



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS- SBFIS**

DANIELA DE OLIVEIRA GUSMÃO

**RELAÇÃO ENTRE LEPTINA, PEPTÍDEO NATRIURÉTICO
ATRIAL E ESTRÓGENO EM UM MODELO ANIMAL DE
HIPERTENSÃO ASSOCIADA À OBESIDADE**

Vitória da Conquista, BA

2012

DANIELA DE OLIVEIRA GUSMÃO

**RELAÇÃO ENTRE LEPTINA, PEPTÍDEO NATRIURÉTICO
ATRIAL E ESTRÓGENO EM UM MODELO ANIMAL DE
HIPERTENSÃO ASSOCIADA À OBESIDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Universidade Federal da Bahia - UFBA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Najara de Oliveira Belo (UFBA)
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-Orientadora: Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis (UFMG)
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Vitória da Conquista, BA

2012

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Gusmão, Daniela de Oliveira

Relação entre leptina, peptídeo natriurético atrial e estrógeno em um modelo animal de hipertensão associada à obesidade / Daniela de Oliveira Gusmão - 2012.
96 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Najara de Oliveira Belo; Prof^a. Co-orientadora: Dr^a Adelina Martha dos Reis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2012.

1. Hipertensão - Obesidade. 2. Estrógenos. 3. Fator Natriurético Atrial. 4. Leptina. I. Universidade Federal da Bahia. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. II. Título.

CDU – 616.12-008.331.1

DANIELA DE OLIVEIRA GUSMÃO

**RELAÇÃO ENTRE LEPTINA, PEPTÍDEO NATRIURÉTICO
ATRIAL E ESTRÓGENO EM UM MODELO ANIMAL DE
HIPERTENSÃO ASSOCIADA À OBESIDADE**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas/ Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia.

Belo Horizonte – MG, 21 de março de 2012.

Najara de Oliveira Belo

Prof^a. Dr^a. Najara de Oliveira Belo
Universidade Federal da Bahia

Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Ribeiro Vieira
Universidade Federal de Minas Gerais

Maria José Campagnole dos Santos

Prof^a. Dr^a. Maria José Campagnole dos Santos
Universidade Federal de Minas Gerais

Adelina Martha dos Reis

Prof^a. Dr^a. Adelina Martha dos Reis
Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Luiz Augusto e Angelita.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos, e por Sua onipotência, que me concede serenidade para enfrentar os obstáculos.

Aos meus pais, Angelita e Luiz Augusto, pelo amor, carinho, dedicação e constante incentivo aos meus estudos, desde muito cedo. Ao apoio e segurança transmitidos, que me permitiram ir ao encontro dos meus objetivos. E à minha irmã Gisele, pelo apoio e carinho.

Ao meu namorado, Anderson, pelo amor, carinho, companheirismo e presença constante.

À Profa. Dra. Najara de Oliveira Belo, minha orientadora, pela confiança, amizade, apoio e inteira disponibilidade em orientar e dividir seus conhecimentos durante a execução deste trabalho científico. Pelos valorosos conselhos e, sobretudo, pelo exemplo admirável de dedicação e amor à pesquisa.

À Profa. Dra. Adelina Martha dos Reis, por ter aceito ao convite de co-orientação, por ter me proporcionado a oportunidade de vivenciar experiências novas em seu laboratório e pela constante atenção e preocupação durante todo o período que eu estive na UFMG.

Às Profas Dra. Maria Aparecida Vieira e Dra. Maria José Campagnole pelo aceite ao convite de participarem da banca avaliadora deste trabalho.

Aos profs. da UFBA, em especial à Profa. Dra. Telma de Jesus Soares pelo carinho, apoio contínuo e inteira disponibilidade em nos orientar como coordenadora local do Programa Multicêntrico de Pós- Graduação e à Profa. Dra. Amélia Cristina Mendes de Magalhães pela receptividade, carisma, sensibilidade e apoio em momentos importantes.

Aos colegas de mestrado Raymundo, Everaldo, Ana Carolina, Lilianny, Kelly, pela convivência harmoniosa, diálogo prazeroso em diversos momentos e troca de experiências. Em especial, à Samira, pela amizade e companheirismo construídos, e pelos momentos de tantas alegrias e dificuldades compartilhados.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFIS), pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos, através de um excelente curso de mestrado, bem como por favorecer a oportunidade de vivenciar novas e enriquecedoras experiências na UFRJ e UFMG.

Aos professores e colegas de disciplinas da UFRJ e UFMG, pelos ensinamentos transmitidos e receptividade, respectivamente.

A todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Endócrina da UFMG, pelo ótimo convívio, bons momentos e troca de informações durante o período que estive em Belo Horizonte.

Aos colegas de laboratório Alfredo, Carol, Clarissa, Thiago, Gleisy, Jucimara, Fernanda, Elidiane e Cristiane pela convivência harmoniosa e auxílio em algumas partes deste trabalho.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro, de fundamental importância para a realização deste trabalho.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de auxílio mestrado, que me manteve financeiramente durante esta etapa da minha vida.

A todos os amigos e familiares, que torceram por mais uma vitória, e a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para tornar possível a concretização deste objetivo.

"Se houver amor em sua vida, isso pode compensar muitas coisas que lhe fazem falta. Caso contrário, não importa o quanto tiver, nunca será o suficiente."

Friedrich Nietzsche

GUSMÃO, Daniela de Oliveira Gusmão. Relação entre leptina, peptídeo natriurético atrial e estrógeno em um modelo animal de hipertensão associado à obesidade. 96f. il. 2012. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

RESUMO

Introdução: Vários mecanismos estão sendo propostos para explicar a relação entre hipertensão e obesidade. Além dos baixos níveis de peptídeo natriurético atrial (ANP), o aumento da ativação do fluxo simpático pela leptina parecem ser mecanismos importantes na patofisiologia da hipertensão associada à obesidade. Em mulheres, esse quadro de hipertensão associada à obesidade parece ter a influência do estradiol, e este, parece influenciar a síntese tanto de ANP, in vivo, quanto de leptina, em cultura de adipócitos. Diante do exposto, nosso objetivo geral foi avaliar a relação entre leptina, peptídeo natriurético atrial e estrógeno em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) alimentadas com dieta hiperlipídica.

Metodologia: Foram utilizadas 24 ratas SHR de dez semanas. As ratas foram ovariectomizadas (O) ou sham-operadas (S). Os animais receberam dieta com alto teor de lipídeos (54,4% de lipídeos-DL) ou dieta controle (DC) por 24 semanas e foram divididos em quatro grupos com seis animais cada (DCS: sham-operadas mais dieta controle, DCO: ovariectomizadas mais dieta controle, DLS: sham-operadas mais dieta hiperlipídica, DLO: ovariectomizadas mais dieta hiperlipídica). Foram mensurados o peso corporal e a pressão arterial semanalmente. Nas duas últimas semanas de dieta os animais ovariectomizados receberam diariamente terapia de reposição hormonal (TRH) com 17 β -estradiol (E2: 5ug/0,1ml/100g de peso corporal) ou veículo (VEH: óleo de milho 0,1ml/100g de peso corporal). Em seguida as ratas foram sacrificadas e o sangue foi coletado para dosagem de ANP, estradiol e leptina por ELISA. Também foram retirados os átrios direito e esquerdo, para determinação da expressão gênica de ANP, e os depósitos de tecido adiposo mesentérico, parametrial e retroperitoneal, para determinação da expressão gênica de leptina por RT-PCR.

Resultados: As ratas ovariectomizadas e as alimentadas com dieta hiperlipídica apresentaram tanto aumento de peso corporal (DCS: 242,6 \pm 7,4; DLS: 267,0 \pm 6,8; DCO: 311,1 \pm 1,7; DLO: 266,4 \pm 1,1g, $p < 0,05$ vs DCS) quanto de pressão arterial sistólica (DCS:133 \pm 4; DLS:147 \pm 4; DCO:146 \pm 3; DLO:145 \pm 3 mmHg, $p < 0,05$ vs DCS), quando comparadas ao grupo controle. A TRH reduziu tanto o peso corporal (DCO-VEH: 311,1 \pm 1,7; DCO-E2: 286,9 \pm 2,7g, $p < 0,05$) quanto a pressão arterial dos animais ovariectomizados e alimentados com dieta controle (DCO-VEH:146 \pm 3; DCO-E2:138 \pm 2 mmHg, $p < 0,05$), mas não teve efeito nos animais alimentados com dieta hiperlipídica. A terapia estrogênica promoveu aumento dos níveis de estradiol plasmático das ratas ovariectomizadas a valores fisiológicos (DCO-VEH: 17,3 \pm 2,4; DCO-E2: 44,6 \pm 3,2; DLO-VEH: 14,1 \pm 2,9; DLO-E2: 46,6 \pm 4,1pg/ml, $p < 0,05$). A redução da pressão arterial foi acompanhada por aumento de 62% na concentração plasmática de ANP nos animais tratados com E2 comparados ao grupo que recebeu veículo. Uma correlação inversa entre a concentração plasmática de ANP e a pressão arterial sistólica foi observada no grupo DC ($p = 0,035$; $r = -0,668$). A síntese atrial de ANP também foi aumentada pelo E2 nos animais DC tanto em átrio

direito quanto em átrio esquerdo. Tanto a ovariectomia quanto a DL aumentaram os níveis plasmáticos de leptina (DCS: 7.605 ± 161 ; DLS: 10.128 ± 123 ; DCO: 11.989 ± 558 ; DLO: 10.422 ± 559 pg/ml, $p < 0,05$ vs DCS). Todavia, o 17-beta-estradiol reduziu os níveis de leptina somente nos animais ovariectomizados alimentados com DC (DCO-VEH: 11.989 ± 558 ; DCO-E2: 4.068 ± 1636 pg/ml, $p < 0,05$). Essa redução foi acompanhada por diminuição da expressão gênica de leptina nos depósitos de tecido adiposo mesentérico e parametrial. Somente nos animais DC foi observada correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de ANP e estradiol ($p = 0,0037$, $r = 0,8201$), bem como uma correlação inversa entre as concentrações plasmáticas de leptina e estradiol ($p = 0,0493$, $r = -0,6128$) e entre as concentrações plasmáticas de ANP e leptina ($p = 0,0449$, $r = -0,6775$).

Conclusão: O tratamento com estradiol está associado com um aumento na síntese atrial e liberação de ANP e com uma diminuição na síntese e liberação de leptina em SHR ovariectomizadas. Da mesma forma, o aumento do ANP plasmático está inversamente correlacionado com a liberação de leptina. Essas alterações hormonais podem estar envolvidas na redução da pressão arterial sistólica e do peso corporal apresentados por esses animais após o tratamento hormonal. No entanto, a dieta hiperlipídica bloqueou os efeitos produzidos pelo estradiol demonstrando seu efeito deletério sobre o sistema cardiovascular e endócrino.

Apoio Financeiro: CNPq e CAPES.

Palavras-chaves: hipertensão, obesidade, estrógeno, peptídeo natriurético atrial, leptina.

GUSMÃO, Daniela de Oliveira Gusmão. Relationship among leptin, atrial natriuretic peptide and estrogen in an animal model of hypertension associated to the obesity 96pp. ill. 2012. Master Dissertation – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

ABSTRACT

Introduction: Several mechanisms have been proposed to explain the relationship between hypertension and obesity. In addition to the low levels of atrial natriuretic peptide (ANP), the activation of sympathetic outflow by leptin appears to be an important mechanism in the pathophysiology of hypertension associated with obesity. In women, hypertension associated with obesity seems to have the influence of estradiol. Estradiol appears to influence both, the synthesis of ANP in vivo and leptin in cultured adipocytes. In this study, our objective was to evaluate the relationship between estrogen, leptin and ANP in spontaneously hypertensive rats (SHR) fed with high-fat diet.

Methods: Twenty-four 10-wk-old female SHR were ovariectomized (O) or sham-operated (S) and divided (6 per group) according to the diet: high-fat diet (54.4% of fat) and standard diet during 24 weeks (groups: OHFD: ovariectomized high-fat diet-fed rats, OSD: ovariectomized standard diet-fed rats, SHFD: sham-operated high-fat diet-fed rats and SSD: sham-operated standard diet-fed rats). Body weight and blood pressure were measured weekly. In the last two weeks, the ovariectomized rats were submitted to hormone replacement therapy (HRT) with 17 β -estradiol (E2: 5 μ g/0.1ml/100g weight) and control rats received vehicle (corn oil-VEH: 0.1ml/100g weight). After, the rats were sacrificed and blood was collected for determination of estradiol, ANP and leptin plasma levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). We also removed adipose tissue from different depots (mesenteric, parametrial and retroperitoneal) for determination of leptin gene expression by RT-PCR and we removed right and left atrium for determination of ANP gene expression.

Results: The ovariectomized rats and the high-fat diet-fed rats had higher body weight (OSD: 311.1 \pm 1.7; OHFD: 266.4 \pm 1.1; SHFD: 267.0 \pm 6.8; SSD: 242.6 \pm 7.5g, p <0.05 vs. SSD) and systolic blood pressure (OSD: 146 \pm 3; OHFD: 145 \pm 3; SHFD: 147 \pm 4; SSD: 133 \pm 4 mmHg, p <0.05 vs. SSD) than control group. HRT reduced both body weight (OSD-VEH: 311.1 \pm 1.7; OSD-E2: 286.9 \pm 2.7g, p <0.05) and systolic blood pressure of ovariectomized standard diet-fed rats (OSD-VEH: 146 \pm 3; OSD-E2: 138 \pm 2 mmHg, p <0.05), but had no effect in animals fed with high-fat diet. Plasma estradiol levels returned to physiological amounts in ovariectomized rats after E2 replacement (OSD-VEH: 17.3 \pm 2.4; OSD-E2: 44.6 \pm 3.2; OHFD-VEH: 14.1 \pm 2.9; OHFD-E2: 46.6 \pm 4.1pg/ml, p <0.05). The blood pressure reduction was accompanied by a 62% increased in plasma ANP levels of animals treated with E2 compared to the vehicle group. An inverse correlation between plasma ANP and systolic blood pressure was observed in the control diet-fed group (p = 0.035, r =- 0.668). The synthesis of ANP was also increased by E2 in both right and left atrium of control diet-fed group. The ovariectomized rats and the high-fat diet-fed rats had higher leptin levels (OSD: 11989 \pm 558; OHFD: 10422 \pm 559; SHFD: 10128 \pm 123; SSD: 7605 \pm 161pg/ml, p <0.05 vs. SSD). However, HRT only reduced the plasma leptin levels of standard diet-fed rats (OSD-VEH: 11989 \pm 558; OSD-E2: 4068 \pm 1636pg/ml,

$p < 0.05$). This reduction was accompanied by decreased of leptin gene expression in mesenteric and parametrial adipose tissue depots. Only in control diet animals was observed a correlation between plasma ANP and estradiol levels ($p = 0.0037$, $r = 0.8201$) and an inverse correlation between plasma leptin and estradiol levels ($p = 0.0493$, $r = -0.6128$) and between plasma ANP and leptin levels ($p = 0.0449$, $r = -0.6775$).

Conclusion: Estradiol treatment was associated with an increased atrial synthesis and release of ANP and with a decreased synthesis and release of leptin in ovariectomized SHR. Similarly, the increase in plasma ANP levels was inversely correlated with the release of leptin. These hormonal changes may be involved in the reduction of systolic blood pressure and body weight presented by these animals after hormone treatment. However, our results showed the deleterious effect of high-fat diet, which may impair the estradiol effect in cardiovascular and endocrine system.

Financial support: CNPq and CAPES.

Keywords: hypertension, obesity, estrogen, atrial natriuretic peptide, leptin.

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP	proteína relacionada ao Agouti
ANP	atrial natriuretic peptide (peptídeo natriurético atrial)
α -MSH	hormônio alfa estimulador de melanócito
BNP	brain natriuretic peptide (peptídeo natriurético tipo-B)
CNP	C-type natriuretic peptide (peptídeo natriurético tipo-C)
DC	dieta controle
DCO	ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta controle
DCS	ratas sham-operadas alimentadas com dieta controle
DL	dieta hiperlipídica
DLO	ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta hiperlipídica
DLS	ratas sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica
DNP	D-type natriuretic peptide (peptídeo natriurético tipo-D)
DNA	ácido desoxirribonucleico
E2	estradiol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER α	receptor de estrógeno do tipo α
ER β	receptor de estrógeno do tipo β
GMPc	guanosina 3',5'-monofosfato
IMC	índice de massa corporal
Jak 2	Janus quinase 2
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetase
NPR	receptores de peptídeos natriuréticos
NPr-A	receptor tipo A do peptídeo natriurético
NPr-B	receptor tipo B do peptídeo natriurético
NPr-C	receptor envolvido no clearance do peptídeo natriurético
NPY	neuropeptídeo Y
OB-R	receptor da leptina
OB-Rb	receptor da leptina do tipo b
PI3K	fosfatidilinositol-3-cinase
POMC	pró-opiomelanocortina
SHR	spontaneously hypertensive rats (ratos espontaneamente hipertensos)

STAT 3	transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
VEH	veículo (óleo de milho)
VSMC	células musculares lisas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Peptídeos Natriuréticos	19
3.2 Hipertensão, menopausa e obesidade	23
3.3 Leptina	25
3.3.1- Leptina e Estradiol	29
3.3.2- Leptina e ANP	33
3.3.3- Ratos espontaneamente hipertensos e leptina	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Animais	37
4.2 Dietas Experimentais	37
4.3 Procedimento Experimental	39
4.4 Ovariectomia	40
4.5 Dosagem de ANP, leptina e estradiol	40
4.6 Análise da expressão gênica	43
4.6.1 Extração de RNAm	43
4.6.2 Leitura da concentração de RNAm	44
4.6.3 Síntese do DNA complementar (cDNA) - Transcrição reversa	44

4.6.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	45
4.7 Análise de dados.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Efeito da ovariectomia e da dieta hiperlipídica no peso corporal e pressão arterial de fêmeas SHR	47
5.1.1 Evolução do Peso Corporal.....	47
5.1.2 Evolução da Pressão Arterial.....	49
5.1.3 Consumo de ração e ingestão calórica.....	50
5.2. Efeito da Terapia de Reposição Hormonal.....	51
5.2.1 Pressão Arterial durante o período de Reposição Hormonal.....	51
5.2.2 Eficácia da ovariectomia e do tratamento com estradiol.....	52
5.2.3 Peso corporal após a terapia de reposição hormonal.....	53
5.2.4 Peso dos depósitos de tecidos adiposos.....	54
5.2.5 Peso Cardíaco.....	57
5.2.6 Liberação de leptina e sua expressão gênica em depósitos de tecido adiposo após a terapia de reposição hormonal.....	58
5.2.7 Liberação e síntese atrial de ANP.....	62
5.2.8 Correlação entre a concentração plasmática de ANP, estradiol e leptina....	65
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como um aumento do depósito de triglicérides nas células adiposas ocasionado por um desequilíbrio entre consumo alimentar e gasto energético (MUST et al., 1999). Essa patologia tem atingido níveis epidêmicos em vários países (KOPELMAN, 2000). A alta prevalência da obesidade trouxe sérias consequências para a saúde dos indivíduos, uma vez que a obesidade está associada com o aumento do risco para o desenvolvimento de diversas patologias, tais como as doenças cardiovasculares, além de aumentar o índice de mortalidade (KOPELMAN, 2000; FLEGAL et al., 2005). Em torno de 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano por consequências da obesidade ou sobrepeso (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008a).

