi inicialmente observada em experimentos com lesões bilaterais e efeitos antagônicos dependendo da região envolvida: na região lateral causaram anorexia em ratos, enquanto lesões na porção ventromedial induziram aumento na ingesta alimentar, tornando o animal obeso (HETHERINGTON; RASON, 1940).

A área de interesse que abrange o comportamento alimentar é composta, principalmente, pelos núcleos paraventricular, dorso e ventro-medial e arqueado, esses dois últimos, como demonstrado na Figura 1, apresentam neurônios responsivos à leptina.

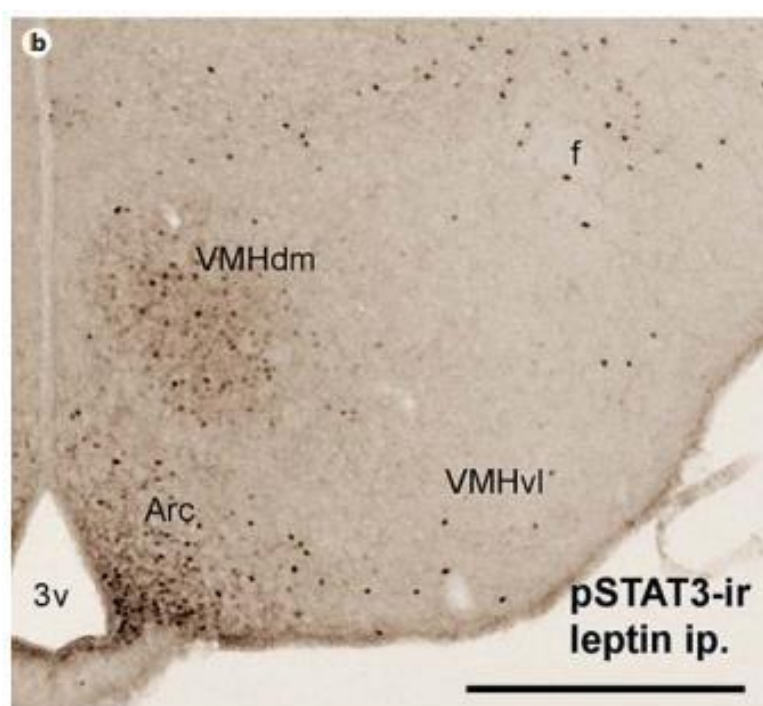


Figura 1. Distribuição dos neurônios responsivos a leptina nos núcleos VMH e Arc, visualizados por fosforilação de STAT3 imunorreativa induzida por leptina. 3V= Terceiro ventrículo; Arc= núcleo arqueado; VMHdm= subdivisão dorsomedial do VMH. Escala: 400 μ m. (DONATO JR. et al., 2011).

O aumento da adiposidade tem sido associado aos elevados níveis de leptina circulante em relação ao normal, hormônio chave na regulação do peso corporal, pois sua presença diminui a ingestão de alimentos e aumenta o gasto energético (BALLAND; COWLEY, 2015).

A leptina, proteína composta por 167 aminoácidos, possui estrutura semelhante às citocinas, do tipo interleucina 2 (IL-2) (ROMERO; ZANESCO, 2006), sendo produzida primordialmente pelo tecido adiposo (LEME, 2010; BADO et al., 1997; MUNZBERG; MORRISON, 2015). Entre suas funções, está o controle da ingestão alimentar por atuação em células do hipotálamo, onde inibe a formação dos neuropeptídeos orexígenos como o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada a agouti (AgRP ou agouti-related protein). Ela circula em níveis proporcionais à gordura corporal e atua como um sinal para o cérebro da quantidade de energia armazenada (PARK; AHIMA, 2015).

A leptina não é apenas crucial para a regulação da ingestão de alimentos e manutenção da homeostase energética, mas funciona como imunomodulador, interage com o circuito sono-vigília e regula o comportamento sexual junto com a função reprodutiva. Alguns pesquisadores acreditam que também desempenha papel na cognição, memória e humor (JOHNSTON et al., 2011; LU et al., 2006). Este ritmo diário está sob influência hormonal e é dependente do sexo e da disponibilidade energética (RIBEIRO et al., 2007).

Os receptores de leptina são codificados pelo gene diabetes (db) e pertencem à superfamília de receptores de citocinas classe I (LEE et al., 1996; TARTAGLIA et al., 1995). Splicing alternativo do gene db gera 6 isoformas do receptor da leptina, Ob-Ra - Ob-Rf. Ob-Re sendo a forma de receptor solúvel, ligando a leptina circulante e afetando sua estabilidade e disponibilidade (GAVRILOVA et al., 1997; YANG et al., 2004). As isoformas curtas são consideradas principalmente envolvidas endocitose e transporte de leptina através do sangue-cérebro barreira (BANKS et al., 1996; TU et al., 2007).

O receptor OB-Rb, de forma longa, pode ser abundantemente encontrado principalmente no hipotálamo, nos núcleos arqueado, paraventricular e ventromedial, além da área hipotalâmica lateral (FUNAHASHI et al., 2000), conforme demonstra figura 2. O núcleo arqueado apresenta maior concentração dos receptores de leptina, também detectados no núcleo ventromedial e dorsomedial do hipotálamo (SCHWARTZ et al., 1996a).

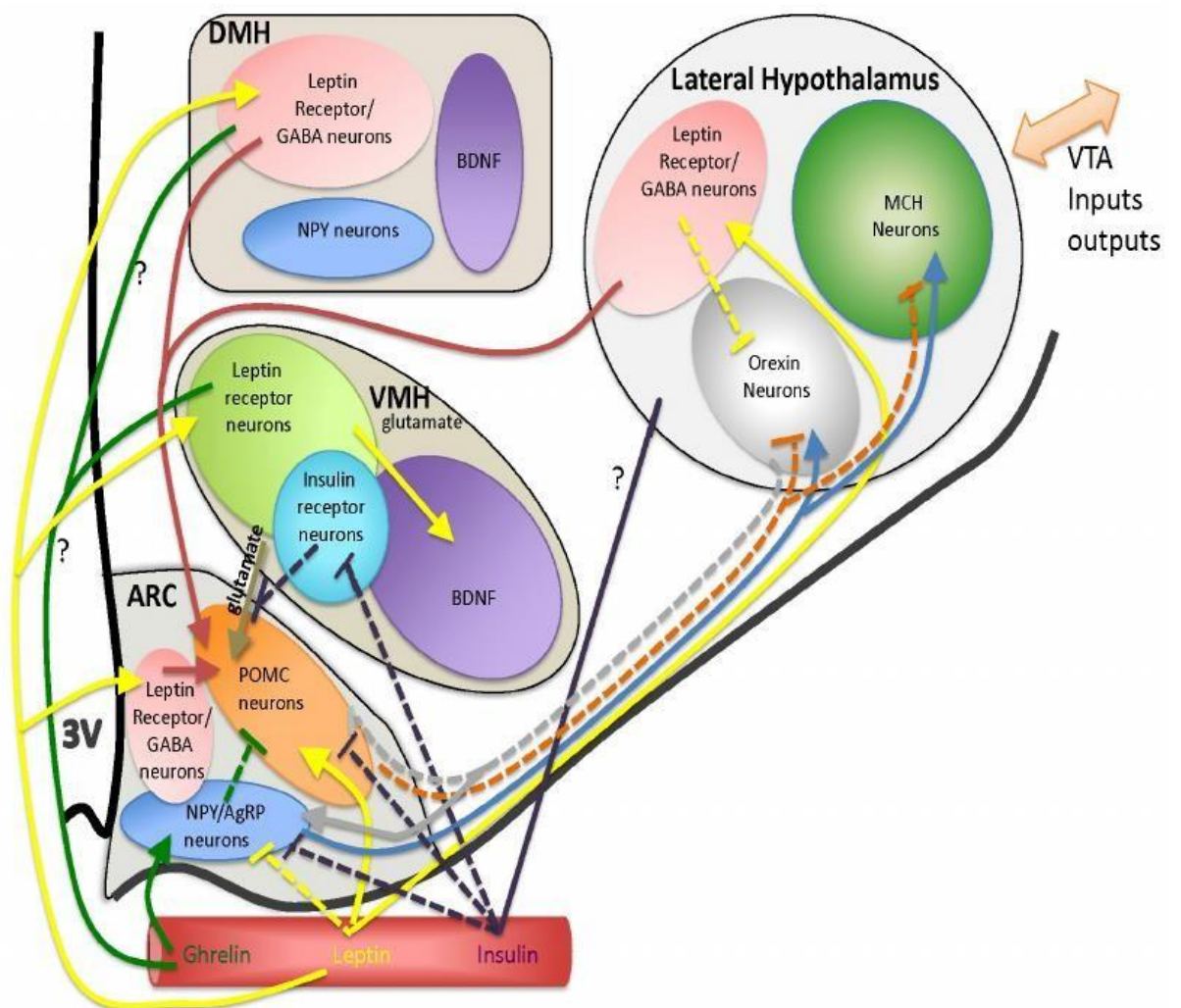


Figura 2. Circuito da leptina. Regulação neuroendócrina dos circuitos hipotalâmicos relacionados ao apetite (REICHENBACH et al., 2012).