O tecido adiposo desempenha papel crucial na homeostase energética e secreta hormônios esteróides, citocinas inflamatórias, fatores de complemento, peptídeos vasoativos, resistina e leptina (KALSBECK et al., 2006). Desse modo, o interesse na fisiopatologia da obesidade e distúrbios metabólicos tem se focalizado na biologia do tecido adiposo. Em especial, a sinalização metabólica da leptina parece desempenhar um papel chave em estados de alteração metabólica, incluindo-se a obesidade (KALSBECK et al., 2006). Seus efeitos mais marcantes ficam evidenciados em camundongos com deficiência funcional de leptina por mutação gênica que apresentam obesidade e diabetes (FAIN & BAHOUTH, 2000).

Somado a este papel inerente do tecido adiposo, o estrógeno é considerado o maior regulador do tecido adiposo em fêmeas (LEY; LEES & STEVENSON, 1992; FERRARA et al., 2002), bem como tem efeito estimulatório sobre a produção de peptídeo natriurético atrial (ANP), hormônio de origem cardíaca que desempenha importante papel na regulação do volume sanguíneo intravascular e tônus vascular contribuindo para o controle da pressão arterial. (NISHIKIMI et al., 2006).

A pressão arterial sanguínea é fortemente correlacionada com o índice de massa corpórea (KNIGHT et al., 2008) e a sua elevação representa um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, levando a diversas consequências severas como a doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e insuficiência renal crônica (LEWINGTON et al., 2002). O estudo da hipertensão

arterial tem se tornado cada dia mais relevante, uma vez que dados revelam que em torno de 40% dos adultos com 25 anos ou mais apresentam elevação de pressão arterial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008b) e, que o acidente vascular cerebral, evento que apresenta a hipertensão como principal fator etiológico, é a principal causa de morte em todas as regiões do Brasil (LOTUFO, 2005).

A ocorrência de ambas as patologias concomitantemente, obesidade e hipertensão, é extremamente comum, uma vez que o excesso de massa corpórea é um fator predisponente para a hipertensão, podendo ser responsável por 20% a 30% dos casos da mesma. Além disso, estudos revelam que 75% dos homens apresentam hipertensão diretamente atribuível a sobrepeso e obesidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997). Da mesma forma, pesquisas indicam que a perda de peso acarreta uma redução da pressão arterial (NETER et al., 2003). Para as mulheres, há um aumento da incidência de obesidade, com acúmulo de tecido adiposo na região abdominal (AYRES, 1991) e hipertensão no período pós-menopausal. Entretanto, a interação entre obesidade, hipertensão e pós-menopausa não está completamente esclarecida (BARNARD et al., 1998).

Apesar do vasto conhecimento adquirido nas últimas décadas sobre a modulação e regulação do metabolismo, os mecanismos envolvidos entre o aumento do tecido adiposo com o desenvolvimento da hipertensão arterial continuam representando um tema a ser desvendado.

A leptina, hormônio produzido proporcionalmente à massa de tecido adiposo, parece participar do desenvolvimento da hipertensão, além da obesidade. Esse hormônio regula a função cardíaca e encontra-se elevado na obesidade e hipertensão (WORLD et al., 2002). Assim, a hiperleptinemia apresenta correlação com disfunção cardiovascular e hipertensão (HENRIKSEN et al., 2000; ZIETZ et al., 2000).

A leptina é o principal hormônio marcador da obesidade, uma vez que atua como sinalizadora central e periférica para manutenção e homeostase energética, bem como exerce ações pleiotrópicas nos diversos sistemas corporais (YANG & BAROUCH, 2007). Devido ao fato da leptina apresentar-se em concentrações mais elevadas em fêmeas, sugere-se uma interação do tecido adiposo com o sistema

reprodutor (CASABIEL et al., 2001). Desta forma, sabe-se que os estrógenos são reguladores dos níveis de leptina plasmática em humanos (QUINTON et al., 1999).

Além dessa relação entre leptina e estradiol, recentemente, Yuan et al., (2010) verificaram que a leptina reduz a expressão do peptídeo natriurético atrial, podendo este ser um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão arterial, uma vez que o mesmo, como citado anteriormente, é de extrema relevância para o controle da pressão arterial (POTTER, ABBEY-HOSCH & DICKEY, 2006). Também, a participação do ANP na fisiopatologia da obesidade tem sido aventada (DESSÌ-FULGHERI et al., 1998; WANG et al., 2004). Entretanto, os dados até agora apresentados são preliminares e muito estudo ainda se faz necessário para se determinar as alterações e a importância destes peptídeos e seus receptores na gênese da hipertensão e obesidade, sobretudo no período pós-menopausal.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a relação entre leptina, peptídeo natriurético atrial e estrógeno em um modelo animal de hipertensão e obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a relação entre estrógeno, leptina e peptídeo natriurético atrial em ratas espontaneamente hipertensas (SHR) alimentadas com dieta hiperlipídica.

2.1.2 Objetivos Específicos

- 1) Determinar os efeitos da dieta hiperlipídica, da ovariectomia e do tratamento com estradiol na pressão arterial sistólica, no peso corporal e no peso dos depósitos de tecido adiposo mesentérico, parametrial e retroperitoneal em SHR;
- 2) Determinar os efeitos da dieta hiperlipídica, da ovariectomia e do tratamento com estradiol na expressão gênica de leptina em diferentes depósitos de tecidos adiposos em SHR;
- 3) Determinar os efeitos da dieta hiperlipídica, da ovariectomia e do tratamento com estradiol na expressão gênica atrial de ANP em SHR;
- 4) Avaliar a associação entre estradiol, ANP e leptina em SHR ovariectomizadas e alimentadas com dieta hiperlipídica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Peptídeos natriuréticos

A homeostase da pressão sanguínea é mantida em parte por um balanço entre as ações vasoconstritoras e antinatriuréticas do sistema renina angiotensina e as ações vasodilatadoras e natriuréticas dos peptídeos natriuréticos. Entretanto, pouca atenção tem sido dada ao possível papel dos peptídeos natriuréticos e seus receptores na fisiopatologia da hipertensão arterial. Os níveis de peptídeos natriuréticos aumentam em resposta a expansão do volume e ao aumento da pressão arterial (MERCEDES & KUROSKI, 1999; ANEJA et al., 2004). O sistema renina angiotensina, por sua vez, é ativado pela diminuição da pressão renal, contração do volume plasmático e diminuição da chegada de sódio na mácula densa (MERCEDES & KUROSKI, 1999).

Os peptídeos natriuréticos defendem o organismo contra a retenção de sal e água, inibem a produção e ação de peptídeos vasoconstrictores como a angiotensina II, promovem relaxamento vascular e inibem o sistema nervoso simpático. Estas ações levam à redução da pressão arterial, principalmente em situações com elevada volemia (LEVIN et al., 1998).

A família dos peptídeos natriuréticos é composta por três peptídeos estruturalmente semelhantes: peptídeo natriurético atrial, peptídeo natriurético tipo B (BNP) e peptídeo natriurético tipo C (CNP). Além desses, há o peptídeo natriurético tipo D (DNP) e a urodilatina. Os peptídeos natriuréticos antagonizam a ação de angiotensina II sobre o tônus vascular, inibem a secreção de renina e de aldosterona, bem como a reabsorção do sódio no túbulo renal (YOSHIBAYASHI et al., 1996; WILKINS; REDONDO & BROWN, 1997,).

Os níveis circulantes de ANP podem ser regulados ou modificados por vários fatores fisiológicos, entre eles pode-se citar a idade, hábitos alimentares, condições clínicas e o gênero (CLERICO et al., 2006; CLERICO et al., 2009). Existem duas possíveis vias pelas quais a produção dos peptídeos natriuréticos pode ser afetada pelo estrógeno. Uma delas é um efeito direto do hormônio ovariano sobre a

expressão gênica e liberação cardíaca dos peptídeos natriuréticos e o outro é através de um ou mais mecanismos mediadores como o sistema renina angiotensina (CHEN et al., 1992; MERCEDES & KUROSKI, 1999). Hong et al. (1992) mostraram que a ovariectomia em ratas Wistar reduziu o RNAm para ANP no átrio e o tratamento com estradiol e progesterona por 7 dias reverteu este efeito.

Os diversos efeitos biológicos dos peptídeos natriuréticos são mediados pela ligação do hormônio a receptores específicos associados à membrana que têm sido encontrados em todos os tecidos em que os peptídeos natriuréticos agem, incluindo coração, tecido adiposo, adrenais, cérebro, pulmões, rins, músculo liso vascular, útero e condrócitos (POTTER, ABBEY-HOSCH, DICKEY, 2006). Existem três subtipos diferentes de receptores de peptídeos natriuréticos (NPR): dois desses receptores, NPr-A e NPr-B, são os únicos que contém um domínio catalítico intracelular guanilato ciclase, o qual media a ação dos peptídeos natriuréticos pela produção do segundo mensageiro GMPc. O terceiro receptor, NPr-C, não está associado com qualquer mediador intracelular específico e funciona principalmente na captação, internalização e degradação intracelular (lisossomal) do hormônio. Alguns estudos usando técnicas de afinidade de ligação mostraram que o NPr-B é seletivo para CNP, sendo que este tem baixa afinidade de ligação para NPr-A, o qual é seletivo para ANP e BNP e predomina em humanos (SENGENÈS et al., 2002) e tem sua produção aumentada em estados hipertensivos (YOSHIMOTO et al., 1995). Em contraste, o NPr-C tem ampla especificidade ligando-se a todos os três peptídeos natriuréticos, apesar de ter uma maior afinidade para o ANP (ESPINER et al., 1995).

Segundo Wang et al. (2004) o índice de massa corporal (IMC) foi inversamente associado com os níveis de peptídeos natriuréticos. O sobrepeso foi associado com níveis plasmáticos de peptídeos natriuréticos de 1,4 a 3,5 vezes menores, já na obesidade, os níveis foram de 1,8 a 4,8 vezes mais baixos. Os níveis plasmáticos de peptídeos natriuréticos eram 6 a 27% maiores em indivíduos hipertensos comparados com os não hipertensos. No entanto, indivíduos com sobrepeso ou obesidade e ainda hipertensão, tinham baixos níveis de BNP e N-peptídeo natriurético pré-atrial terminal comparados com indivíduos não hipertensos com IMC normal. O mesmo autor cita que a redução da atividade dos peptídeos natriuréticos é uma manifestação da síndrome metabólica que pode ter importantes implicações clínicas e patofisiológicas (WANG et al., 2004). Todavia, os mecanismos

responsáveis pela relação inversa entre os peptídeos natriuréticos e a massa corporal permanecem desconhecidos (RICHARDS, 2007).

O mecanismo sugerido para a redução dos peptídeos natriuréticos em obesos é que os receptores do tipo C são abundantes no tecido adiposo, sugerindo que os adipócitos participam na remoção dos peptídeos natriuréticos da circulação (SARZANI et al., 1993, SARZANI et al., 1996). A secreção reduzida de peptídeos natriuréticos pela menor liberação (LICATA et al., 1994) ou diminuição da síntese (MORABITO et al., 2001) pode também ser uma explicação importante para os baixos níveis de peptídeos natriuréticos no plasma. Além disso, também é possível que a endopeptidase neutra, que realiza proteólise de peptídeos natriuréticos e está presente na membrana de adipócitos e pré-adipócitos (SCHLING & SCHAFER, 2002), pode aumentar na obesidade e contribuir para a depuração dos peptídeos natriuréticos circulantes (MORO et al., 2007).

Investigadores têm demonstrado que a ligação de ANP ao receptor NPR-A sobre os adipócitos induz mobilização e oxidação lipídica (SENGENÈS et al., 2000, BIRKENFELD et al., 2005). Dessa forma, baixos níveis de peptídeos natriuréticos podem reduzir a lipólise e conseqüentemente perpetuar o estado obeso (WANG et al., 2004). Nesse caso, além da ausência ou diminuição dos efeitos cardioprotetores dos peptídeos natriuréticos, o quadro da obesidade também se agrava devido à diminuição da lipólise, constituindo um ciclo em que um fator leva a outro, e ambos, agravam o estado de obesidade. Os peptídeos natriuréticos também parecem regular a proliferação de adipócitos e a expansão do tecido adiposo visceral (SARZANI et al., 2008).

O efeito lipolítico descrito acima parece envolver uma via dependente de GMPc não relacionada com a inibição da fosfodiesterase PDE-3B ou alteração na produção de AMPc. Estes achados de um novo controle da lipólise pelos peptídeos natriuréticos levantam a questão do papel fisiológico desta nova via lipolítica e seu possível envolvimento com o desenvolvimento e a patogênese da obesidade (SENGENÈS et al., 2000). Mais recentemente foi demonstrado que o ANP inibe a produção de adipocinas e citocinas ligadas ao desenvolvimento da resistência à insulina (MORO et al., 2007).

SARZANI et al. (1999) mostraram que variações na região promotora do gene *Npr3* que codifica o receptor NPR-C foram associadas com baixos níveis de ANP e

alta pressão sanguínea em pacientes obesos hipertensivos que tinham uma reduzida taxa de expressão NPr-A/NPr-C no tecido adiposo. Em um de seus estudos, Sarzani et al. (2004) mostraram uma possível associação entre o polimorfismo NPr-C C(55)A com o índice de massa corporal, distribuição de gordura corporal e pressão sanguínea em um amplo grupo de homens adultos. Não houve diferença estatisticamente significativa nos índices antropométricos, pressão sanguínea e variáveis bioquímicas relevantes entre os genótipos. Há especulações que a variação genética Npr3 poderia estar associada com uma alteração funcional no metabolismo do tecido adiposo, levando a diferenças quantitativas na deposição da gordura corporal.

Dessi-Fulgheri et al. (1998) buscando elucidar o papel patofisiológico dos peptídeos natriuréticos e sua relação com o tecido adiposo compararam a expressão gênica de ANP e dos seus receptores em tecido adiposo de humanos e ratos. O ANP plasmático encontrado foi menor em obesos hipertensos do que em obesos normotensos. Entretanto, em sujeitos não-obesos, o ANP plasmático foi maior em hipertensos que em normotensos, enquanto o nível de RNAm NPr-A/NPr-C foi significativamente menor em obesos hipertensos. Isto sugere uma diminuição da atividade biológica e um aumento da depuração de peptídeos natriuréticos no tecido adiposo e suporta a hipótese de um papel do sistema de peptídeos natriuréticos/NPr na obesidade relacionada à hipertensão.

Esse mesmo grupo de pesquisadores defende que a dieta tem um efeito regulador na pressão sanguínea bem como na atividade renal (DESSI-FULGHERI et al., 1998). Em um estudo com oito pacientes obesos e hipertensos que receberam uma dieta com baixo teor calórico e em seguida injeção em bólus de ANP exógeno, a injeção de ANP depois da dieta foi acompanhada de um aumento nos níveis de ANP similares ao observado antes da dieta. Uma significativa diminuição da pressão sanguínea sistólica e diastólica foi observada depois de quatro dias de dieta com baixa caloria e o início da fase de perda de peso foi acompanhada por um considerável aumento na diurese e natriurese. Houve uma significativa redução da aldosterona plasmática observada com a administração de ANP depois da dieta com restrição de calorias (DESSI-FULGHERI et al., 1998). Estes achados confirmam a importância da captação calórica na modulação da atividade biológica de ANP, sugerindo que o sistema de peptídeos natriuréticos pode ter um papel nas mudanças agudas da natriurese e diurese associada com a restrição calórica.

Percebe-se, portanto, a existência de evidências de que o sistema de peptídeos natriuréticos esteja envolvido no desenvolvimento de diversas condições presentes tanto na hipertensão quanto na obesidade. O esclarecimento da participação do sistema de peptídeos natriuréticos na hipertensão e na obesidade, especialmente no quadro da pós-menopausa poderá trazer contribuições para a prevenção e tratamento da mesma.

3.2 Hipertensão, menopausa e obesidade.

Além da participação dos peptídeos natriuréticos, outras hipóteses a respeito da hipertensão associada à obesidade têm sido estudadas. O estudo da transição à menopausa e da terapia de reposição hormonal pós-menopausa tem fornecido evidências de que os esteróides sexuais desempenham um papel importante como reguladores da distribuição de gordura e na redução dos fatores de risco para doenças cardiovasculares. De fato, a menor incidência de doenças cardiovasculares em mulheres antes da menopausa tem levantado a hipótese de que os hormônios sexuais, particularmente o estrógeno, sejam responsáveis por uma proteção cardiovascular (MENDELSON & KARAS, 1999) contribuindo para redução tanto do peso do tecido adiposo (BELO; SAIRAM & REIS, 2008) quanto da pressão arterial (WEST et al., 2001; BELO et al., 2004). Vários mecanismos têm sido propostos para tentar elucidar os efeitos do estrógeno no sistema cardiovascular, como por exemplo, redução da pressão arterial, alterações no metabolismo lipídico e no depósito de tecido adiposo.

A administração de estradiol diminuiu a pressão arterial de mulheres normotensas após dois meses de tratamento (CAGNACCI et al., 1999). Estradiol administrado oralmente ou por via transdérmica diminuiu a resistência vascular periférica e conseqüentemente a pressão arterial de mulheres na pós-menopausa (WEST et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais o estrógeno realiza estas alterações no sistema cardiovascular ainda são incertos, sendo alvo de inúmeros estudos. Existem evidências sugerindo que o estrógeno afete a função cardiovascular, reduzindo a

pressão arterial, via ação direta nos vasos sanguíneos (MURPHY & KHALIL, 2000), ação central no sistema nervoso autônomo (SALEH et al., 2000) ou ainda devido à formação de substâncias vasodilatadoras como óxido nítrico (TOSTES et al., 2003), ou inibição da formação e/ou ação de substâncias vasoconstritoras, como as prostaglandinas PGH_2 e $PGF_{2\alpha}$ (DANTAS et al., 1999) e angiotensina II (MAGNESS et al., 1993).

A implicação da ação benéfica e protetora do estrogênio na circulação cardiovascular necessita ser completamente elucidada para o esclarecimento das condições patofisiológicas observadas na pós-menopausa, como por exemplo, a hipertensão arterial, e para sua aplicação na prática clínica. Como a obesidade é fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, em especial hipertensão arterial, a ação do estrogênio no tecido adiposo também merece destaque.

O estrogênio tem sido visto como o principal regulador do tecido adiposo em fêmeas adultas regulando a sua deposição de maneira dependente da localização do depósito. As mulheres têm mais tecido adiposo subcutâneo do que os homens, com uma média de percentual de gordura corporal em mulheres jovens de 25% contra 15% em homens (CHUMLEA et al., 1981). O aumento da gordura abdominal nas mulheres na pré-menopausa parece ser inibido pelo estrogênio, quando são comparadas com os homens que tendem a ter um depósito de gordura no abdômen. Todavia, a gordura abdominal aumenta nas mulheres no período pós-menopausa (LEY; LEES & STEVENSON, 1992), o que está correlacionado com um aumento no risco de desenvolvimento de várias doenças. Também no Brasil, a prevalência de obesidade cresce nas mulheres na pós-menopausa, na faixa etária de 35 a 44 anos é de 12,8% e na faixa etária de 55 a 64 anos é de 21,8% (OMS, 2004).

A ovariectomia em roedores ou a menopausa em mulheres resulta em aumento do depósito de tecido adiposo (COOKE & NAAZ, 2004) que está correlacionado com baixos níveis de estradiol (FERRARA et al., 2002). O tratamento com estradiol diminui o tecido adiposo visceral em mulheres na pós-menopausa (MUNOZ; DERSTINE & GOWER, 2002). Animais manipulados geneticamente fornecem fortes evidências que o estrogênio realmente modula a quantidade de tecido adiposo. Tanto camundongas que não expressam o receptor para estrogênio

do tipo α , (HEINE et al., 2000), quanto as que não expressam a enzima aromatase (JONES et al., 2000), apresentam uma grande quantidade de tecido adiposo. Este efeito do estrógeno pode se dar através da diminuição da lipogênese (HOMMA et al., 2000) e aumento da lipólise através da ativação da enzima lipase hormônio sensível (PALIN et al., 2003). Assim, percebe-se que o estrógeno desempenha importante papel também na regulação do tecido adiposo.

3.3 Leptina

O tecido adiposo desempenha papel crucial na homeostase energética e secreta hormônios esteróides, citocinas inflamatórias, fatores de complemento, peptídeos vasoativos, adiponectinas, resistina e leptina (KALSBECK et al., 2006). Desse modo, o interesse na fisiopatologia da obesidade e desordens metabólicas tem se focalizado na biologia do tecido adiposo. Leptina, adiponectina e citocinas pró-inflamatórias, produzidas no tecido adiposo, agem por meio de receptores bem definidos em tecidos-alvo distantes, fazendo do tecido adiposo um verdadeiro órgão endócrino (FLIER, 2004). Seus efeitos mais marcantes ficam evidenciados em camundongos com deficiência funcional de leptina por mutação gênica (camundongos *ob/ob*) que apresentam infertilidade, obesidade e diabetes (FAIN & BAHOUTH, 2000).

Kennedy (1953) foi o primeiro a propor que fatores circulantes derivados do tecido adiposo funcionariam como sinalizadores para o cérebro a fim de controlar o consumo alimentar e o gasto energético com o objetivo de manter constante o peso corporal. A leptina regula a função cardíaca e encontra-se elevada na obesidade e hipertensão (WORLD et al., 2002). Assim, a hiperleptinemia apresenta correlação com disfunção cardiovascular e hipertensão (HENRIKSEN et al., 2000; ZIETZ *et al.*, 2000).

A leptina é uma grande proteína que tem uma massa relativa de 16KDa, possui uma estrutura similar as citocinas e é altamente conservada em mamíferos (ZHANG; NOVAK & KAUFMAN, 1995). Ela está envolvida com o desenvolvimento cerebral, maturação dos circuitos de alimentação no hipotálamo, função vascular,

hematopoiese, angiogênese, desenvolvimento ósseo e cicatrização de feridas. Ela regula o balanço energético por meio de ações no cérebro, no apetite, bem como no gasto energético. É secretada de maneira pulsátil e possui um ritmo diurno, apresentando um pico noturno e um no amanhecer (ALEXANDER et al., 2009). Essas diversas ações da leptina ocorrem através do receptor de leptina (Ob-R) (KAWAI et al., 2000; TARTAGLIA, 1997).

Infere-se que essa adipocina alcance o cérebro por mecanismos de transportes específicos. Entretanto, o mecanismo exato da passagem da leptina pela barreira hemato-encefálica ainda é desconhecido (AHIMA et al., 2001). O transporte da leptina para o cérebro diminui rapidamente durante o jejum e aumenta com a elevação dos níveis de leptina plasmática durante a alimentação. A redução no transporte da leptina na obesidade induzida por dieta é reversível e parcialmente atribuída à gordura dietética ou a elevação dos triglicerídeos no plasma (BANKS, CLEVER & FARRELL, 2000). Também, o envelhecimento está associado com redução do transporte da leptina para o cérebro podendo contribuir para o acúmulo de gordura e anormalidades no metabolismo da glicose e dos lipídios (BANKS & FARRELL, 2003).

A base molecular do envolvimento da leptina na plasticidade no hipotálamo ainda não está bem descrita. É sabido que a leptina age em neurônios específicos no hipotálamo e no tronco cerebral (AHIMA et al., 2001).

Alguns estudos mostram que a leptina induz rapidamente as vias de sinalização do núcleo arqueado no hipotálamo, de modo que uma única dose de leptina mostra-se capaz de reduzir o consumo alimentar em camundongos ob/ob após 12h de sua administração. É importante salientar que camundongos ob/ob apresentam aumento de neuropeptídeo Y e supressão de pro-opiomelanocortina, sendo, portanto, um modelo animal adequado para testar hipóteses sobre o efeito da leptina na plasticidade sináptica (PELLEYMOUNTER et al., 1995).

Além disso, alguns estudos também mostram que em primatas não humanos ob/ob e em animais selvagens os efeitos da leptina no hipotálamo estão associados com a organização sináptica do sistema hipotalâmico peptidérgico. Acredita-se, portanto, que a plasticidade sináptica induzida pela leptina e suas consequências durante os estados patológicos denotem condição crucial na regulação da homeostase energética (KALSBECK et al., 2006).

Os receptores para a leptina estão expressos em dois subtipos de neurônios do núcleo arqueado: um que produz neuropeptídeo Y (NPY) / proteína relacionada ao Agouti (AgRP) e outro que expressa a pro-opiomelanocortina (MERCER et al., 1996). Esses neurônios são importantes células orexígenas, as quais interagem com células que expressam o hormônio alfa estimulador de melanócito (α -MSH), o mais potente peptídeo envolvido na regulação do metabolismo pelo cérebro (HAHN et al., 1998). Um aumento na atividade NPY/AgRP e supressão de pro-opiomelanocortina induzem a alimentação e deposição de gordura, enquanto que um aumento na pro-opiomelanocortina e supressão da atividade do NPY/AgRP diminuem a alimentação e a massa corporal magra (ZARJEVSKI et al., 1993; STEPHENS et al., 1995).

O receptor da leptina é um membro da superfamília de receptor de citocinas do tipo I e é composto por três domínios: um domínio extracelular de ligação ao ligante, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático. O receptor possui seis isoformas (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re, Ob-Rf), porém evidências indicam que a maioria das ações da leptina ocorrem por meio do receptor longo, Ob-Rb (AHIMA & FLIER, 2000a).

A leptina utiliza as vias de sinalização Janus quinase 2 (Jak 2) e transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT 3), resultando na estimulação de peptídeos anorexígenos, hormônio alfa estimulador de melanócito (α -MSH) e peptídeo regulador cocaína–anfetamina (CART), e inibição dos peptídeos orexígenos, neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada ao Agouti (AgRP), por meio de outras vias de sinalização como fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), proteína tirosina fosfatase 1B (PTP- 1B), supressor de sinalização de citocinas 3 (SOCS3) e da proteína quinase ativadora de AMP (KALSBECK et al., 2006). A sinalização metabólica da leptina pode ter um efeito agudo na plasticidade sináptica no centro do apetite, desempenhando assim papel chave em estados de alteração metabólica (KALSBECK et al., 2006).

A ativação da via de sinalização Jak-STAT pela leptina se dá pela ligação dessa adipocina ao domínio extracelular do Ob-Rb resultando na auto-fosforilação da jak2, fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do Ob-Rb e ativação da transcrição de fatores STATs (KALSBECK et al., 2006). Sabe-se que a forma longa do receptor da leptina requer a ativação da STAT 3 e/ou da via de sinalização PI3 quinase, levando a uma diminuição do consumo alimentar e aumento do gasto energético (NISWENDER et al., 2003).

A STAT3 possibilita que a leptina regule a alimentação, a termogênese e o peso. Entretanto, esta via não é utilizada para os efeitos da leptina na reprodução, no crescimento, na influência do metabolismo da glicose e na expressão dos níveis de neuropeptídeo Y no hipotálamo (BATES et al., 2004).

As ações da leptina ocorrem principalmente pela via Jak-STAT, todavia algumas de suas ações rápidas no metabolismo lipídico e da glicose são mediadas pela via da proteína quinase ativada por mitógeno, MAPKinase (MAPK), como por exemplo a inibição da lipogênese no fígado (KAHN et al., 2005).

A leptina encontra-se elevada em obesos e aumenta algumas horas após uma alimentação em grande quantidade (FREDERICH et al., 1995 a, b) e diminui rapidamente durante o jejum e a perda de peso (FREDERICH et al., 1995 a, b; KOLACZYNSKI et al., 1996).

A deficiência de leptina tanto em humanos como em roedores manifesta-se com apetite voraz, obesidade de início precoce, resistência à insulina, imunossupressão, bem como diversas anormalidades hormonais, em particular hipogonadismo hipotalâmico (KALSBECK et al., 2006). Essa adipocina tem diminuída sua síntese e secreção quando em situações de exposição ao frio, estimulação β 3 adrenérgica, pelo hormônio do crescimento, hormônio tireóideo, melatonina e pelo tabagismo (AHIMA & FLIER, 2000a).

Além dessas alterações de síntese e secreção, alterações também ocorrem em alguns casos de obesidade o que é conhecido como resistência à leptina. Isso foi confirmado em estudos que mostraram redução da sensibilidade à leptina em roedores e humanos com obesidade induzida por dieta e tratados com leptina (TAKAHASHI et al., 2002).

Essa resistência a leptina tem sido associada com a redução da absorção da mesma pelo cérebro, com a indução de supressores da sinalização de citocinas-3 e com alterações em neuropeptídeos hipotalâmicos (TAKAHASHI et al., 2002; FLIER, 2004).

Alguns trabalhos mostram que os humanos podem tornar-se obesos devido a um simples defeito herdado e, que o principal efeito das mutações genéticas que levam à fisiopatologia da obesidade está associado a mecanismos reguladores do consumo alimentar. Dentre esses se destaca a deficiência congênita da leptina descoberta em 1997 por meio de um estudo em primos com obesidade severa. Ambos tinham níveis séricos indetectáveis de leptina e apresentavam uma mutação

no gene *ob* ($\Delta G133$), o que resultava em não secreção da proteína (MONTAGUE, 1997). Além dessa, outras mutações no gene da leptina foram descritas por outros trabalhos, e todos os membros da família que apresentam tais alterações tinham em comum severa obesidade de início precoce e intensa hiperfagia (OZATA, OSDEMIR & LICINIO, 1999; FAROOQI et al., 1999, 2002).

De acordo com Kalsbeek et al. (2006), terapias utilizando leptina subcutânea ocasionaram efeitos benéficos em crianças com defeito congênito de leptina, levando a redução de peso corpóreo e de massa gorda. O maior efeito da leptina encontrado foi a normalização do apetite. Nesses casos a terapia em meninos de três anos com obesidade marcante levou a uma redução de 25% no peso corpóreo.

A leptina também atua no metabolismo da glicose, aumentando o metabolismo da mesma por reforçar o “turnover” da glicose e sua absorção em tecidos periféricos, sem diminuir o conteúdo de glicogênio hepático (KAMOHARA et al., 1997). Efeitos similares a este foram também observados após administração de leptina intravenosa ou intracerebroventricular (KAMOHARA et al., 1997).

A leptina e a insulina têm efeitos centrais distintos no fluxo da glicose. A insulina administrada intracerebroventricular inibe a gliconeogênese e a produção de glicose. A leptina, ao contrário, estimula a gliconeogênese, diminui a glicogenólise e não tem efeito sobre a produção de glicose (GUTIERREZ-JUAREZ, ROBICI & ROSSETI, 2004).

3.4 Leptina e Estradiol

O estrógeno tem efeito no peso corporal e no gasto energético. Além desse papel já bem descrito, sabe-se que o declínio nos níveis de estrógeno, que ocorre em fêmeas na menopausa tem profundos efeitos fisiológicos e alterações metabólicas que resultam em modificações na distribuição da gordura corpórea (BENTLEY-LEWIS; KORUDA & SEELY, 2007; DICARLO, 2003) e aumento no risco para síndrome metabólica que está associada com o diabetes, cardiopatias e hipertensão (NG; YONG & CHAKRABORTY, 2010)

Não há dúvidas de que o principal determinante da concentração de leptina é a quantidade líquida de gordura corporal (MAFFEI et al., 1995; HAVEL et al., 1996).

Entretanto, sabe-se que outros fatores contribuem para a sua produção. É sabido que o estradiol imita os efeitos sinápticos da leptina nas células melanocortinas (KALSBECK et al., 2006) e, está descrito que ambos, leptina e estradiol, podem causar rápido rearranjo sináptico no núcleo arqueado envolvendo sinapses gabaérgicas (PARDUCZ et al., 2003).

Há algumas evidências em humanos e roedores sugerindo que a testosterona exerça efeito negativo na regulação sobre a secreção de leptina e que o estrógeno atua positivamente estimulando a sua secreção (MESSINIS et al., 1999; PINILLA et al., 1999). Estudos mostram que a concentração de leptina é claramente maior em mulheres quando comparadas aos homens, e essa diferença nos níveis plasmáticos de leptina é de aproximadamente 40%, em qualquer percentual de gordura corporal ou massa adiposa. (SAAD et al., 1997).

Em um estudo de Elbers et al. (1997), as diferenças na concentração de leptina entre os sexos foram revertidas após tratamento com a testosterona em ratas e estradiol em ratos, evidenciando ainda mais a influência desses hormônios na concentração da leptina.

Mesmo após a menopausa, período em que os níveis de estrógeno diminuem drasticamente e ocorre aumento de peso, a leptina encontra-se mais alta em mulheres, quando comparadas aos homens (AHIMA & FLIER, 2000a). Isso se deve ao fato de a leptina ser inibida por andrógenos, estimulada por estrógenos, bem como ser altamente expressa em tecido adiposo (MASUZAKI et al., 1997; AHIMA & FLIER, 2000b).

Assim, fica evidenciado que os níveis de leptina são também regulados por hormônios esteróides. De fato, a concentração de leptina é controlada pela função gonadal ou por alterações na massa corpórea (PINILLA et al., 1999), uma vez que a perda da produção hormonal dos esteróides está associada com aumento do tecido adiposo visceral (FERRARA et al., 2002; CARR et al., 2004). Em estudos sobre alterações metabólicas, realizado com mulheres na pós-menopausa, foi observado aumento de massa corpórea associado com altos níveis séricos de leptina (TANAKA et al., 2001; MATVIENKO et al., 2010)

Em experimentos *in vitro*, observou-se que amostras de tecido adiposo de indivíduos do sexo masculino são completamente refratárias a ação tanto de estrógeno como de testosterona. Ao contrário, a dihidrotestosterona, androstenediona e a dehidroepiandrosterona-S são potentes inibidores da secreção

de leptina, enquanto que o estradiol tem forte estimulação no tecido adiposo de mulheres e a testosterona não tem efeitos em nenhum dos sexos (CASABIELL et al., 2001).

Além do papel da leptina na regulação do peso corporal por estabelecer retroalimentação entre as reservas energéticas e o centro hipotalâmico que controla o consumo alimentar, essa adipocina também já é conhecida por interagir com o sistema endócrino fornecendo informações sobre o tamanho dos estoques energéticos. Também pode atuar como um fator estimulante de utilização das demandas energéticas, no início da puberdade e vida reprodutiva, somente quando essa reserva é suficiente para garantir tais processos (CASABIELL et al., 2001).

Desse modo, uma característica fenotípica do balanço energético negativo é o hipogonadismo hipotalâmico (JUDD, 1998) a fim de permitir adaptação evolutiva na sobrevivência das espécies quando o consumo é escasso. Estudos já constataram que mulheres com níveis circulantes baixos de leptina não menstruam, uma vez que para elas é requerido uma massa gorda maior que 10% para que ocorra a ovulação (KOOP et al., 1997; BALLAUFF et al., 1999). Esse hormônio além de participar da homeostase energética, também controla a reprodução por regular o sistema neurosecretor do hormônio liberador de gonadotrofinas, que controla o eixo reprodutivo (WOJCIK- GLADYSZ & POLKOWSKA, 2006; VULLIÉMOZ et al., 2005). Assim, quando há baixo índice de gordura armazenada, o cérebro inibe a reprodução a fim de manter a homeostase (CAMPFIELD et al., 1995).

No jejum, leptina e estrógeno influenciam diretamente o ciclo estral e a ciclicidade (SCHNEIDER & WADE, 1989). Essas alterações envolvem proliferação celular da matriz vaginal, apoptose, angiogênese e infiltração leucocítica (EVANS et al., 1990; WOOD et al., 2007). Os camundongos ob/ob (com mutação no gene que produz a leptina) demonstram-se inférteis, porém a administração exógena de leptina causa aumento dos níveis séricos de hormônio luteinizante, aumentando o peso de útero e dos ovários (BARASH, 1996) e, é suficiente para induzir a fertilidade nesses animais (MOUNZIH; LU & CHEHAB, 1997).

Desse modo, as evidências indicam que tanto leptina como estrógeno aumentam o gasto energético e modulam o ciclo estral. A fim de observar a relação entre leptina e estradiol, Ng, Yong & Chakraborty (2010) examinaram o ciclo estral de camundongos e os resultados sugeriram que tanto a leptina quanto o estrógeno influenciam o ciclo estral, mas não são os únicos fatores contribuintes. Na ausência

de leptina e na diminuição de hormônios esteróides sexuais, os animais ficaram acíclicos, e como hipótese explicativa, os autores acreditam que o sistema nervoso interpreta essas alterações como déficit de estoque energético induzindo alterações no ciclo estral a fim de reprimir a reprodução.

Em um estudo com ratas Wistar foi observado que os níveis de leptina aumentaram mais que duas vezes tanto no grupo ovariectomizado, que mostrou-se hiperfágico e com maior peso corpóreo, quanto no grupo ovariectomizado e tratado com benzoato de estradiol (PANTALEÃO et al., 2010). Além disso, curiosamente, embora o grupo ovariectomizado tratado com estradiol apresentasse redução de peso corpóreo, a concentração de leptina encontrava-se alta, sugerindo que o estrógeno aumenta a secreção de leptina.