O ARC abriga os neurônios AgRP e POMC, que por sua vez integram informações hormonais. A grelina aumenta o apetite pela ativação dos neurônios AgRP que subsequente inibe os neurônios POMC através de elementos GABAérgicos inibitórios. Tanto a leptina quanto a insulina inibem os neurônios AgPR. Os receptores de grelina estão presentes no VMH e no DMH, mas a função dos receptores é desconhecida até o momento. Os neurônios POMC no ARC suprimem o apetite e são ativados pela leptina e inibidos pela insulina. Os neurônios GABAérgicos que respondem à leptina são encontrados no DMH, LH e ARC e desempenham um papel mais importante na obesidade do que os receptores de leptina nos neurônios POMC. Os neurônios do POMC recebem um forte impulso glutamatérgico do VMH, que aumenta a atividade do POMC e suprime o apetite, mecanismo pelo qual o VMH pode

induzir a saciedade e quando lesionado resultar em obesidade. A leptina também ativa os neurônios VMH para suprimir o apetite, aumentando o estímulo glutamatérgico excitatório para os neurônios POMC ou aumentando a sinalização do BDNF no VMH, embora o mecanismo pelo qual o BDNF previne a obesidade permanece desconhecido. A insulina reduz o disparo neuronal do receptor de insulina VMH, que por sua vez reduz o estímulo excitatório nos neurônios POMC e restringe à saciedade. Há uma população transitória de NPY no DMH que aparece durante períodos de balanço energético negativo, como jejum prolongado, restrição calórica ou lactação e aumenta o apetite. O DMH contém uma população de neurônios GABA do receptor da leptina, que inibem o disparo neuronal POMC no ARC e suprime o apetite. No hipotálamo lateral, os neurônios da orexina estimulam a ingestão de alimentos, influenciando o sistema de melanocortina no ARC e também aumentando as propriedades recompensadoras dos alimentos no VTA. (REICHENBACH et al., 2012).

Em suma, a leptina, quando circulante, inibe neurônios NPY do núcleo Arc que inervam o núcleo PVN. Simultaneamente, ela ativa neurônios no núcleo DMH que também convergem ao núcleo PVN em neurônios que ativam projeções eferentes ao sistema neurovegetativo e a glândula hipófise, e também ativa neurônios no núcleo VMH que convergem nas áreas AHA/SPVZ, com densa aferência do núcleo supraquiasmático e projeção para o núcleo DMH (ELMQUIST et al., 1998).

A ligação da leptina ao seu receptor estimula a síntese de neuropeptídeos anorexigênicos como POMC, α -MSH, CRH e CART que provocam a sensação de saciedade. Quedas na concentração de leptina aumentam a produção de NPY e MCH, que estimulam o comportamento alimentar, diminuindo o metabolismo (GERBASI et al., 2012). O hipotálamo regula a ingesta alimentar, a homeostase da glicose e o metabolismo energético. A falta de leptina circulante, aumenta os riscos de aterosclerose, obesidade, diabetes tipo 2 e o surgimento de doenças neurodegenerativas. No hipocampo, o aumento de leptina promove neurogênese e sinaptogênese, facilitando o aprendizado e a memória. A ativação das vias PI3K/Akt, JAK, TAT e mk/sirt, promovem sobrevivência neuronal e redução do clearance de $A\beta$ e da fosforilação de Tau. Observa-se que a Leptina também exerce influência na sobrevivência neuronal, além da neurogênese e sinaptogênese (MARWARHA; GHRIBI, 2012).

Estudos recentes indicam que a leptina pode circular na forma livre, ou ainda ligada a receptores solúveis (Ob-Re), que parecem postergar a ação desse hormônio pelo aumento de sua meia-vida, sendo a forma livre mais ativa (RIBEIRO et al., 2007). Hickey et al. (1997), afirmam que as mulheres necessitam de maior liberação de leptina por pulso, para manterem o seu peso corporal, apresentando concentração de duas a três vezes maiores que os homens, observando-se que a gordura subcutânea (maior nas mulheres que nos homens) secreta mais esse hormônio do que a gordura visceral. (PARK et al., 2015). Tem sido observada relação direta do aumento de leptina com gordura total, independentemente de sua localização na topografia corporal (PISABARRO et al., 1998).

Indivíduos obesos, em geral, apresentam concentração elevada de leptina, sugerindo resistência a esse hormônio (figura 3). A obesidade devido à deficiência de leptina é rara (IOFFE et al., 1998). Comumente, a hiperleptinemia é uma característica da obesidade, sugerindo a existência de resistência ao o hormônio nos níveis central e periférico (FREDERICH et al., 1995). Os mecanismos que levam ao desenvolvimento da resistência à leptina não são claros, mas várias possibilidades foram postuladas, como uma falha do hormônio para atravessar a barreira-hemato-encefálica e atuar sobre seus neurônios-alvo (RIBEIRO et al., 2007) e redução na expressão de receptores de leptina. Alguns autores acreditam que a expressão aumentada de SOCS-3 (supressor de sinalização de citocinas) ao manter a ligação da leptina ao seu receptor, simula mecanismo de retroalimentação, causando resistência à leptina (MÜNZBERG; MYERS, 2005).

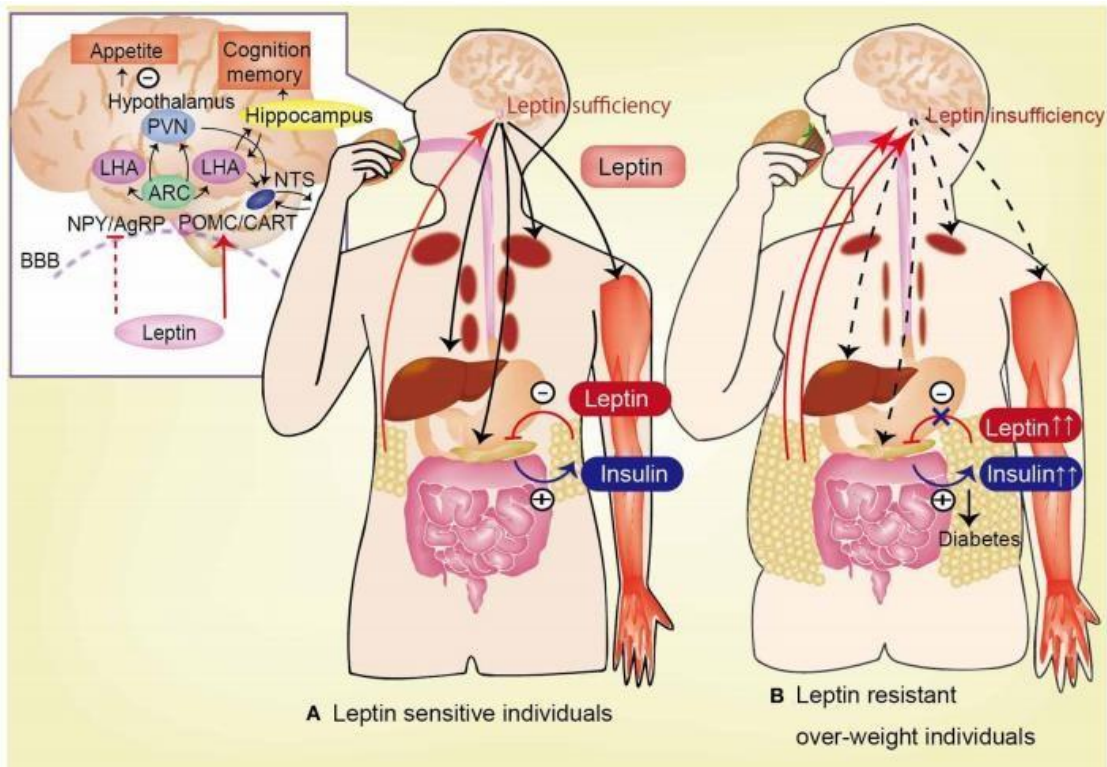


Figura 3. Estruturas envolvidas na interrelação da Leptina, insulina e obesidade. No hipotálamo, a leptina ativa neurônios POMC e CART e inibe NPY e AgRP, induzindo saciedade. Em indivíduos sensíveis a leptina, ocorre inibição da síntese e secreção de insulina pelas células β do pâncreas, o que estimula a secreção de leptina pelo tecido adiposo. AgRP, *agouti-related protein*; ARC, núcleo arqueado; CART Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina; LH, área hipotalâmica lateral; NPY, neuropeptídeo Y; POMC, Proopiomelanocortina. (AMITANI et al., 2013).