Em relação à atuação nos receptores, Diano et al. (1998) relataram que os receptores de leptina estão co-localizados com os receptores do estradiol. No estudo de Shin et al. (2007) ficou evidenciado que, nos tecidos adiposos subcutâneo abdominal e omental, os receptores para estrógeno (ER), ER α e ER β , apresentam sua expressão gênica significativamente correlacionada com a obesidade. Além disso, notou-se que a concentração de leptina e sua produção no tecido omental tiveram significativa influência na razão dos subtipos ER. O grupo com maior quantidade de ER β em relação ao ER α apresentou maior deposição de gordura no tecido adiposo omental comparado com o grupo que tinha expressão de ER α maior que ER β . Assim, percebe-se que embora não tenha existido correlação entre os níveis sistêmicos de leptina e estradiol, foi observada uma correlação entre a razão dos subtipos de receptores de estrógeno e a expressão de RNAm de leptina no tecido adiposo omental. Os autores chegaram à hipótese de que o aumento dos níveis de ER β poderia bloquear o efeito benéfico do ER α , como por exemplo, a diminuição da lipoproteína lipase e, este evento poderia estar sendo mediado pela leptina. Portanto, acredita-se que a leptina pode ser um importante modulador do receptor de estrógeno, consequentemente influenciando o metabolismo no tecido adiposo.

Ohlsson et al. (2000) e Heine et al. (2000) mostraram que camundongos knockout para ER α apresentaram obesidade, enquanto que os knockout para ER β não apresentavam o mesmo fenótipo. Ainda, quando a sinalização de ER β foi bloqueada nos camundongos knockout para ER α , o peso corpóreo e o peso dos depósitos de tecido adiposo diminuíram, bem como os adipócitos reduziram de

tamanho. Isso sugere que o ER β tem efeito contrário ao ER α , no tecido adiposo, embora os efeitos do estradiol no tecido adiposo pareçam ocorrer de maneira predominante via ER α (NAAZ et al., 2002).

Diante do exposto percebe-se que existe uma relação expressiva entre os hormônios, leptina e estradiol.

3.5 Leptina e ANP

Como citado anteriormente, o ANP parece possuir um papel inibidor sobre a leptina. Fain & Bahouth (2000) relataram que em adipócitos de roedores, bem como em humanos, a estimulação da lipólise por catecolaminas ou outros agentes lipolíticos está associada com a inibição da liberação da leptina pelo ANP.

Jeandel et al. (1989) constataram que o ANP aumentou o acúmulo de GMP cíclico em adipócitos de ratos. O fato do ANP ser capaz de estimular a lipólise em adipócitos humanos sugere que a proteína quinase está presente nesses adipócitos, sendo esta responsável por fosforilar a lipase hormônio-sensível envolvida na ativação da lipólise.

Fain et al. (2003) buscaram investigar se a estimulação da lipólise pelo ANP estaria associada com a inibição da liberação de leptina por adipócitos. Os resultados mostraram que a liberação de leptina foi inibida pelo ANP, de uma forma tempo-dependente, e que esse efeito, assim como sugerido pelo estudo de Jeandel supracitado, parece ser secundário à elevação de GMPc.

O principal local de síntese de ANP é o tecido cardíaco. Sabe-se que o tecido cardíaco também é capaz de sintetizar leptina (PURDHAM et al., 2004) e possui receptores para a mesma (RAJAPUROHITAM et al., 2003; PURDHAM et al., 2004), o que sugere que a leptina possua um efeito direto nos cardiomiócitos podendo agir de forma autócrina ou parácrina. Os efeitos da leptina nos cardiomiócitos têm sido amplamente estudados e foi verificada a ação da mesma na hipertrofia em culturas primárias de cardiomiócitos de ratos (RAJAPUROHITAM et al., 2003; ZEIDAN et al., 2008) e de humanos (MADANI et al., 2006). No entanto, poucos estudos abordaram o papel da leptina como agente hipertrófico in vivo. De fato, em camundongos obesos ob/ob, a leptina tem sido mostrada como um agente capaz de reduzir a

hipertrofia cardíaca, no entanto, a reversão da hipertrofia induzida pela leptina foi associada à normalização do peso corporal, tornando difícil de estabelecer uma relação correta de causa-efeito (BAROUCH et al., 2003).

Yuan et al. (2010) avaliaram a regulação da síntese e secreção de ANP, bem como a expressão dos seus receptores em modelos de ratos hiperleptinêmicos. Os resultados mostraram que a leptina reduz a liberação de ANP, indiretamente por meio do óxido nítrico. Esse papel mediador do óxido nítrico já foi relatado por Dietz (2005), segundo o qual o óxido nítrico é capaz de inibir a secreção do ANP. Não houve alteração na expressão dos receptores natriuréticos nos animais com altos níveis de leptina bem como na expressão do ANP cardíaco, sendo observada apenas uma alteração nos níveis plasmáticos desse peptídeo (YUAN et al., 2010).

Mascareno et al. (2009) utilizando camundongos da linhagem ob/ob e C57BL/6J constataram que a leptina também desempenha um papel modulador na atividade transcricional do promotor do gene do ANP. Os resultados mostraram que a leptina atua por regulação do NFATc4, um membro dos fatores nucleares ativadores de células T (NFAT), que é uma família de fatores transcricionais em cardiomiócitos. Este estudo também revelou que em camundongos ob/ob submetidos a constrição da aorta não foi observada ativação do NFATc4 no coração, todavia, a administração venosa intraperitoneal de leptina nesses animais foi capaz de restaurar a atividade do DNA ligante do NFATc4 e induziu a expressão gênica do ANP. Os autores concluíram então, que a leptina tem ação inibidora no remodelamento do crescimento do ventrículo esquerdo, devido ativação do NFATc4 seguido por uma aumento na expressão gênica do ANP. Já Purdham et al. (2008) observaram que o bloqueio dos receptores para leptina reduziu a hipertrofia cardíaca induzida pela ligação da artéria coronária bem como a expressão gênica de peptídeo natriurético atrial. Desta forma, a interação entre leptina e ANP ainda é controversa.

3.6 Ratos espontaneamente hipertensos e leptina

É interessante ressaltar nessa revisão a escolha do modelo de hipertensão animal, os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), destacando o conhecimento adquirido ao longo dos anos em relação à leptina nesse modelo.

Os SHR são conhecidos por ser um dos melhores modelos experimentais para o estudo da hipertensão. Os valores pressóricos dos animais SHR machos atingem 150 mmHg na 12ª semana e vão aumentando progressivamente até chegar a 200 mmHg por volta da 20ª a 30ª semana (ZICHA & KUNES, 1999).

Os níveis de leptina estão elevados na hipertensão essencial tanto em roedores (UMEDA; [KANDA & MURAKAMI](#), 2003) quanto em humanos (HENRIKSEN et al., 2000) o que sugere uma forte ligação entre hiperleptinemia e disfunção cardiovascular na hipertensão. Já está bem descrito que a expressão do gene *ob* (produtor de leptina) e a secreção da leptina se correlacionam positivamente ao conteúdo de gordura corporal (CARO et al., 1996) e, que o aumento nas concentrações de leptina em SHR seja devido ao aumento de tecido adiposo subcutâneo e mesentérico (UMEDA; [KANDA & MURAKAMI](#), 2003). Entretanto, acredita-se que a capacidade da leptina em induzir uma resposta no coração, nos rins e artéria mesentérica, seja prejudicada em SHR (GALVEZ-PRIETO et al., 2004).

Hiraoka et al. (1997) pesquisaram a expressão do gene *ob* no tecido adiposo de SHR obeso e não obeso, nos estágios de estabelecimento da hipertensão e obesidade, bem como dosaram os níveis de leptina nesses animais. Os resultados demonstraram que os níveis de leptina na 20ª semana de idade foram cem vezes maiores nos SHR obesos, quando comparado aos SRH não obesos. Além disso, houve um aumento da expressão do gene *ob* em SHR obeso, o que segundo os autores, poderia estar relacionado ao aumento da massa de tecido adiposo e/ ou ao fenótipo obeso. O aumento da expressão do gene *ob* também pode ser devido, em parte, ao comprometimento da interação entre leptina e o seu receptor (FREDERICH et al., 1995a), ou mesmo, à perda da ação da leptina devido a uma mutação *nonsense* no receptor da leptina em SHR obesos, já descrita por Takaya et al. (1996). Segundo Hiraoka et al. (1997) essas características dos animais SHR indicam que este seja um bom modelo para o estudo da hipertensão e obesidade.

Recentemente, evidências indicaram que a leptina estimula o óxido nítrico (NO) no sistema cardiovascular (NICKOLA et al., 2000) e que a infusão de leptina tem reduzido a pressão arterial e a frequência cardíaca, o que pode ser revertido pela inibição da sintase do óxido nítrico - NOS (SHEK, BRANDS & HALL, 1998; FRUHBECK, 1999). Wold et al. (2002) verificaram a influência da hipertensão arterial

na resposta cardíaca contrátil da leptina, comparando ratas Wistar Kyoto (WKY) com ratas espontaneamente hipertensas. Os resultados mostraram que em SHR não foi encontrado a redução da contração dos miócitos, induzida pela leptina, vista normalmente em ratas WKY, possivelmente por alteração na sinalização JAK/STAT e MAPkinase, bem como na resposta ao NO. Embora a hiperleptinemia pareça estar associada com a hipertrofia cardíaca, mais estudos sobre a participação da leptina na patofisiologia da hipertensão são necessários, a fim de esclarecer se a leptina, por si só, é responsável por essas alterações na estrutura do coração.

É sabido também que a leptina reduz o efeito vasoconstrictor potente da angiotensina II, todavia, são necessários mais estudos que esclareçam as propriedades vasodilatadoras da leptina em roedores e humanos (MATSUDA et al., 2003). Desse modo, um estudo de Rodríguez et al. (2006) comparou o efeito da leptina no aumento na concentração de Ca^{2+} , induzida pela angiotensina II, bem como da vasoconstrição da aorta em SHR e WKY normotensos. Os resultados mostraram que nos animais SHR houve diminuição da inibição da angiotensina II o que levou ao aumento de Ca^{2+} intracelular e consequentemente vasoconstrição. Além disso, os resultados confirmaram que os SHR apresentam maior concentração de leptina, comparados ao WKY, e que os SHR apresentam aumento na expressão das isoformas de receptores de leptina do tipo curto (OB-Ra) e longo (OB-Rb) nas células musculares lisas (VSMC) da artéria aorta.

Portanto, a hiperleptinemia, o aumento da expressão de OB-R em VSMCs e a perda do efeito inibitório da leptina sobre a angiotensina II em SHR sugerem que este modelo animal de hipertensão apresente resistência à leptina. Assim, os dados sugerem que na hipertensão associada à hiperleptinemia, como encontrado no modelo SHR, o efeito vascular protetor da leptina pode estar anulado (RODRÍGUEZ et al., 2006) e, isso pode ser explicado pelo fato da obesidade ser caracterizada por resistência à leptina e estimulação do sistema renina- angiotensina (RAHMOUNI et al., 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizadas 24 ratas espontaneamente hipertensas (SHR) provenientes do Centro de Criação de Animais SUPRILAB e mantidas no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde/UFBA em ambiente com controle de luz (12 horas luz, das 7 às 19h) e temperatura ($23\pm 3^{\circ}\text{C}$) e livre acesso à água e ração. Este estudo foi aprovado do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Feira de Santana. Os animais consumiram ração padronizada AIN 93 (Pragsoluções Biociências, São Paulo-SP) por um período de aclimatação de uma semana. Para simular o quadro de após-menopausa (ausência de produção ovariana de estradiol) as ratas foram ovariectomizadas com dez semanas de idade, quando a partir de então foram subdivididas em grupos que receberam as seguintes dietas:

- Dieta contendo 54,4% do total de calorias oriundas de gordura (dieta hiperlipídica - DL; Pragsoluções Biociências, SP).
- Dieta controle (DC) (ração padronizada AIN 93; Pragsoluções Biociências, SP).

Na 20ª semana após a ovariectomia, imediatamente antes do início da terapia de reposição hormonal, as ratas também foram colocadas em gaiolas metabólicas, a fim de mensurar o consumo de ração e a ingestão calórica, durante 3 dias.

4.2 Dietas experimentais

As dietas experimentais foram formuladas pela Profa. Dra. Amélia Cristina Mendes de Magalhães, calculadas utilizando-se como base a recomendação para dietas de roedores de laboratórios, elaborada pelo *American Institute of Nutrition* e

reportada por Reeves & Nielsen & Fahey (1993) e fabricadas pela empresa Pragsoluções Biociências, São Paulo-SP.

As proporções dos ingredientes nas dietas experimentais, expressas na matéria seca, e a composição bromatológica das dietas encontram-se descritas em seguida na Tabela 1.

Tabela 1 – Proporções dos ingredientes nas dietas experimentais

Ingredientes	DC	DL
	-----% MS-----	
Amido de milho	46,57	27,00
Caseína	14,00	14,10
Amido de milho dextrinizado	15,50	10,00
Sacarose	10,00	10,00
Óleo de soja	4,00	10,00
Sebo bovino	-	10,00
Fibra (pó de celulose)	5,00	4,00
Mistura mineral (AIN-93M-MX) ¹	3,50	3,50
Mistura Vitamínica (AIN-93-VX) ²	1,00	1,00
L-cistina	0,18	0,14
Bitartarato Colina	0,25	0,25
Tert-butil-hidroquinona	0,0014	0,0060
Total	100,00	100,00

¹Mistura mineral AIN-93G-MX: 35,7% de carbonato de cálcio; 25% de fosfato monabásico de potássio; 7,4% de cloreto de sódio; 4,66% de sulfato de potássio; 2,8% de citrato de potássio; 2,4% de óxido de magnésio; 0,606% de citrato férrico; 0,165% de carbonato de zinco; 0,063% carbonato de manganês; 0,03% de carbonato de cobre; 0,001% de iodato de potássio; 0,001% de selenito de sódio; 0,0008% de paramobdato de amônia; 0,145% de metasilicato de sódio; 0,0275% de sulfato de potássio e cromo; 0,0082% de ácido bórico; 0,00635% de fluoreto de sódio; 0,00318% de carbonato de níquel; 0,00174% de cloreto de lítio; 0,00066% vanadato de amônio; 20,98% de sacarose em pó.

²Mistura vitamínica AIN-93-VX- Composição de vitaminas por kg de dieta: 30mg de ácido nicotínico; 15mg de ácido pantotênico; 6mg de piridoxina; 5mg de tiamina; 6mg de riboflavina; 2mg de ácido fólico; 750ug de vitamina K; 200ug de D-biotina; 25ug de vitamina B-12; 4000UI de vitamina A; 1000UI de vitamina D3; 75UI vitamina E.

As contribuições das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total de energia metabolizável das dietas experimentais encontram-se descrito a seguir na tabela 2.

Tabela 2 – Contribuição das frações de proteínas, carboidratos e gorduras no total da energia metabolizável nas dietas experimentais.

Item	Dietas experimentais	
	DC	DL
Energia Metabolizável (Mcal/kg ⁻¹)	3,41	4,96
	% de contribuição das frações dietéticas	
Proteína	20,8	14,4
Carboidratos	68,6	31,2
Gorduras	10,6	54,4

04.3 Procedimento experimental

Ao atingir dez semanas de idade, as 24 ratas SHR pesavam em média 200g e foram ovariectomizadas e divididas nos quatro grupos seguintes, com seis animais cada:

- Ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta controle (DCO)
- Ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta hiperlipídica (DLO)
- Ratas sham-operadas alimentadas com dieta controle (DCS)
- Ratas sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica (DLS)

Foram realizadas medidas de pressão arterial sistólica pelo método de pletismografia de cauda, utilizando-se o medidor LE5001 (Panlab, Espanha). O peso corporal e a pressão arterial foram mensurados durante 24 semanas. Nas duas últimas semanas de dieta, os animais receberam, diariamente, a terapia de reposição hormonal contendo 5ug/100g de peso corporal de 17 β-estradiol ou veículo, óleo de milho, por via subcutânea. A dose foi estabelecida em estudo anterior (BELO et al., 2004). Ao completar 24 semanas de dieta as ratas foram sacrificadas por decapitação.

O sangue do tronco foi coletado em tubos heparinizados contendo inibidores de proteases (ácido etilenodiamino tetra-acético- EDTA a 10⁻⁵mol/L e fenilmetilsulfonifluorido- PMSF a 10⁻⁵mol/L) (Promega Corporation- USA). Em

seguida foram centrifugados a 3000rpm em 4°C, durante 20 min.. O plasma foi então separado e, em seguida acondicionado em freezer a -20°C para posteriores dosagens de ANP, leptina e estradiol pelo método ELISA.

Os átrios direito e esquerdo e os tecidos adiposos dos depósitos mesentérico, parametrial e retroperitoneal foram prontamente removidos, pesados, adicionado 500µl de RNA later® (Applied Biosystems- Ambion- USA) e armazenados em freezer a -20°C para análises posteriores. O RNA later® mantém a integridade do RNA e do DNA a -20°C por até um ano. Posteriormente foi realizada extração de RNAm, bem como reação em cadeia da polimerase (PCR) para determinação da expressão gênica de ANP nos átrios e de leptina nos diferentes depósitos de tecido adiposo supracitados.

4.4 Ovariectomia

Após anestesia com Tribromoetanol a 2,5% foram feitas incisões em ambos os flancos, os ovários foram removidos e a pele foi suturada, de acordo com técnica corrente em endocrinologia. Foi realizado antibiótico-profilaxia com 0,4ml/animal de pentabiótico, via intramuscular. Os animais sham-operados (falso operados) foram submetidos aos mesmos procedimentos com exceção da remoção dos ovários.

4.5 Dosagem de ANP, leptina e estradiol

As dosagens de ANP, leptina e estradiol foram feitas por enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA, como descrito pelo World Health Organ, 1976.

Para isso, os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue do tronco foi coletado para subsequente dosagem. O plasma foi armazenado a -20°C até o momento do ensaio. O nível plasmático de leptina foi dosado usando-se um kit

de ELISA para leptina de ratos (INVITROGEN, CAT No. KRC2281, Invitrogen Corporation, USA). O estradiol plasmático foi dosado utilizando-se um kit de ELISA para estradiol (BIOSOURCE, CAT No. KAQ0621, USA). A concentração plasmática de ANP foi encontrada utilizando-se um kit de ELISA para ANP de ratos (RayBio® Atrial Natriuretic Peptide (ANP) EIA Kit, Catalog: EIA-ANP-1, RayBiotech, Inc, Norcross Georgia, United States).

O princípio do método utilizado se baseia na interação antígeno-anticorpo. A técnica resume-se da seguinte maneira: em uma placa de poliestireno, que contém anticorpos altamente purificados fixados em suas escavações, são pipetados: amostras padrão (de conteúdo do hormônio já conhecido), amostras de conteúdo não conhecido e o controle. Após a primeira incubação, a placa é lavada e, em seguida, realiza-se uma segunda incubação com o segundo anticorpo biotilado. Após essa incubação com anticorpo secundário, realiza-se uma segunda lavagem para posterior incubação com a enzima estreptovidina peroxidase. Após essa terceira incubação, é realizada nova lavagem a fim de remover todo o conteúdo de enzima que não se ligou. Por fim, é adicionado o cromógeno (solução que produz coloração ao se ligar no anticorpo secundário). Normalmente, a intensidade da cor produzida é proporcional ao conteúdo do hormônio presente na amostra original de conteúdo não conhecido.

Para a leptina, na primeira incubação foi utilizado 100µl de amostra, padrão ou controle, que foram adicionadas na placa a 37°C, durante 120 min.. Em seguida, a placa foi lavada quatro vezes com 400 µl da solução de lavagem disponível no kit (wash buffer). Posteriormente, foram adicionados 100 µl do conjugado biotina nas escavações, durante o período de incubação de 60 min.. Em seguida, foram realizadas mais quatro lavagens e a placa foi incubada com estreptovidina- HRP durante trinta minutos. Após, realizou-se mais quatro lavagens e foi adicionado 100 µl de cromógeno estabilizante e, incubado durante 30 min. na ausência de luz. Por último, foi adicionado a “stop solution”, durante 30 min., para finalizar a reação. A absorbância foi lida em 450 nm no leitor de microplaca - Thermo Plate (EQUIPAR LTDA, Brasil).

Para o estradiol, foi adicionado 50 µl das amostras de plasma ou de cada padrão ou controle (disponíveis no kit), 50 µl de conjugado HRP-estradiol (E2-HRP)

e 50µl de anti-estradiol em cada escavação da placa que previamente continha anti-rabbit IgG. O concentrado estradiol-HRP (E2-HRP) foi adicionado com o intuito de competir com estradiol contido nas amostras. A incubação foi realizada em agitador configurado em 700 rpm, durante 120 min., em temperatura ambiente. A horseradish peroxidase (HRP) é uma glicoproteína de aproximadamente 44 daltons que produz coloração fluorométrica ou luminescente quando incubada com substrato próprio, a fim de detectar e/ou quantificá-lo. Após essa primeira incubação, foi realizada lavagem com 400 µl de solução *wash*, disponível no kit. Em seguida, uma solução cromógena (tetramthylbenzidine (TMB)- H₂O₂) foi adicionada e após 30 min. de incubação a reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄). A absorbância foi lida, imediatamente, em 450 nm no leitor de microplaca- Thermo Plate (EQUIPAR LTDA, Brasil). O conteúdo de substrato é inversamente proporcional à concentração de estradiol das amostras utilizadas.

Para o ensaio do ANP, a placa pré-coberta com anticorpo anti-rabbit secundário foi incubada com 100 µl de anticorpo anti-ANP, durante 90 min.. A placa foi lavada cinco vezes com solução *wash*. Em seguida, foi adicionado nas escavações da placa: 100 µl de cada padrão, ou controle positivo (ambos disponíveis no kit), ou amostra e incubado durante 190 min. em temperatura ambiente. Novamente foi realizada lavagem e adicionado 100 µl de solução de HRP-Streptavidin para incubação durante 45 min.. Após terceira lavagem das escavações da placa foi adicionado 100 µl de tetramthylbenzidine (TMB) para incubação durante 30 min.. Por fim, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄). O ANP biotilado foi adicionado para interagir com Streptavidin horseradish peroxidase (SA-HRP) que catalisa o desenvolvimento da cor na reação. Neste caso, a intensidade da coloração é diretamente proporcional ao conteúdo do complexo formado (SA-HRP peptídeo biotilado) e inversamente proporcional ao conteúdo do ANP das amostras e do padrão, uma vez que ocorre ligação competitiva do anticorpo ANP entre o peptídeo ANP biotilado e os peptídeos da amostra e do padrão.

Todos os testes foram realizados em duplicata e, ao final de cada teste, foi construída uma curva padrão em software apropriado (Grap Pad Prism® versão 5). A concentração dos hormônios nas amostras foi obtida por regressão linear.

4.6 Análise da expressão gênica

4.6.1 Extração de RNAm

O RNA do tecido adiposo dos depósitos mesentérico, retroperitoneal e parametrial e dos átrios dos animais foi isolado de acordo com o método de tiocionato-fenol-clorofórmio (Chomczynski & Sacchi, 1987). Após decapitação dos animais, os tecidos foram rapidamente removidos e congelados em RNA later® a -20°. Para extração, os tecidos foram colocados em tubos plásticos estéreis contendo solução de fenol e isotiocianato de guanidina (Brazol®, LCG Biotecnologia, Brasil), 1mL/100mg de tecido. As amostras foram trituradas por um homogeneizador elétrico (Dremel®, model 300, México). A adição de clorofórmio (LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, Brasil) (0,2 mL/100mg de tecido) seguida de centrifugação (12000xg, 4 °C, 15 minutos) separou a solução em três fases: uma fase orgânica, localizada no fundo do tubo plástico; uma fase constituída principalmente por DNA, situada na parte média; e, por fim, uma fase aquosa, a qual contém o RNA total, localizada no sobrenadante.

A fase aquosa foi transferida cuidadosamente para novos tubos plásticos estéreis e identificados. Álcool isopropílico (0,5ml) (LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, Brasil) foi adicionado ao RNA total para promover a sua precipitação e após 10 min. de repouso, foi realizada uma nova centrifugação (12000xg, 4 °C, 15 min.). O precipitado de RNA foi, então, lavado com 1ml de etanol anidro (ultra puro) (Biotechnology Grade, USA) a 70%, submetido a vortex e seguido de centrifugação a 9600xg, 4 °C, durante 5 min..

O precipitado de RNA foi ressuspenso em 50µl de água ultra pura e livre de DNase obtida pelo processo de osmose (LCG Biotecnologia, Brasil) ou água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Integrated DNA Technologies, USA) e, em seguida, aquecida em banho-maria a 50°C para desnaturação da cadeia, durante 10 min., deixando-os pronto para etapa seguinte.

4.6.2 Leitura da Concentração de RNA

Para dosar o RNA, as amostras, ressuspendidas na etapa anterior, foram diluídas em água DEPC, na proporção de 1:200, da seguinte maneira: 10µL de RNA, em 1,990 ml de tampão TE (Tris-HCL 10nM, pH 8,0, EDTA 1Mm) (LCG Biotecnologia, Brasil). Este último tem a função de manter a estrutura do RNA intacta, sem haver quebras na sequência de nucleotídeos.

A leitura do RNA foi realizada com um espectrofotômetro SP- 2000UV-VIS® (Spectrum, Shanghai) utilizando-se 100% de transmitância e comprimento de onda específico: 260nm para leitura de RNA e 280nm para DNA. Realização de vortex para homogeneizar as amostras era realizado antes da leitura, e, para leitura do branco utilizou-se somente o tampão TE (2 ml). A leitura do DNA serve para estimar a quantidade de contaminantes na solução e, com isso, determinar a eficácia da extração. Desse modo, a pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280nm for superior a 1,7. Considerando que uma unidade de absorvância a 260nm corresponde a 40µg de RNA por mL de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40\mu\text{g/mL}$$

onde A = absorvância e D= diluição da alíquota usada para a quantificação, no caso 200, visto que, 10 µL de solução de RNA foram diluídos em 2mL de água.

4.6.3 Síntese do DNA complementar (cDNA) - Transcrição reversa

O RNA dos tecidos adiposos mesentérico, parametrial e retroperitoneal e dos átrios foi extraído utilizando-se Brazol®, como descrito anteriormente. A obtenção do cDNA foi feita através de uma retro-transcrição (RT) a partir do RNAm, utilizando-se oligonucleotídeos complementares a cauda poli-A do RNAm.

Em novos microtubos estéreis foram pipetados um volume de RNA correspondente à 1,0 µg e acrescido água DEPC suficiente para completar 4,0µL.

Foi adicionado 1,0 μ L de oligo dT (Promega corporation, USA), alcançando um volume final de 5 μ L. Logo em seguida as amostras foram levadas ao termociclador (Long Gene Scientific Instruments Co., Ltd., USA) para serem aquecidas à 70°C e, imediatamente foram imergidas em gelo a fim de interromper a reação. Nesta etapa, é importante salientar que o controle negativo do experimento o volume de RNA não foi pipetado.

Em seguida, para a transcrição reversa, foi adicionado 4,0 μ L de tampão específico (10x) Improm® (Promega corporation, USA), 1,6 μ L de cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1,0 μ L de desorribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) (10mM), 6,4 μ L de água livre de nucleasse, 1,0 μ L de inibidor e 1,0 μ L de enzima transcriptase reversa *Moloney Murine Leukemia Vírus* (MMLV), alcançando um volume final de 20 μ L. Essa solução foi então mantida a 40°C por 60 min. para a síntese de c-DNA e, ao final, foram levadas novamente ao termociclador a 25°C, durante 05 min., e 42°C por 60 min., a fim de parar a reação.

4.6.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a síntese do cDNA foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do c-DNA para ANP e leptina com pares de “primers” baseados em sequências previamente publicadas. Para amplificar o ANP, os seguintes “primers” foram utilizados: GCCGGTAGAAGATGAGGTCA e GGGCTCCAATCCTGTCAATC, senso e anti-senso, respectivamente (Suzuki et al., 1998). As condições dos PCR foram padronizadas e definidas após realização de testes. As condições foram 95°C por 10 min. seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Para amplificar leptina foram utilizados os seguintes pares de primers TCACCCATTCTGAGTTTTGTC e CGCCATCCAGGCTCTCT (Garcia et al., 2000). As condições do PCR para leptina foram 37 ciclos de 94°C por 1 min., 60°C por 1 min. e 72°C por 1 min., com um ciclo final de alongamento de 72°C por 10 min..

A PCR foi realizada utilizando-se: 25µl de mistura pré-formada para PCR (solução MIX, LGCBio, Brasil), a qual contém tampão específico, dNTPs, e enzima Taq polimerase; 0,2µl de cada “primer” senso e anti-senso; 23,6µl de água DEPC; e, 1µl de cDNA, o que, ao final totalizou um volume final de 50µl. Como controle negativo utilizamos água no lugar do cDNA no processo de PCR. Em seguida as PCR de leptina e de ANP foram levadas ao termociclador nas configurações citadas no parágrafo anterior. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%. O gel foi revelado com brometo de etídio (1µg/ml), visualizado em luz ultravioleta e digitalizado. As bandas foram quantificadas através do programa LabImage 1D®. β-Actina foi amplificada como um controle interno de cada PCR utilizando-se primers específicos anteriormente descritos (ANDRADE et al., 2011). Os resultados são referentes a três PCR para cada amostra.

4.7 Análise dos dados

O delineamento utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. Os animais, de mesmo peso e sexo, foram distribuídos de maneira aleatória. Foram mantidos em ambiente com condições ambientais controladas e uniformes, e submetidos aos mesmos procedimentos.

Para comparar as médias entre os grupos estudados foi determinada a variação individual ou variação do erro (s^2), através de análise de variância ANOVA two way (consideramos dois fatores: a dieta e o tratamento hormonal). Foi empregado o teste Bonferroni para a comparação das médias dos grupos estudados. Os resultados estão expressos como média mais ou menos o erro padrão da média e como critério para significância foi considerado p menor que 0,05. As correlações foram calculadas através do teste de Pearson.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da ovariectomia e da dieta hiperlipídica no peso corporal e pressão arterial de fêmeas SHR.

5.1.1 Evolução do Peso Corporal

Os animais ovariectomizados, tanto os alimentados com dieta controle (DCO) quanto os alimentados com dieta hiperlipídica (DLO), apresentaram maior peso corporal quando comparados aos animais sham-operados alimentados com dieta controle (DCS) ou hiperlipídica (DLS) (Fig.1). As ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta controle (DCO) apresentaram aumento de peso corporal a partir do segundo mês de dieta quando comparadas aos animais sham-operados alimentados com dieta controle (DCS), o que denota o efeito da redução dos níveis endógenos de estrógeno sobre o ganho de peso corporal. Já os animais ovariectomizados alimentados com dieta hiperlipídica (DLO) apresentaram aumento de peso corporal a partir do terceiro mês de dieta, quando comparados ao grupo controle (DCS), o que demonstra o efeito da ovariectomia associado ao efeito da dieta hiperlipídica (Fig.1).

O efeito isolado da dieta hiperlipídica sobre o ganho de peso corporal foi observado no sexto mês de dieta, momento no qual o grupo sham-operado e alimentado com dieta hiperlipídica (DLS) apresentou peso corporal superior ao grupo controle (DCS) (Fig.1)

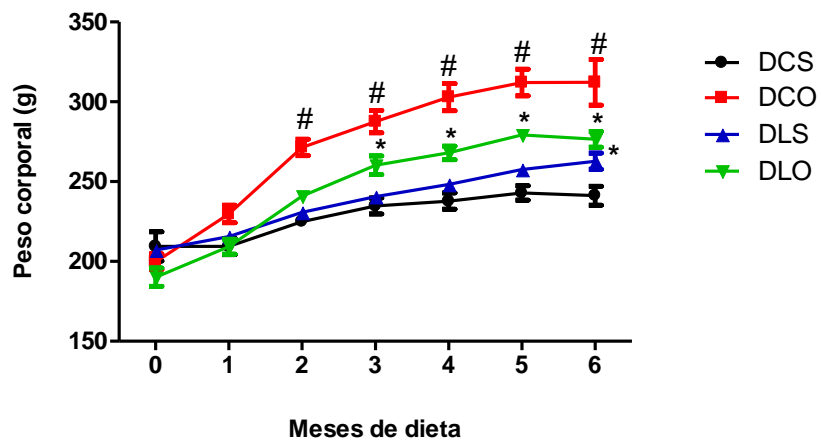


Figura 1. Peso corporal de SHR ovariectomizadas e alimentadas com dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta hiperlipídica (DLO), ratas sham-operadas e alimentadas com dieta hiperlipídica (DLS) e ratas sham-operadas e alimentadas com dieta controle (DCS) durante seis meses. * $p < 0,05$ vs DCS; # $p < 0,05$ vs demais grupos.

5.1.2 Evolução da Pressão Arterial

A medida indireta da pressão arterial, por meio do método de pletismografia de cauda, demonstrou que a ovariectomia elevou a pressão arterial sistólica de todos os grupos experimentais a partir do sexto mês de dieta, quando comparados ao grupo controle de ratas sham-operadas e alimentadas com dieta controle (DCS) (Fig. 2). Ressalta-se que no grupo ovariectomizado alimentado com dieta controle esse aumento foi observado a partir do segundo mês de dieta (Fig. 2).

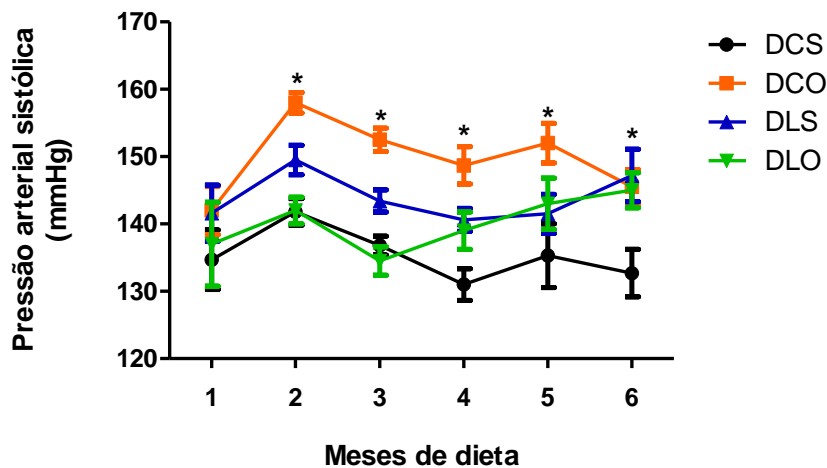


Figura 2. Pressão arterial sistólica de SHR ovariectomizadas e alimentadas com dieta controle (DCO), ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta hiperlipídica (DLO), ratas sham-operadas e alimentadas com dieta hiperlipídica (DLS) e ratas sham-operadas e alimentadas com dieta controle (DCS) durante seis meses. * $p < 0,05$ vs DCS.

5.1.3 Consumo de ração e ingestão calórica

As ratas alimentadas com dieta hiperlipídica, tanto ovariectomizadas (DLO) quanto as sham operadas (DLS), apresentaram um menor consumo de ração, quando comparadas aos animais que receberam dieta controle (Tabela A). No entanto, o consumo calórico das ratas SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle não apresentaram diferença estatística entre si, como pode ser observado na tabela A.

Tabela A:

Consumo de ração e ingestão calórica de ratas ovariectomizadas ou sham-operadas e alimentadas por 20 semanas com dieta controle ou dieta hiperlipídica. * $p < 0,05$ vs dieta controle sham-operada.

Variável	Dieta controle sham-operada (DCS)	Dieta controle ovariectomizada (DCO)	Dieta hiperlipídica sham-operada (DLS)	Dieta hiperlipídica ovariectomizada (DLO)
consumo de ração (g/dia)	17,2±1,2	16,3±0,5	10,8±0,7*	12,6±0,6*
ingestão calórica (Mcal/K g-1)	64,8±4,6	61,3±2,1	53,2±3,3	62,0±3,2

5.2. Efeito da Terapia de Reposição Hormonal

5.2.1 Pressão Arterial durante o período de Reposição Hormonal

A terapia de reposição hormonal com 17-beta estradiol reduziu a pressão arterial sistólica dos animais ovariectomizados e alimentados com dieta controle (DCO-E2). Essa redução começou a partir do décimo segundo dia permanecendo constante até o último dia da terapia (Fig.3). Em contrapartida, o tratamento com estradiol não foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica dos animais alimentados com dieta hiperlipídica.

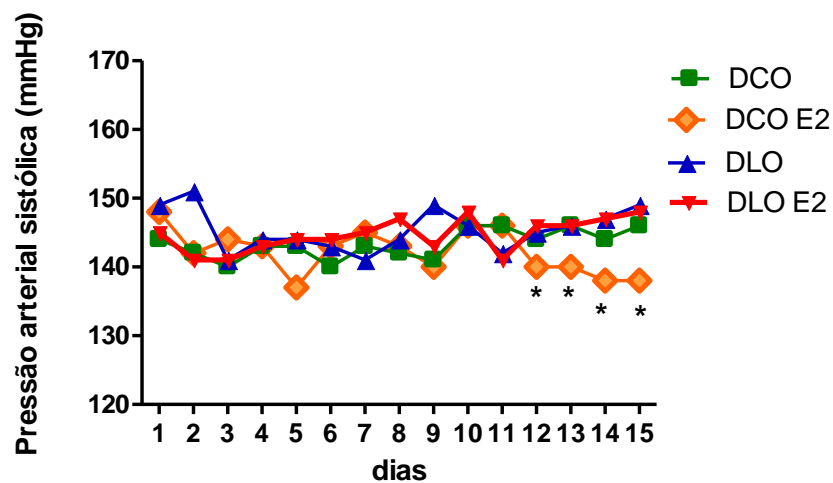


Figura 3. Pressão arterial sistólica de SHR ovariectomizadas e alimentadas com dieta hiperlipídica (DLO) ou controle (DCO) e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (TRH-E2) ou veículo por 15 dias. * $p < 0,05$ vs DCO.

5.2.2 Eficácia da ovariectomia e do tratamento com estradiol

Os grupos ovariectomizados tratados com veículo (óleo de milho), independente do tipo de dieta oferecido, apresentaram níveis baixos de estradiol, o que mostra a eficácia do procedimento cirúrgico, a ovariectomia.

A terapia de reposição hormonal com 17-beta estradiol, em ambos os grupos ovariectomizados, mostrou-se igualmente eficaz, uma vez que os níveis plasmáticos de estradiol dos animais tratados são similares aos níveis encontrados nos animais sham-operados, como pode ser observado na figura 4.