A relevância do presente estudo encontra justificativa nas alterações decorrentes da anóxia neonatal que demonstram prejuízos às células da glia e neurônios do hipocampo e alteração de parâmetros somáticos e do desenvolvimento. Esses resultados sugerem a hipótese de envolvimento da leptina e dos núcleos hipotalâmicos onde atua, bem como de seus níveis circulantes. Camundongos $LepRb^{EGF}$, animais geneticamente modificados cujos neurônios que expressam o receptor de leptina são naturalmente fluorescentes, representam ferramenta valiosa em estudos que buscam avaliar a ativação neuronal das áreas relacionadas com o comportamento alimentar e leptina, pela sua co-localização com a proteína FOS.

Torna-se importante ressaltar que a concentração de leptina plasmática em mulheres (pós-puberal) é maior que a dos homens, decorrente da maior porcentagem de gordura corpórea e da influência dos hormônios sexuais (FRUHBECK et al., 2001), salientando a utilização de machos e fêmeas nesse estudo.

Aliada à vantagem desse modelo animal, está o modelo experimental de anóxia proposto que, por constituir estímulo global e não invasivo em roedores neonatos, cuja fase de desenvolvimento é similar à de humanos com 6 meses de idade gestacional, simula a condição clínica dos prematuros humanos, (SEMPLE et al., 2013) e pode fornecer dados importantes para melhor compreender a dinâmica subjacente ao processo de anóxia, assim como propiciar o desenvolvimento de estratégias e procedimentos para minimizar ou prevenir os efeitos desse estímulo no desenvolvimento.

6. CONCLUSÕES

1. O modelo de anóxia neonatal foi efetivamente padronizado para camundongos. Tal estímulo foi capaz de causar diminuição nos batimentos cardíacos, nível de oxigênio circulante e no valor na escala de Apgar significantes.
2. A anóxia neonatal causou alterações na ontogênese dos reflexos dos animais anóxia que apresentaram retardo significativo no surgimento da aceleração, geotaxia negativa e resposta ao susto e recuperação de decúbito, sendo que as fêmeas apresentaram primeiro o desenvolvimento do reflexo.
3. A anóxia neonatal afetou os parâmetros de desenvolvimento somático avaliados de maneiras distintas, porém, o grupo anóxia macho apresentou dimensões aumentadas em relação aos outros grupos.
4. Não foi possível observar diferenças significantes nas dosagens de leptina circulante quando comparados animais anoxiados e seus respectivos controles
5. Foi possível observar receptores de leptina ativos nos núcleos ventromedial, visualizados pela coloração fluorescente, arqueado e dorsomedial do hipotálamo, observando co-localização de c-fos nos núcleos ARC e DM.
6. A comparação dos valores absolutos com os valores de glicemia, não indicou diferença entre grupos, porém os tempos de avaliação apresentaram diferenças significativas, indicando padrão funcional típico.

8. REFERÊNCIAS

ALLEMANDI, W. Estudo da imunorreatividade da proteína S100 β no Hipocampo e Núcleo do Trato Solitário de ratos neonatos submetidos à anóxia. 2011. 119 f. **Tese (Doutorado em Ciências)**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. The apgar score. **The American College of Obstetricians and Gynecologists**, n. 644, 2015.

AMITANI, M.; ASAKAWA A.; AMITANI H.; INUI A. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 51, p. 1–12, 2013.

APGAR, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. **Anesthesia and Analgesia**, v. 120, p. 1056–1059, 2015.

BADO A. et al. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v. 394, p. 790–793, 1997.

BALLAND, E.; COWLEY, M. A. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 39, p. 59–65, 2015.

BANKS, W. A. et al. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. **Peptides**, v. 17, p. 327–334, 1996.

BERBARI. N. F. et al. Leptin resistance is a secondary consequence of the obesity in ciliopathy mutant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 19, p. 7796–801, 2013.

BERNARDIS, L. L. PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal Endocrinology**, v. 40, p. 527–528, 1968.

BJORK, R. A.; DUNLOSKEY, J.; KORNEILL, N. Self-regulated learning: Beliefs, techniques, and illusions. **Annual Review of Psychology**, v. 64, p. 417–444, 2013.

BOLLES RC, WOODS PJ. The ontogeny of behaviour in the albino rat. **Anim Behav.** 12: 427-41, 1964.

BONAZZI, A. et al. Regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia and peroxisome proliferators in the corneal epithelium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2837–2844, 2000.

BUWALDA, B.; NYAKAS, C.; VOSSelman, H.J.; LUITEN, P.G.M. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 67, p. 85–90, 1995.

CAMPBELL, A. G.; MILLIGAN, J. E.; TALNER, N. S. The effect of pretreatment with pentobarbital, meperidine, or hyperbaric oxygen on the response to anoxia and resuscitation in new born rabbits. **The Journal of Pediatrics**, v. 72, n. 4, p. 518–527, 1968.