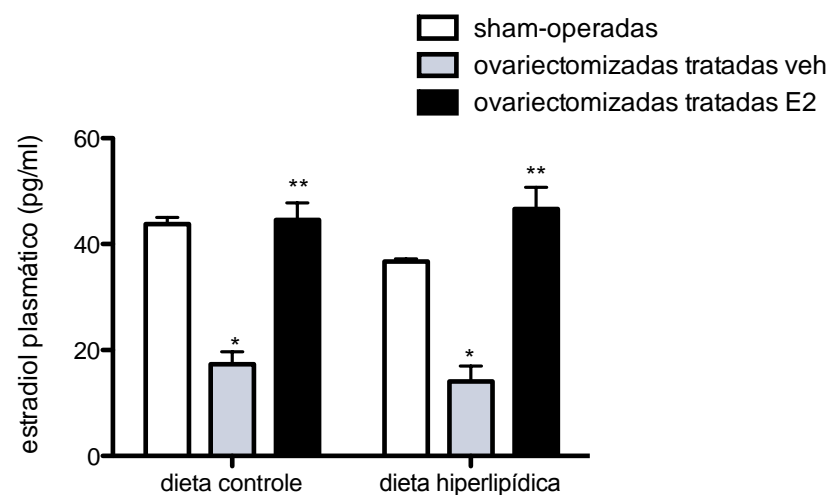


Figura 4. Concentração plasmática de estradiol de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas e alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle após tratamento das ratas ovariectomizadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias. * $p < 0,05$ vs sham-operadas, ** $p < 0,05$ vs ovariectomizadas tratadas com veículo.

5.2.3 Peso corporal após a terapia de reposição hormonal

Como citado anteriormente, o grupo que recebeu dieta controle apresentou aumento de peso corporal após a ovariectomia. Após o tratamento com estradiol, observamos que esses animais alimentados com dieta controle apresentaram uma redução significativa do peso corporal não diferente estatisticamente dos animais sham-operados (Fig. 5). Já o grupo de animais ovariectomizados e alimentados com dieta hiperlipídica não apresentaram alteração do peso corporal após o tratamento com estradiol.

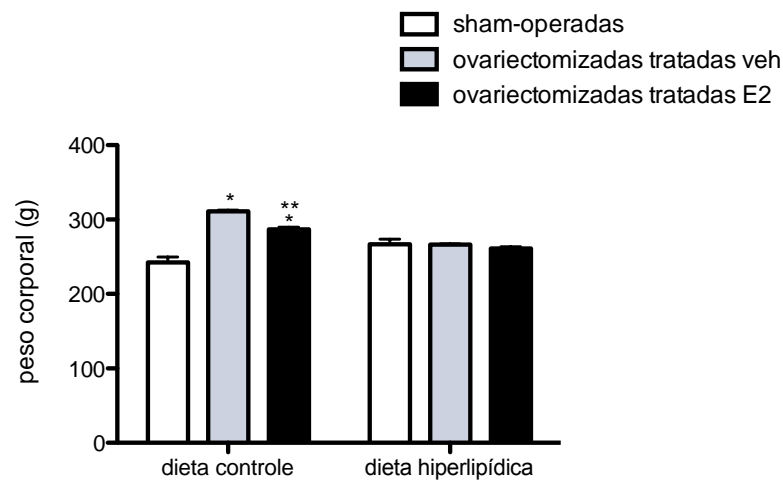


Figura 5. Peso corporal de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias. * $p < 0,05$ vs sham-operadas, ** $p < 0,05$ vs ovariectomizadas tratadas com veículo.

5.2.4 Peso dos depósitos de tecidos adiposos

A terapia de reposição estrogênica não alterou o peso do depósito de tecido adiposo mesentérico (Fig. 6).

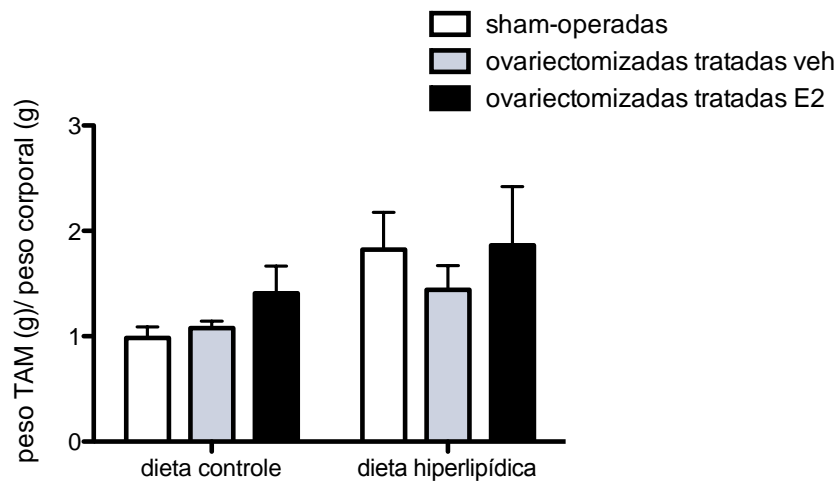


Figura 6. Peso do depósito de tecido adiposo mesentérico (TAM) de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias.

Os animais sham-operados que consumiram dieta hiperlipídica apresentaram aumento de peso do tecido adiposo parametrial quando comparados aos animais sham-operados e alimentados com dieta controle. A ovariectomia e a terapia de reposição hormonal com 17β - estradiol não alteraram o peso deste depósito (Fig. 7).

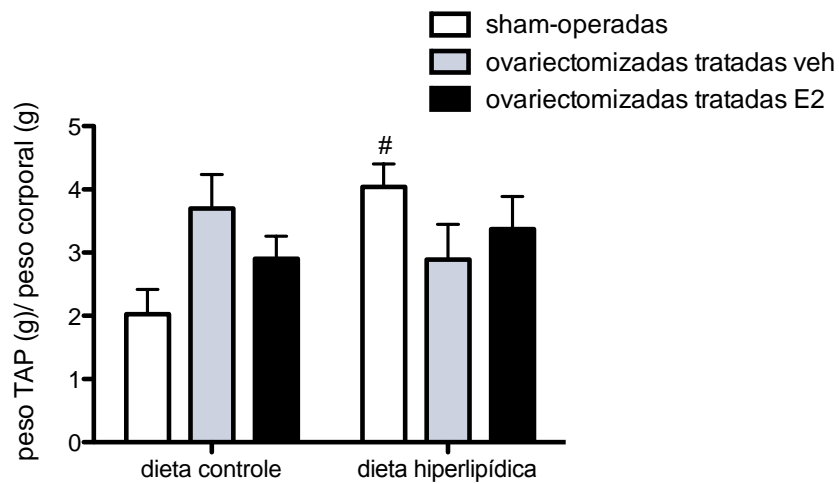


Figura 7. Peso do depósito de tecido adiposo parametrial (TAP) de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias. # $p < 0,05$ vs sham-operadas e alimentadas com dieta controle.

Os animais sham-operados que consumiram dieta hiperlipídica também apresentaram aumento do peso do depósito de tecido adiposo retroperitoneal, similarmente ao ocorrido com o depósito de tecido adiposo parametrial. Nem a ovariectomia nem a terapia de reposição hormonal com 17β - estradiol alteraram o peso deste depósito (Fig. 8).

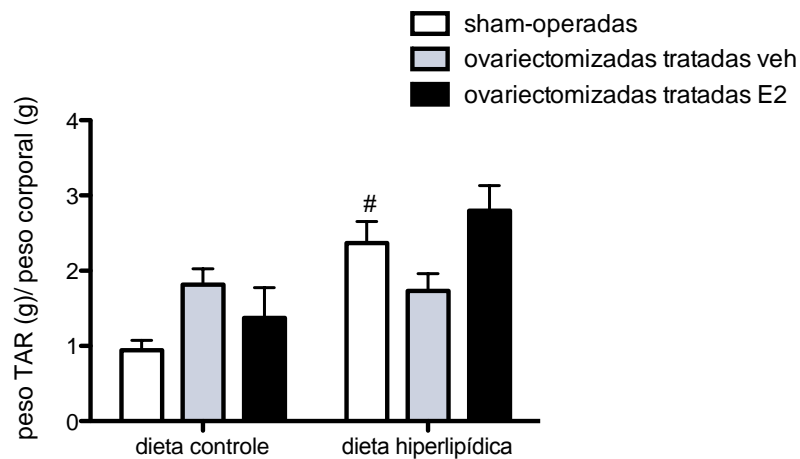


Figura 8. Peso do depósito de tecido adiposo retroperitoneal (TAR) de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias. # $p < 0,05$ vs sham-operadas e alimentadas com dieta controle.

5.2.5 Peso Cardíaco

Em relação ao peso cardíaco, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos experimentais (Fig. 9).

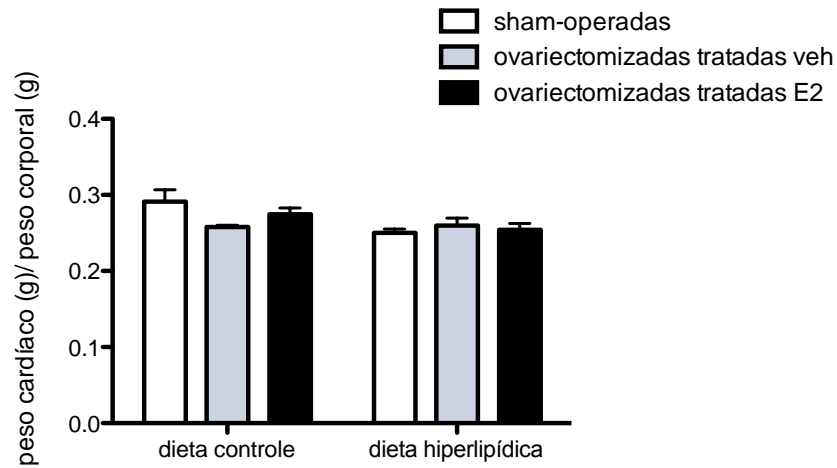


Figura 9. Peso cardíaco de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias.

5.2.6 Liberação de leptina e sua expressão gênica em depósitos de tecido adiposo

As SHR sham-operadas que consumiram dieta hiperlipídica apresentaram maior concentração plasmática de leptina quando comparadas com os animais sham-operados e alimentados com dieta controle. A ovariectomia aumentou a concentração plasmática de leptina somente nos animais que receberam dieta controle (Fig. 10).

A terapia de reposição hormonal com 17-beta-estradiol reduziu a concentração plasmática de leptina nos animais ovariectomizados alimentados com dieta controle quando comparados aos animais que receberam veículo (Fig. 10). No entanto, no grupo que recebeu dieta hiperlipídica, a terapia de reposição hormonal com 17-beta-estradiol não alterou a concentração plasmática de leptina. É importante salientar que na análise estatística realizada, encontramos uma interação entre o fator dieta e o fator hormonal correspondente a 31% da variação total observada, enquanto que o fator hormonal isolado respondeu por 35% e o fator dieta por 16% da variação total. Isso mostra que a ausência de estradiol no grupo ovariectomizado, bem como a reposição do estradiol no grupo tratado foram os maiores responsáveis pela variação da leptina plasmática.

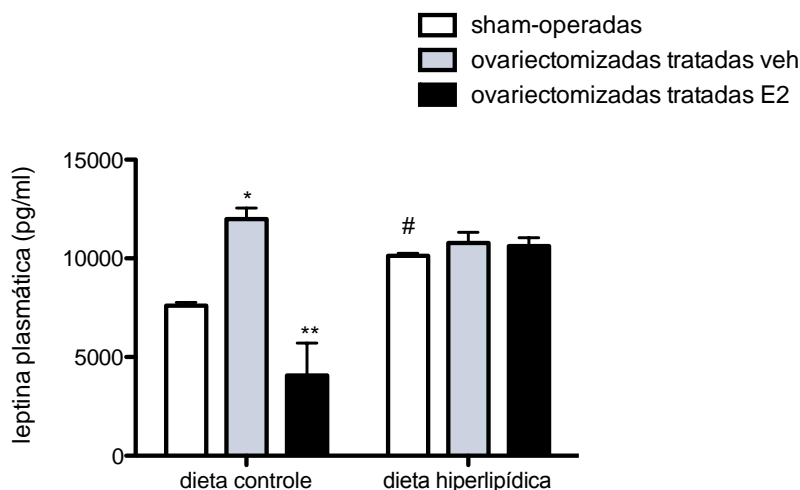


Figura 10. Concentração plasmática de leptina de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias. * $p < 0,05$ vs sham-operadas, ** $p < 0,05$ vs ovariectomizadas tratadas com veículo, # $p < 0,05$ vs sham-operadas e alimentadas com dieta controle.

A análise da expressão gênica de leptina, nos depósitos de tecidos adiposos, mostrou que no tecido adiposo mesentérico, as ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta controle apresentaram aumento da expressão gênica de leptina e a terapia de reposição hormonal foi capaz de reduzir a expressão gênica de leptina somente neste grupo (Fig. 11). É importante considerar que a interação entre o fator dieta e o fator hormonal correspondeu a 47% da variação total observada, enquanto que o efeito isolado do fator hormonal foi responsável por 13% dessa variação.

Ressalta-se que a expressão de RNAm da leptina no grupo alimentado com dieta hiperlipídica não sofreu variação nem em decorrência da ovariectomia nem em decorrência do tratamento com 17β - estradiol.

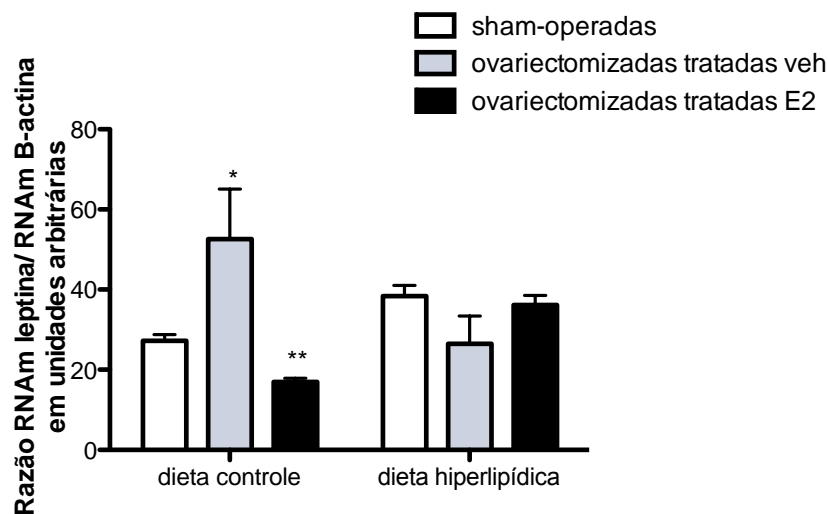


Figura 11. Expressão gênica de leptina em tecido adiposo mesentérico de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias.* $p < 0,05$ vs sham-operadas, ** $p < 0,05$ vs ovariectomizadas tratadas com veículo.

A análise da expressão gênica de leptina no depósito parametrial mostrou que a terapia de reposição hormonal com 17β - estradiol somente apresentou efeito redutor sobre a expressão gênica de leptina nos animais alimentados com dieta controle, o que confirma mais uma vez a interferência da dieta na ação estrogênica (Fig. 12).

O efeito da dieta correspondeu a 29% da variação total da expressão gênica e a interação entre o fator dieta e o fator hormonal correspondeu a 15%. Todavia, não houve contribuição significativa do fator hormonal isoladamente.

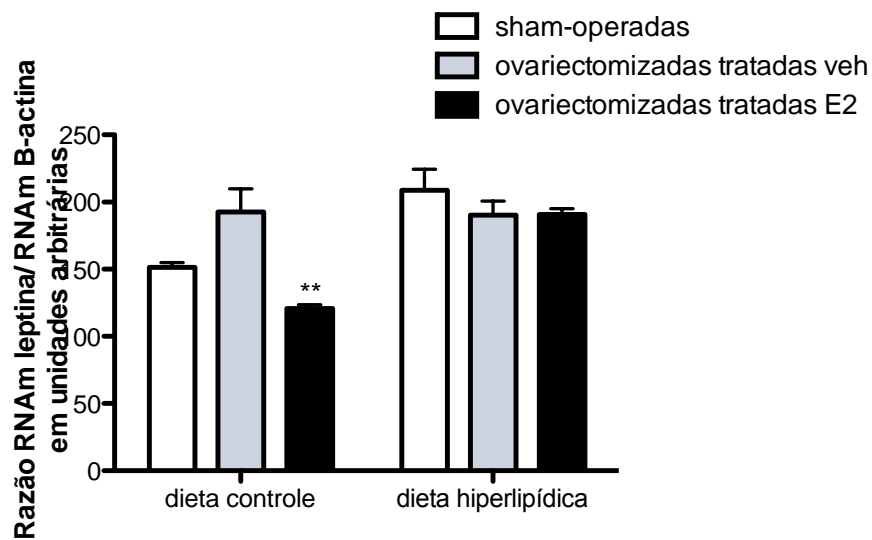


Figura 12. Expressão gênica de leptina em tecido adiposo parametrial de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias. ** $p < 0,05$ vs ovariectomizadas tratadas com veículo.

A expressão gênica da leptina no tecido adiposo retroperitoneal não apresentou alteração em relação a nenhum grupo experimental (Fig.13).

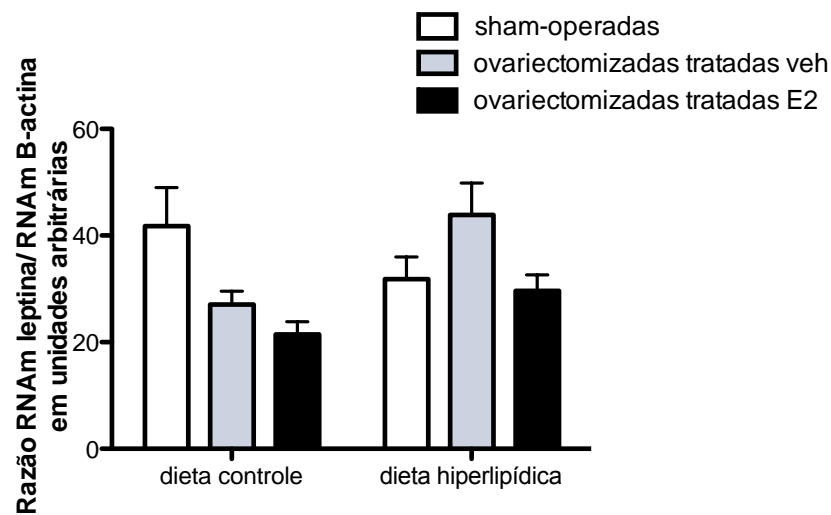


Figura 13. Expressão gênica de leptina em tecido adiposo retroperitoneal de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias.