CANNON, M.; JONES, P.B.; MURRAY, R.M. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, p. 1080–1092, 2002.

CAPUTA, M.; ROGALSKA, J.; WENTOWSKA, K.; NOWAKOWSKA, A. Perinatal asphyxia, hyperthermia and hyperferremia as factors inducing behavioural disturbances in adulthood: a rat model. **Behavioral Brain Research**, v. 163, n. 2, p. 246–256, 2005.

CARO, J. F. et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **The Lancet**, v. 348, n. 9021, p. 159–161, 1996.

CARON, E. Distribution of Leptin-Sensitive Cells in the Postnatal and Adult Mouse Brain. **The Journal of Comparative Neurology, Research in Systems Neuroscience**, v. 518, p. 459–476, 2010.

COURVILLE, C. B.: Asphyxia Following Nitrous Oxide Anesthesia. **Medicine**, v. 15, n. 129, 1936.

COURVILLE, C. B.: Cerebral anoxia and its residuals. **Medical Arts and Sciences**, p. 16-27, 35-44, 68-78, 1947.

DELL'ANNA E.; IUUVONE L.; CALZOLARI S.; GELOSO, M.C. Effect of acetyl-L-carnitine on hyperactivity and spatial memory deficits of rats exposed to neonatal anoxia. **Neuroscience Letters**, v. 223, p. 201-205, 1997.

DONATO, 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. **The Journal of Clinical Investigation's**, v. 121, n. 1, 2011.

ELMQUIST, J. K. et al. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 2, p. 741–746, 1998.

FERREIRA, M. J.; ZANESCO, A. Heart rate variability as important approach for assessment autonomic modulation. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 22, n. 2, 2016.

FREDERICH, R. C. et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nature Medicine**, v. 1, n. 12, p. 1311–1314, 1995.

FRÜHBECK, G. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 280, p. E827–E847, 2001.

FUNAHASHI, H, et al. Ultrastructural localization of the receptor for leptin in the rat hypothalamus. **Hormones and Behavior**, v. 37, p. 327–334, 2000.

GAVRILOVA, O. et al. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 272, p. 30546–30551, 1997.

GELONEZE, B.; LAMOUNIER, R. N. COELHO, O. R. Postprandial hyperglycemia: treating its atherogenic potential. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. 604–613, 2006.

GERBASI, A. B.; LAVRINI, P. L.; TRENTIN, Â. DE C. Leptina e grelina: O papel na

patogênese da obesidade. **Saudi Medical Journal**, v. 33, p. 28, 2012.

GIANNOPOULOU, I.; PAGIDA, M. A.; BRIANA, D. D.; PANAYOTACOPOULOU, M. T. Perinatal hypoxia as a risk factor for psychopathology later in life: the role of dopamine and neurotrophins. **Hormones**, v 17, p. 25-32, 2018.

GLUCKMAN, E. Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1860-1861, 2001.

GRAHAM, E.M. et al. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199(6), p.587–595, 2008.

GRIFFIN, M. Gender-related differences in proliferative response of cardiac fibroblasts to hypoxia: Effects of estrogen. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 215, p. 2 – 30, 2000.

HERSHKOWITZ, M.; GRIMM, V. E.; SPEISER, Z. The effects of postnatal anoxia on behavior and on the muscarinic and beta-adrenergic receptors in the hippocampus of the developing rat. **Developmental Brain Research**. v. 7, p.147–155, 1983.

HETHERINGTON, A. W.; RASON, S. W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **The Anatomical Record**, p. 149–172, 1940.

HICKEY, M. S. et al. Gender-dependent effects of exercise training on serum leptin levels in humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 272, n. 4, p. E562–E566, 1997.

HUANG, S. C.; WONG, M. K.; WANG, J. S. Systemic hypoxia affects cardiac autonomic activity and vascular hemodynamic control modulated by physical stimulation. **European Journal of Applied Physiology**, v. 106, p. 31–40, 2009

IOFFE, E. et al. Abnormal regulation of the leptin gene in the pathogenesis of obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 20, p. 11852–11857, 1998.

ITO, P. H. Avaliação comportamental de ratos submetidos à anóxia neonatal. 2010. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 107 f, 2010.

JOHNSTON, J. M. et al. Repositioning leptin as a therapy for Alzheimer's disease. **Therapy**, v. 8, n. 5, p. 481–490, 2011.