5.2.7 Liberação e síntese atrial de ANP

Ambos, ovariectomia e tratamento com estradiol, alteraram a concentração plasmática de ANP. A ovariectomia reduziu em 54% a concentração plasmática de ANP no grupo que recebeu dieta controle e em 33% no grupo que recebeu dieta rica em lipídios, quando comparados aos respectivos animais sham-operados (Fig. 14). Já o tratamento hormonal foi capaz de aumentar a concentração plasmática de ANP nos animais alimentados com dieta controle. Esse aumento igualou estatisticamente os níveis dos animais tratados aos animais sham-operados. No entanto, o tratamento com estradiol não alterou os níveis plasmáticos de ANP nas ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta hiperlipídica.

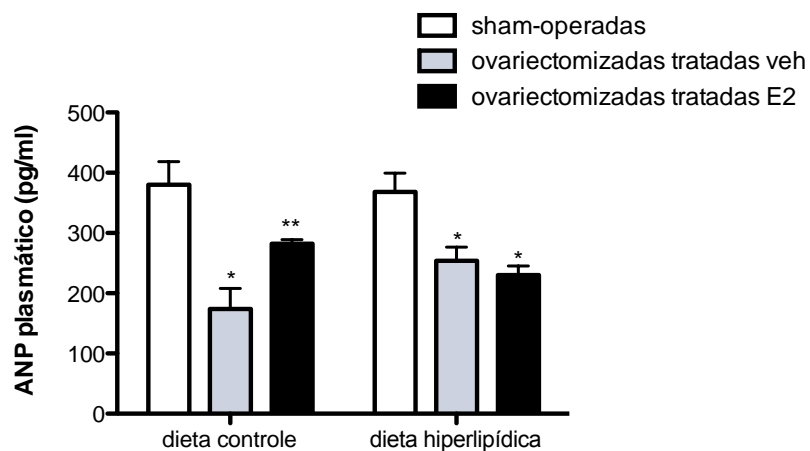


Figura 14. Concentração plasmática de ANP de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias.* $p < 0,05$ vs sham-operadas, ** $p < 0,05$ vs ovariectomizadas tratadas com veículo.

Em relação à síntese atrial de ANP, nossos resultados mostram que a ovariectomia reduziu a expressão gênica de ANP em átrio direito, independentemente do tipo de dieta oferecida. Em contrapartida, a terapia de reposição hormonal somente foi capaz de elevar a expressão gênica no grupo que recebeu dieta controle (Fig. 15). A análise de variância demonstra que o fator hormonal é o que mais contribuiu para a variação da expressão gênica de ANP (oito vezes mais que o fator dieta). É importante salientar que esse resultado é similar ao encontrado em relação a liberação de ANP.

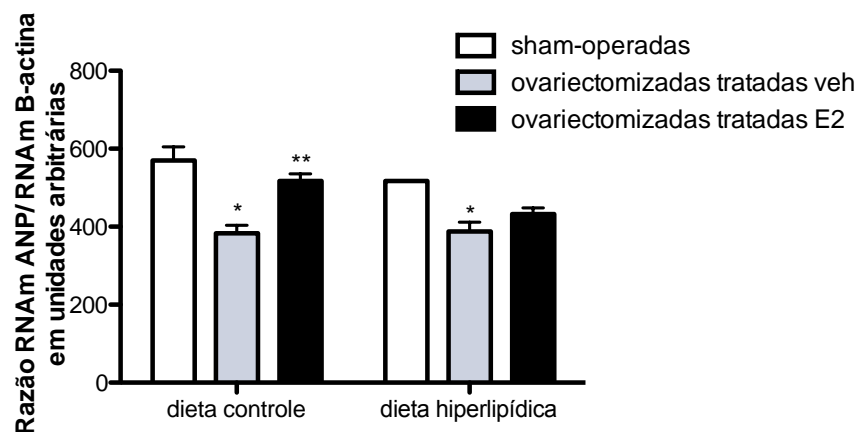


Figura 15. Expressão gênica de ANP no átrio direito de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas e alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias. * $p < 0,05$ vs sham-operadas, ** $p < 0,05$ vs ovariectomizadas com veículo.

Também em átrio esquerdo, a terapia de reposição hormonal somente foi capaz de aumentar a expressão no grupo que recebeu dieta controle, todavia o grupo ovariectomizado que recebeu dieta controle também apresentou aumento da expressão gênica de ANP. O efeito do fator hormonal sobre a variação da expressão gênica correspondeu a 48% e 21% da variância observada pode ser explicada pela interação entre ambos os fatores, dieta e hormônio. A dieta isoladamente não explica a variação da expressão gênica (Fig. 16).

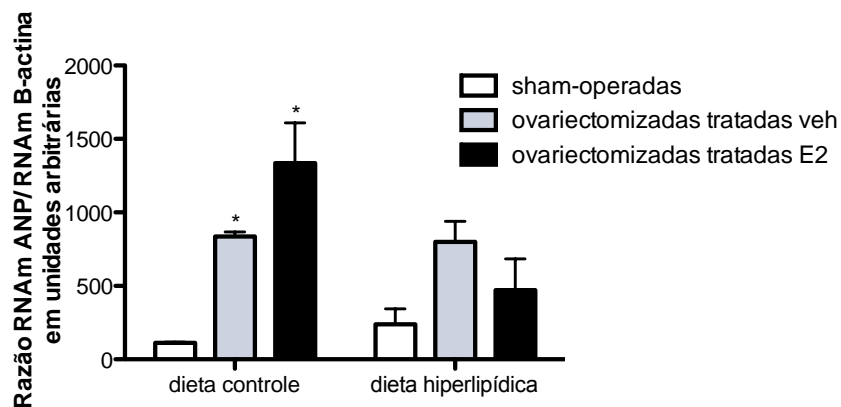


Figura 16. Expressão de RNAm de ANP no átrio esquerdo de SHR ovariectomizadas ou sham-operadas alimentadas com dieta hiperlipídica ou controle por seis meses e tratadas com a terapia de reposição hormonal com estradiol (E2) ou veículo (veh) por 15 dias. * $p < 0,05$ vs sham-operadas.

5.2.8 Correlação entre as concentrações plasmáticas de ANP, estradiol e leptina

Nós encontramos correlações entre ANP, leptina e estradiol somente nos animais alimentados com dieta controle. Desse modo, nesse grupo foi observada correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de ANP e estradiol. Da mesma forma, somente no grupo alimentado com dieta controle encontramos correlação inversa entre as concentrações plasmáticas de leptina e estradiol, bem como entre ANP plasmático e leptina plasmática. Os dados das correlações de Pearson encontram-se na tabela B.

Tabela B: Correlações entre as concentrações plasmáticas de ANP, estradiol e leptina em SHR tratadas durante 15 dias com estradiol ou veículo e alimentadas durante 24 semanas com dieta controle ou dieta hiperlipídica, calculadas utilizando o coeficiente de Pearson (r). Considerados significativos os valores de $p < 0,05$ (*).

Variáveis	Dieta controle	Dieta hiperlipídica
ANP plasmático vs estradiol plasmático	p= 0,0037* r= 0,8201	p= 0,8897 (ns) r= 0,05897
ANP plasmático vs leptina plasmática	p= 0,0449* r= -0,6775	p= 0,6124 (ns) r= -0,1965
Leptina plasmática vs estradiol plasmático	p= 0,0493* r= -0,6128	p= 0,9285(ns) r= -0,03815

ns = resultado não significativo

6. Discussão

Nossos resultados demonstraram que tanto a ovariectomia quanto a dieta hiperlipídica promoveram: 1) aumento de peso corporal, 2) aumento de pressão arterial sistólica e, 3) aumento da concentração plasmática de leptina em ratas espontaneamente hipertensas. Também foi possível observar que a ovariectomia foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de ANP e que a dieta hiperlipídica, isoladamente, não alterou os níveis deste hormônio. Ressalta-se que os animais alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram redução do consumo de ração o que não promoveu diferença no consumo calórico entre os grupos alimentados com essa dieta quando comparados com os animais alimentados com dieta controle.

Também observamos que o tratamento com estradiol foi capaz de promover: 1) aumento da síntese atrial e liberação de ANP, 2) diminuição da síntese e liberação de leptina, 3) redução da pressão arterial sistólica e, 4) redução do peso corporal em SHR ovariectomizadas. Observamos ainda que o aumento do ANP plasmático foi inversamente correlacionado com a liberação de leptina. Ressalta-se que essas alterações ocorreram somente nos animais alimentados com dieta controle. A dieta hiperlipídica parece ter bloqueado os efeitos do estradiol.

Em relação à alteração de peso corporal e de tecido adiposo observada nos animais ovariectomizados, sabemos que o ganho de peso corpóreo induzido pela redução de níveis de estrógeno tem sido relatado em outros estudos, tanto em ratas e camundongas ovariectomizadas (RECKELHOFF & FORTEPIANI, 2004; JAZBUTYTE et al., 2008; XU et al., 2008; PERCEGONI et al., 2009; PANTALEÃO et al., 2010; YEPURU et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; STUBBINS et al., 2011; STUBBINS et al., 2012), quanto em SHR idosas (RECKELHOFF & FORTEPIANI, 2004). Alguns dos mecanismos que podem estar envolvidos nesse ganho de peso corporal durante o período da pós-menopausa ou de deficiência de estrógeno são a redução do gasto energético e o acúmulo de tecido adiposo visceral (LOVEJOY et al., 2008). Esse último pode ocorrer por meio da redução da lipólise e do aumento da atividade da enzima lipase lipoprotéica do tecido adiposo, com aumento da adiposidade geral e redistribuição do tecido adiposo para região abdominal (FERRARA et al., 2002).

Essa alteração do peso corporal das SHR ovariectomizadas pode também estar associada com modulação neural induzida por estrógeno, uma vez que a produção hipotalâmica do neuropeptídeo Y e do hormônio concentrador de melanócito, ambos peptídeos orexígenos, está aumentada na deficiência de estrógeno (AINSLIE, et al., 2001; SANTOLLO & ECKEL, 2008). Também pode estar associada com inibição dos peptídeos anorexígenos, tais como o hormônio estimulante de alfa-melanócito e o hormônio liberador de corticotropina (CHEN et al., 2008).

Em consonância com esse resultado, a terapia a de reposição estrogênica foi capaz de reduzir o peso corporal dos animais alimentados com dieta controle. Estudos recentes têm relatado redução de peso corporal após terapia de reposição hormonal (JAZBUTYTE et al. 2006; JAZBUTYTE et al. 2008, PANTALEÃO et al., 2010). Esse efeito redutor da terapia estrogênica sobre o peso corporal pode ocorrer de forma direta alterando o metabolismo lipídico, bem como por ação indireta em regiões cerebrais, incluindo hipotálamo ventromedial e núcleo paraventricular, por meio de regulação da sinalização da saciedade (KRISTENSEN et al., 1999).

Além desse papel já bem estabelecido do efeito do estradiol sobre a redução de peso, recentemente, estudos têm apontado para o papel crucial dos receptores de estrógeno na modulação de nutrientes e do gasto energético, por meio da regulação da expressão de neuropeptídeos hiperfágicos e anoréxicos no hipotálamo. Esses efeitos podem ocorrer através de ações genômicas do receptor nuclear para estrógeno, bem como via receptores de membrana. Além disso, acredita-se que os receptores para estrógeno do tipo alfa poderiam interferir com a sinalização da leptina e da insulina (GAO & HORVATH, 2008), o que também poderia influenciar o consumo alimentar e/ou peso corporal.

É importante ressaltar que o grupo tratado e alimentado com dieta hiperlipídica não apresentou redução de peso corpóreo após terapia de reposição hormonal. A baixa concentração de ANP plasmático encontrada neste grupo pode também ser uma das justificativas para a não redução de peso corporal. Sabe-se que o sistema de peptídeos natriuréticos é capaz de desempenhar um papel lipolítico com possível interferência na patofisiologia da obesidade, por meio de sua interação com receptores específicos através da ativação da enzima guanilil ciclase

e consequente produção de GMPc (SEGENÈS et al., 2002). No entanto, esse efeito só foi observado em adipócitos de primatas (SEGENÈS et al., 2002) e adipócitos humanos (SEGENÈS et al., 2000; SEGENÈS et al., 2002; SEGENÈS et al., 2003; MORO et al., 2004). Recentemente, foi descrito, por Yepuru et al. (2010) que o aumento de peso induzido por dieta rica em lipídios foi atenuado por ligantes seletivos para ER- β , sendo este, considerado um potencial alvo terapêutico no combate à obesidade. Associado a isso, Heshka & Jones (2001) já haviam relatado que uma dieta rica em lipídios poderia alterar os ácidos graxos componentes de membrana e, por sua vez, afetar a fluidez da mesma, o que levaria a um prejuízo estrutural e/ou funcional de qualquer complexo de receptores associados à membrana. Sendo assim, embasado nessas informações, poderíamos inferir que a dieta rica em lipídios afetou a ação do estradiol em seus receptores do tipo beta e, essa interferência pode ter sido a responsável pela não redução de peso corporal observada no grupo alimentado com dieta hiperlipídica.

Nossos resultados também demonstraram que a dieta hiperlipídica induziu aumento de peso corporal no sexto mês e também aumento de peso dos depósitos do tecido adiposo parametrial e retroperitoneal nos animais sham-operados, evidenciando um efeito isolado da dieta hiperlipídica no ganho de peso. Estudos com ratos já demonstraram o efeito da dieta hiperlipídica sobre o aumento de peso corporal total (CARROL et al., 1996; BOUSTANY et al., 2004; CAO et al., 2011a; STUBBINS et al., 2012) ou aumento de tecido adiposo branco (FAM, et al., 2007). Uma das explicações para esse resultado pode ser a diferença no conteúdo de sebo bovino entre as dietas utilizadas em nosso protocolo experimental. Como descrito na metodologia, somente a dieta hiperlipídica possui sebo bovino em sua composição (10%). É sabido que esse componente fornece maior aporte de gorduras saturadas, que por sua vez, tem estreita relação com o surgimento de obesidade e/ou sobrepeso (BUETTNER et al., 2007) bem como de doenças cardiovasculares (JAKOBSEN et al., 2009). Nós observamos uma redução no consumo de ração, nos grupos alimentados com dieta hiperlipídica, que pode ter ocorrido também, devido ao fato de uma dieta rica em lipídios ocasionar saciedade e/ou devido à maior concentração plasmática de leptina apresentada por esses mesmos grupos. Essa redução de consumo, por sua vez, pode também explicar o maior impacto que a ovariectomia teve sobre o aumento de peso corpóreo, já a partir

do segundo mês, uma vez que o efeito da dieta sobre o peso corporal somente foi observado no sexto mês. Esse atraso pode ser devido também ao aumento do gasto energético em resposta ao consumo crônico de dieta hiperlipídica já observado em animais SHR (HOJNA et al., 2011). Segundo esse estudo esse fato poderia está associado com o surgimento de adipócitos do tipo marrom no tecido adiposo branco.

Em relação a alterações na pressão arterial, observamos que a dieta hiperlipídica, de maneira isolada, foi capaz de elevar a pressão arterial sistólica no sexto mês de dieta. Outros estudos também já observaram aumento de pressão arterial sistólica decorrente de consumo de dieta rica em lipídios em ratos (CARROL et al., 1996; BOUSTANY et al., 2004; CAO et al., 2011a). Também observamos que ambos, a deficiência de estrógeno e a sua reposição alteraram a pressão arterial. Observamos que a ovariectomia elevou a pressão arterial a partir do segundo mês após o procedimento cirúrgico. Da mesma forma, outros trabalhos relataram elevação de pressão arterial em ratas ovariectomizadas (SONG et al., 2005; ANDRADE et al., 2011), bem como em mulheres no período pós-menopausal (STAESSEN et al., 1989; PORTALUPPI et al., 1997; CHAPPELL; WESTWOOD & YAMALEYEVA, 2008; XU et al., 2008). Assim, a redução dos níveis de estrógeno decorrente da menopausa parece aumentar o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o que torna as mulheres na pós-menopausa mais propensas a desenvolver hipertensão quando comparadas a mulheres na pré-menopausa (LUOTO et al., 1995; MENDELSON & KARAS et al., 1999; DUBEY et al., 2002; SONG et al., 2005).

É importante ressaltar que a pressão arterial sistólica dos animais ovariectomizados alimentados com dieta controle aumentou a partir do segundo mês de dieta, enquanto que o grupo ovariectomizado alimentado com dieta hiperlipídica apresentou elevação somente a partir do sexto mês. Este resultado pode ser explicado em parte devido à concentração plasmática de leptina ter sido mais elevada no grupo alimentado com dieta controle, uma vez que um estudo recente mostrou uma correlação positiva entre pressão arterial e concentração plasmática de leptina em mulheres hipertensas independente do grau de obesidade e do status menopausal (KHOKHAR; SIDHU & KAUR, 2010).

A elevação de pressão arterial observada em nosso estudo foi acompanhada por redução da concentração plasmática de ANP que parece ser resultante, pelo menos em parte, da redução em sua síntese, como ficou demonstrado pela redução da expressão de seu RNAm no átrio direito. Elevação de pressão arterial também foi encontrada em ratas ovariectomizadas em decorrência de diminuição da concentração plasmática de ANP no estudo de Xu et al. (2008). É importante ressaltar que nossos animais ovariectomizados apresentaram redução de fluxo urinário (dados não apresentados), o que provavelmente também contribuiu para essa elevação de pressão arterial.

Nós também observamos redução da pressão arterial sistólica após o tratamento com 17-beta estradiol. Diminuição de pressão arterial induzida por estrógeno tem sido encontrada em diversos estudos com ratas (HOEG et al., 1977; HASSANGER 1987; DANTAS et al., 1999; SHARKEY et al., 1999; HERNANDEZ et al., 2000; SASAKI et al., 2000; BELO et al., 2004; XU et al., 2008), com SHR (HOEG et al., 1977; WILLIAMS et al., 1988) e com mulheres na pós-menopausa e/ou histerectomizadas (MEERSMAN et al., 1998; CAGNACCI et al., 1999; SEELY et al., 1999; WEST et al., 2001; KARJALAINEN et al., 2004). Em nosso estudo a redução de pressão arterial observada após a terapia de reposição hormonal foi acompanhada e altamente correlacionada com o aumento da concentração plasmática de ANP, o que sugere que o ANP pode ser um dos mediadores desse efeito. Aumento de concentração plasmática de ANP após terapia com 17-beta-estradiol também já foi descrito em ratas (BELO et al., 2004; XU et al., 2008).

O efeito do estradiol sobre a função cardiovascular, sobretudo na redução da pressão arterial, pode ocorrer de diversas formas dentre as quais se destacam: ação direta nos vasos sanguíneos (ZHANG et al., 1994; COLLINS, 1996), inibição do fluxo simpático, aumento da sensibilidade barorreflexa e tônus eferente simpático (HE et al., 1998; SALEH & CONNELL, 1999; SALEH et al., 2000), elevação da produção de óxido nítrico (MUGGE et al., 1993; BROSNIHAN et al., 1994; HUANG et al., 1997) bem como redução dos níveis de endotelina (JIANG et al., 1992).