JOHNSTON, L. B.; ARENDS, N.; DAHLGREN, J.; LEGER, J.; CZERNICHOW, P.; ALBERTSSON-WIKLAND, K.; VAN DUIJN, C.; HOKKEN-KOELEGA, A.; SAVAGE, M. O.; CLARK, A. J. Gene association studies in small for gestational age infants. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 15, 2002.

KANAI, M. et al. Alterations in autonomic nervous control of heart rate among tourists at 2700 and 3700 m above sea level. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 12, p. 8–12, 2001.

KUMAR, A. J. et al. Sex differences in somatic and sensory motor development after neonatal anoxia in Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, v. 333, p.242–250, 2017.

KUMAR, A. J. Influência de gênero no desenvolvimento somático e sensorio motor de ratos Wistar submetidos à anóxia neonatal. 2017. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 76 f, 2017.

LAPTOOK, A. R. Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant. **Clinics in Perinatology**, v 43, Issue 3, p. 529-545, 2016.

LEE, G. H. et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v. 379, p. 632–635, 1996.

LEINNINGER, G. M.; JO, Y. H.; LESHAN, R. L; et al. Leptin Acts via Leptin Receptor-Expressing Lateral Hypothalamic Neurons to Modulate the Mesolimbic Dopamine System and Suppress Feeding. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 2, p. 89–98, 2009.

LEME, J. A. C. DE A. Efeitos do treinamento físico moderado nas concentrações de grelina, leptina e no eixo GH-IGF em ratos diabéticos. 2010. **Tese (Doutorado em**

Ciências da Motricidade), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 96 f, 2010.

LEVINE S. Anoxic–ischemic encephalopathy in rats. **American Journal of Pathology**, v. 36, p. 1–37, 1960.

LIU, X. X. et al. Analysis of heart rate variability during acute exposure to hypoxia. **Space Medicine & Medical Engineering**, v. 14, p. 328–331, 2001.

LOIDL, C. F. et al. Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. **Physiology & Behavior**, v. 68, n. 3, p. 263–269, 2000.

LU, X. Y. et al. Leptin: A potential novel antidepressant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1593–1598, 2006.

LUNDY-EKMAN, L. Neurociência: fundamentos para a reabilitação. 2a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 353-477, 2004.

MARWARHA, G.; GHRIBI, O. Leptin signaling and Alzheimer's disease. **American Journal of Neurodegenerative Disease**, v. 1, n. 3, p. 245–65, 2012.

MAYER, J. BARNETT, R. J. Sensitivity to cold in the hereditary obese-hyperglycemic syndrome of mice. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 26, n.1, p. 38–45, 1953.

MEYER-LINDENBERG, A. et al. Oxytocin and vasopressin in the human brain: Social neuropeptides for translational medicine. **Nature Neuroscience**, v. 12, p. 524, 2011.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993.

MORRISON, L. R. Histopathologic effects of anoxia on the central nervous system. **Archives of Neurology & Psychiatry**, v. 55, p. 1–34, 1946.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J. Central nervous system regulation of brown adipose tissue. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1677–713, 2014.

MOURA, R. F. et al. Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 5, p. 422– 426, 2008.

MÜNZBERG, H.; MORRISON, C. D. Structure, production and signaling of leptin. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 13–23, 2015.

MÜNZBERG, H.; MYERS, M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 566–570, 2005.

NAGAISHI, V. S.; CARDINALI, et al. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. **Neuroscience**, v. 259, n. 0, p. 71–83, 2014.

NAKAZATO, M. et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 409, 2001.

NERY, C. S. et al. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, 2011.

NIRMALAN, N.; NIRMALAN, M. Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 11, n. 7, p. 279–283, 2017.

NORTJE, J.; GUPTA, A. K. The role of tissue oxygen monitoring in patients with acute brain injury. **British Journal of Anesthesia**, v. 97, n. 1, p. 95–106, 2006.

NYAKAS C.; MARKEL E.; SCHURMAN T.; LUITEN P. G. Impaired learning and abnormal open-field behaviours of rats after early postnatal anoxia and the beneficial effect of the calcium antagonist nimodipine. **European Journal of Neuroscience**, v. 3, p. 168–174, 1991.

OLIVEIRA-ALONSO, G. S.; SILVEIRA, V. C.; FERNANDES, A. C.; et al. Lesões encefálicas infantis adquiridas. AACD medicina e reabilitação: Princípios e Prática. **Manole**, 3 ed., p. 161–172, 2007.

PARK, H. K.; AHIMA, R. S. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. **Metabolism: Clinical And Experimental**, v. 64, n. 1, p. 24–34, 2015.

PAPILE, M. D. The apgar score in the 21st century. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 519-520, 2001.

PAXINOS, G. The rat nervous system. **Elsevier INC**, 3a ed, 2004.

PERRONE, S.; BRACCIALI C.; VIRGILIO, N.; BUONOCORE, G.; Oxygen Use in Neonatal Care: A Two-edged Sword. **Frontiers in Pediatrics**, v. 4, p. 1-7, 2017.

PISABARRO R. et al. Leptina: ¿un marcador de riesgo metabólico? **International Archives of Medicine**, v. 20, n. 3, p. 113–115, 1998.

REICHENBACH, A.; STARK, R.; ANDREWS, Z. B. Hypothalamic control of appetite and energy metabolism. **Research Gate**, p. 1–35, 2012.

REJMSTAD, P. et al. A method for monitoring of oxygen saturation changes in brain tissue using diffuse reflectance spectroscopy. **Journal Biophotonics**, p. 1–10, 2016.

REZAI-ZADEH, K. et al. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. **Molecular Metabolism**, v. 3, p. 681–693, 2014.

RIBEIRO, S. M. L. et al. Leptina: aspectos sobre o balanço energético, exercício físico e amenorréia do esforço. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 1, p. 11–24, 2007.

RICE J. E.; VANNUCCI R. C.; BRIERLEY J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in therat. **Annals of Neurology**, v. 9, p. 131–141, 1981.

ROGALSKA, J.; CAPUTA, M.; WENTOWSKA, K.; NOWAKOWSKA, A. Stress-induced behaviour in adult and old rats: effects of neonatal asphyxia, body temperature and chelation of iron. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. 8, p. 17-34, 2006.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 85–91, 2006.

SCHMUTZHARD, J.; GLUECKERT, R.; SERGI, C.; SCHWENTNER, I.; ABRAHAM, I.; SCHROTT-FISCHER, A. Does perinatal asphyxia induce apoptosis in the inner ear?, **Hearing Research**, v. 250, p. 1-9, 2009.

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, p. 531–535, 1996.

SCHWARTZ MW, SEELEY RJ, CAMPFIELD LA, et al. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 5, p.1101–1106, 1996.

SCOTT, M. M. et al. Leptin targets in the mouse brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 514, n. 5, p. 518–532, 2009.

SEMPLE B. D. et al. Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, p. 1–16, 2013.

SHAFFER, D. R.; KIPP, K. Psicologia do desenvolvimento: Infância e adolescência. 7. ed. São Paulo: **Cengage Learning**. 879 p, 2012.

STIEG, M. R. et al. Leptin: A hormone linking activation of neuroendocrine axes with neuropathology. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p.47–57. 2015.

SWIETEN, M. M. H. et al. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 61, p. 207–220. 2014.

TAKADA, S. H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 1, p. 62–69, 2011.

TAKADA, S. H. et al. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience**, v. 284, p. 247–259, 2015.

TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, p. 1263–1271, 1995.

TU, H. et al. Convergent trafficking pattern of leptin after endocytosis mediated by ObRa-Ob-Rd. **Journal of Cellular Physiology**, v. 212, p. 215–222, 2007.

UPADHYAY, J.; FARR, O. M.; MANTZOROS, C. S. The role of leptin in regulating bone metabolism. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 1, p. 105–113. 2015.

VANNUCCI, R. C.; VANNUCCI, S. J. A model of Perinatal Hypoxic-Ischemic **Brain Damage**. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 835, p. 234–249, 1997.

VASCONCELOS, R. G. Efeito da influência da anóxia neonatal no comportamento maternal e o desenvolvimento somático e sensório-motor de ratos wistar. 2013. **Tese (Doutorado em Ciências)**. Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, 97 f, 2013.

WEE, N. K. Y. et al. The brain in bone and fuel metabolism. **Bone**, v. 82, p. 23, 2015.

WINDLE, W. F.; BECKER, R. F. Asphyxia neonatorum. An experimental study in the guinea pig. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 45, p. 183-200, 1943.

WINDLE, W. F.; BECKER, R. F. Effects of anoxia at birth on the central nervous system of the guinea pig, **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 51, p. 213-215, 1942.

XU, K. Gender differences in hypoxic acclimatization in cyclooxygenase-2-deficient mice. **Physiological Reports**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2017.

YANG, G. et al. Modulation of direct leptin signaling by soluble leptin receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 1354–1362, 2004.

YAO, M. et al. Field methods for body composition assessment are valid in healthy Chinese adults. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 310–317, 2002.

YOUNG, L. J; WANG, Z. The neurobiology of pair bonding. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 1048, 2004.

ZHANG, Y. et al. Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 1873–1884, 2011.