É importante ressaltar que somente nos animais alimentados com dieta controle e não nos animais alimentados com dieta hiperlipídica, o tratamento com 17-beta-estradiol induziu redução de pressão arterial sistólica associada com

elevação nos níveis plasmáticos de ANP. Interferência de dieta sobre o efeito do ANP na pressão arterial já foi encontrada no estudo de Dessì-Fulgheri; Sarzani; Rappelli (1998), no qual somente no grupo com restrição calórica, a infusão de ANP promoveu diurese e natriurese e conseqüentemente redução da pressão arterial.

O efeito do ANP sobre a pressão arterial pode ser explicado por algumas ações já bem estabelecidas, dentre as quais destacamos: ação natriurética e diurética que culminam com redução de volume sanguíneo; ação vasodilatadora, por meio da inibição da produção de peptídeos vasoconstritores; bem como inibição do fluxo simpático e da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona que, juntos levam a uma conseqüente redução da pressão (BRENNER et al., 1990). Além desses efeitos já bem estabelecidos, o ANP pode ter exercido seu efeito hipotensor através da ativação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS) (COSTA et al., 2000, 2004) ou, interagindo com o NPr-A e/ou NPr-B em ventrículo, rim e artéria e, até mesmo via NPr-C, a princípio descrito somente como um receptor de clearance, mas que pode mediar esta ativação da NOS pelo ANP, em átrio cardíaco (COSTA et al., 2000; ELES GARAY et al., 2008).

Em nosso estudo, a ovariectomia reduziu a expressão gênica de ANP no átrio direito e a terapia de reposição hormonal elevou sua expressão nos átrios direito e esquerdo, nos grupos que receberam dieta controle. Como a concentração plasmática de ANP depende de sua taxa de síntese e/ou liberação, esse resultado pode justificar em parte, a redução do ANP plasmático observado nos grupos ovariectomizados, bem como o aumento de sua concentração nos grupos tratados com estradiol. São escassos os dados na literatura que abordam a relação entre estrógeno e ANP. Até o momento já foi descrito redução de expressão gênica de ANP em ambos os átrios de ratas ovariectomizadas (BELO; SAIRAM & REIS, 2008) influência dos hormônios esteróides sobre o sistema e peptídeos natriuréticos em humanos (DeBOLD et al., 1999; MAFFEI et al., 2001) e, mais especificamente, já foi encontrado efeito estimulatório de estrógenos sobre a secreção de ANP (DENG et al., 1993), sua concentração plasmática (ZHANG; NOVAK & KAUFMAN, 1995) e sua expressão gênica atrial (HONG et al, 1992; JANKOWSKI et al, 2001; BELO et al., 2004). Esses dados evidenciam a atuação do estrógeno no sistema de peptídeos natriuréticos cardíacos por meio do estímulo à liberação e produção atrial de ANP.

Nossos animais ovariectomizados e alimentados com dieta controle apresentaram aumento da concentração plasmática de leptina, o que pode ter sido secundário ao ganho de peso corporal observado neste grupo. Aumento da concentração de leptina plasmática também foi encontrado em ratas ovariectomizadas (NG; YONG & CHAKRABORTY, 2010; PANTALEÃO et al., 2010; STUBBINS et al., 2011) e em mulheres na pós-menopausa (AHIMA & FLIER, 2000a). Contudo, é importante salientar que, embora o grupo ovariectomizado alimentado com dieta controle tenha apresentado este aumento de concentração plasmática de leptina, esse grupo não apresentou redução no consumo de ração, quando comparado aos demais grupos. Essa aparente resistência à ação da leptina tem sido relacionada ao desenvolvimento de obesidade (WANG et al., 2005). Isso também pode ser justificado pelos baixos níveis de estrógeno no grupo ovariectomizado, uma vez que existem evidências que demonstram que a ação da leptina é dependente da presença dos estrógenos. No estudo de Pantaleão et al. (2010), dos animais com hiperleptinemia, somente os animais tratados com estrógeno apresentaram diminuição da ingestão alimentar, o que reforça a hipótese de que o estradiol é requerido para o efeito completo da leptina tanto no controle do consumo alimentar quanto no gasto energético (SANCHEZ- MATEOS et al., 2007). Essa questão pode ser reforçada devido ao fato de que os receptores para ambos os hormônios estão co-localizados em três regiões hipotalâmicas: área pré-óptica, núcleo arqueado e núcleo ventro-medial, ressaltando-se que essa última está claramente envolvida na regulação da saciedade (DIANO et al., 1998).

Também em nosso estudo, o grupo sham-operado que consumiu dieta hiperlipídica apresentou maior concentração plasmática de leptina, quando comparado ao grupo sham-operado alimentado com dieta controle. Elevação da leptina plasmática decorrente do consumo de dieta hiperlipídica já foi observada em ratas Wistar (KINIGHT et al. 2008; PRIEGO et al., 2009; YEPURU et al., 2010) e em SHR (KINIGHT et al., 2008). É relevante ressaltar que esse mesmo grupo sham-operado alimentado com dieta hiperlipídica apresentou aumento dos depósitos de tecido adiposo parametrial e retroperitoneal, o que pode, ao menos em parte, explicar o aumento de leptina plasmática no mesmo, uma vez que sua produção é proporcional à massa de tecido adiposo.

A elevação da concentração de estradiol, após a terapia de reposição, foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de leptina e também a sua expressão gênica nos depósitos de tecido adiposo mesentérico e parametrial, nos grupos alimentados com dieta controle. Esses resultados evidenciam, novamente, a influência dos hormônios esteróides e da dieta hiperlipídica sobre a concentração plasmática de leptina, bem como de sua expressão gênica.

No entanto, existem controvérsias em relação ao efeito do estradiol sobre a liberação da leptina (AUGOULEA et al., 2005). Alguns estudos apontam para uma relação direta do estradiol aumentando a liberação da leptina. De fato, os níveis de leptina são maiores em mulheres quando comparados aos homens, mesmo após correção por diferenças no conteúdo de tecido adiposo ou índice de massa corporal (ROSENBAUM et al., 1996). Alguns estudos também já relataram correlação dos níveis de leptina com as fases dos ciclos menstruais em mulheres (HARDIE et al., 1997). Estudos in vitro demonstraram aumento de secreção de leptina em tecido adiposo subcutâneo e parametrial de ratas fêmeas após administração de 17β -estradiol e aumento da expressão de RNAm do gene *ob*, gene produtor da leptina (MACHINAL et al., 1999). Também já foi demonstrada ação estimulatória do estradiol sobre a expressão de leptina em células trofoblásticas humanas (GAMBINO et al., 2010). Todavia, outros estudos mostram resultados contrários a estes, como os nossos dados que demonstram uma marcante correlação inversa entre as concentrações plasmáticas de estradiol e leptina que ficou evidenciada por meio do aumento de sua concentração em decorrência da ovariectomia e redução dos seus níveis plasmáticos após a terapia estrogênica. De acordo com esse resultado, outros trabalhos recentes também demonstraram que a ovariectomia foi capaz de causar hiperleptinemia em roedores (MATYSKOVÁ et al., 2010; NG, YONG & CHAKRABORTY, 2010; PANTALEÃO et al., 2010; STUBBINS et al., 2011) e em mulheres na pós-menopausa (AHIMA & FLIER, 2000a). Também foi demonstrado o papel inibitório do estradiol sobre a concentração plasmática de leptina em ratas Wistar (WEIGT et al., 2011) e, em mulheres no período pós-menopausal que receberam 17β -estradiol (Di Carlo et al., 2007). Percebe-se, portanto, que ainda são necessários mais estudos para elucidar a influência do estradiol sobre a liberação e síntese de leptina.

Em nosso estudo, observamos que o aumento do ANP plasmático foi inversamente correlacionado com a liberação de leptina. Há poucos dados na literatura que demonstrem correlação entre esses dois hormônios. Até o momento já foi demonstrado que o ANP foi capaz de inibir a liberação de leptina em adipócitos humanos (FAIN et al., 2003; MORO et al. 2007). Recentemente foi descrito que a administração de leptina também foi capaz de reduzir a concentração plasmática do ANP bem como a expressão de RNAm de ANP em átrios indiretamente via óxido nítrico (YUAN et al., 2010). Entretanto, um estudo de Mascareno et al. (2009) demonstrou que a leptina possui um papel estimulatório sobre a modulação da atividade transcricional do promotor do gene ANP por meio da ativação de um dos membros do fatores nuclear ativados por célula T, o NFATc4, pertencente à família de fatores transcricionais nos cardiomiócitos. O que demonstra que a relação entre esses dois hormônios também não está esclarecida.

Por fim, ressalta-se que as alterações no peso corporal e na pressão arterial, induzidas pelo tratamento com estradiol, ocorreram somente nos animais alimentados com dieta controle. Recentemente, Cao et al. (2011b) relataram que o consumo de dieta rica em lipídios é o maior fator de risco para o desenvolvimento de disfunções cardiovascular e/ou metabólicas, incluindo obesidade e hipertensão. Como citado anteriormente, Heshka & Jones (2001) também observaram que uma dieta rica em gordura pode ser capaz de alterar os ácidos graxos componentes de membrana, mais precisamente a razão entre gorduras saturadas e insaturadas, alterando assim a fluidez da membrana, o que possivelmente poderia levar a um prejuízo estrutural e funcional de qualquer complexo de receptores associados à membrana. Nessa perspectiva, tendo em vista que em nosso estudo a dieta hiperlipídica parece ter bloqueado os efeitos produzidos pelo estradiol, uma possível hipótese explicativa seria o a alteração da interação do estrógeno com seus receptores de membrana.

Outra possibilidade seria o acúmulo de gordura nos vasos sanguíneos ocasionado pela dieta rica em lipídios. Esse acúmulo de gordura, por sua vez, favoreceria o desenvolvimento de aterosclerose e disfunção endotelial, o que poderia afetar a disposição vascular dos receptores de estrógeno, ou mesmo funcionar como barreira mecânica, prejudicando a ação do estradiol com seus receptores específicos. Estudos experimentais já demonstraram alterações

endoteliais e vasculares em animais alimentados com dieta hiperlipídica. Disfunção endotelial em animais SRH machos já foi observada a partir da terceira semana de consumo de dieta hiperlipídica no estudo de Knight et al. (2008), bem como, um recente estudo de Cao et al. (2011a) descreveu aumento dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade em SHR alimentadas com dieta hiperlipídica. Javeshghani et al. (2009) também relataram a ocorrência de dano vascular via estresse oxidativo, potencializado por quatro meses de consumo de dieta rica em lipídios durante estados de deficiência de estrógeno.

Uma nova hipótese é atualmente utilizada para explicar as diferenças nos efeitos da terapia de reposição hormonal entre as mulheres que iniciam a reposição mais tardiamente e as que a iniciam logo após a menopausa. De acordo com a mesma, a terapia hormonal pode apresentar efeitos benéficos se iniciada mais precocemente. Todavia, em mulheres com vários anos de menopausa estabelecida, ou seja, que apresentam longo período de hipoestrogenicidade, provavelmente existiria presença de aterosclerose avançada e isso seria prejudicial à ação do estradiol (BARRET-CONNOR, 2007; MANSON & BASSUK, 2007). Além dessa hipótese, foi demonstrado que o estradiol pode apresentar efeitos múltiplos e opostos, a depender da presença ou ausência de doença aterosclerótica prévia. Assim, a capacidade do estradiol de retardar os estágios iniciais de aterosclerose, por meio de efeitos benéficos na função endotelial e perfil lipídico, fica impactada na presença de lesões avançadas. Neste caso, o efeito do estradiol se torna inverso, a ponto de favorecer eventos coronários agudos através de mecanismos pró-coagulantes e inflamatórios (ROSSOUW, et al., 2007; MANSON & BASSUK, 2007).

Embasando-se nessas informações, a dieta hiperlipídica utilizada em nosso estudo pode ter sido responsável por gerar lesões nos vasos sanguíneos que, por sua vez, podem ter contribuído para prejudicar a ação do estradiol no grupo alimentado com a dieta rica em lipídios. Além dessa possibilidade, outro estudo recente demonstrou que a ovariectomia em ratas alimentadas com dieta rica em lipídios parece afetar a expressão de RNAm para ER- α em tecido adiposo (GORRES et al., 2011), o que poderia também justificar alguma diferença no efeito do estradiol sobre a redução de peso e pressão arterial observada entre as ratas alimentadas com dieta hiperlipídica, quando comparadas as ratas alimentadas com dieta controle.

Até onde vai nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que demonstra relação entre estrógeno, ANP e leptina, sendo o estradiol capaz de aumentar a síntese e a liberação de ANP e diminuir a síntese e a liberação de leptina. A utilização de SHR com obesidade induzida por dieta configura-se em uma importante contribuição para explicar de que forma leptina, estradiol e ANP podem interagir entre si e conseqüentemente influenciar o desenvolvimento da obesidade associada à hipertensão em um quadro de ausência de estradiol, bem como demonstra o grande impacto da dieta hiperlipídica sobre as ações do estradiol no sistema cardiovascular e endócrino.

Em suma, a partir de nossos dados podemos inferir que o ANP é um dos mecanismos pelo qual o estradiol reduz a pressão arterial em SHR, e este, por sua vez, mostra-se capaz de modular o conteúdo plasmático de leptina em animais alimentados com dieta controle. O impacto que a dieta hiperlipídica apresentou sobre a eficácia da terapia hormonal ratifica o potencial fator de risco que esse tipo de dieta representa para o desenvolvimento de disfunções, incluindo obesidade e hipertensão.

7. Conclusão

Nossos resultados evidenciaram que tanto a redução dos níveis endógenos de estrógeno, devido à ovariectomia, quanto à dieta hiperlipídica foram capazes de promover aumento do peso corporal, da pressão arterial sistólica e da concentração plasmática de leptina em ratas espontaneamente hipertensas. Também foi possível observar que a ovariectomia foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de ANP e que a dieta hiperlipídica, isoladamente, não alterou os níveis desse hormônio.

O tratamento com estradiol esteve associado com um aumento da síntese atrial e liberação de ANP e com uma diminuição da síntese e liberação de leptina em SHR ovariectomizadas. Além disso, o aumento do ANP plasmático foi inversamente correlacionado com a liberação de leptina. Essas alterações hormonais podem estar envolvidas na redução da pressão arterial sistólica e do peso corporal, apresentados pelos animais alimentados com dieta controle após o tratamento hormonal. No entanto, a dieta hiperlipídica bloqueou os efeitos produzidos pelo estradiol demonstrando seu efeito deletério sobre o sistema cardiovascular e endócrino.

REFERÊNCIAS

- AHIMA, R.S.; SAPER, C.B.; FLIER, J.S.; ELMQUIST, J.K. Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Front Neuroendocrinol.**, v. 21, p. 263-307, 2001.
- AHIMA, R.S. & FLIER, J.S. Leptin. **Annu Rev Physiol.**, v. 62, p. 413-437, 2000a.
- AHIMA R.S. & FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab.**, v.11, p.327–332, 2000b.
- AINSLIE, D.A., MORRIS, M.J.; WITTERT, G.; TURNBULL, H.; PROIETTO, J.; THORBURN, A.W. Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. **Int J Obes Relat Metab Disord.**, v. 25, p.1680-1688, 2001.
- ALEXANDER, C.; COCHRAN, C.J.; GALLICCHIO, L.; MILLER, S.R.; FLAWS, J.A.; ZACUR, H. Serum leptin levels, hormone levels, and hot flashes in midlife women. **Fertil Steril.**, v. 94, n.3, p.1037-1043, 2009.
- ANDRADE, E.N; GONÇALVES, G. K. N.; OLIVEIRA , T. H. C.; SANTOS, C. S.; SOUZA, C. L. S.; FIRMES, L. B.; MAGALHÃES, A. C. M.; SOARES, T. J.; REIS, A. M.; BELO, N. O. Natriuretic peptide system: A link between fat mass and cardiac hypertrophy and hypertension in fat-fed female rats. **Regulatory Peptides**, p.149-155, 2011.
- ANEJA, A; EL-ATAT, F.; McF ARLANE, S. I. ; OWERS, J. R. Hypertension and obesity. **The endocrine Society**, p. 169-205, 2004.
- AUGOULEA, A.; MASTORAKOS, G.; LAMBRINOUDAKI, I.; CHRISTODOULAKOS, G. CREATSAS, G. Role of postmenopausal hormone replacement therapy on body fat gain and leptin levels. **Gynecol. Endocrinol.**, v. 20, n.4, p. 227-35, 2005.
- AYRES, J.E.M. Prevalência da hipertensão arterial na cidade de Piracicaba. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 57, p. 33-36, 1991.
- BALLAUFF, A.; ZIEGLER, A.; EMONS, G.; STURM, G.; BLUM, W.F.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Serum leptin and gonadotropin levels in patients with anorexia nervosa during weight gain. **Mol Psychiatry.**, v. 4, p.71-75, 1999.
- BANKS, W. A.; CLEVER, C.M.; FARRELL, C.L. Partial saturation and regional variation in the blood-to-brain transport of leptin in normal weight mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 278, p.E1158-E1165, 2000.
- BANKS, W. A. & FARRELL, C.L. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 285, p. E10-E15, 2003.
- BARASH, I. A.; CHEUNG, C. C.; WEIGLE, D. S.; REN,H.; KABIGTING,E. B.; KUIJPER,J. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v. 137, p. 3144- 3147, 1996.

- BARNARD, R.J.; ROBERTS, C.K.; VARON, S.M.; BERGER, J.J. Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. **J Appl Physiol.**, v.84, p.1311-1315, 1998.
- BAROUCH, L. A.; BERKOWITZ, D.E.; HARRISON, R.W.; O'DONNELL, C.P.; HARE, J.M. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. **Circulation**, v.108, p. 754-759, 2003.
- BARRETT-CONNOR, E. Hormones and Heart Disease in Women: The Timing Hypothesis. **American Journal of Epidemiology.**, v.166, n.5, p. 506-510, 2007.
- BATES, S.H.; DUNDON, T.A.; SEIFERT, M.; CARLSON, M.; MARATOS-FLIER, E.; MYERS, M.G. JR. LRB-STAT3 signaling is required for the neuroendocrine regulation of energy expenditure by leptin. **Diabetes.**, v.53, p.3067-3073, 2004.
- BELO, N.O.; SAIRAM, M.R.; REIS, A. M. Impairment of the natriuretic peptide system in follitropin receptor knockout mice and reversal by estradiol: implications for obesity-associated hypertension in menopause. **Endocrinology (Philadelphia)**. v. 149, p. 1399-1406, 2008.
- BELO, N.O.; SILVA-BARRA, J.; CARNIO, E.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; GUTKOWSKA, .J; REIS, A.M. Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. **Regulatory Peptides**. v.117, p.53-60, 2004.
- BENTLEY-LEWIS, R.; KORUDA, K.; SEELY, E.W. The metabolic syndrome in women. **Cardiol Rev.**, v.14, p.286-291, 2007.
- BIRKENFELD, A.L.; BOSCHMANN, M.; MORO, C.; ADAMS, F.; HEUSSER, K.; FRANKE, G.; BERLAN, M.; LUFT, F.C.; LAFONTAN, M.; JORDAN, J. Lipid Mobilization with Physiological Atrial Natriuretic Peptide Concentrations in Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n.6, p.3622–28, 2005.
- BOUSTANY, C. M; BHARADWAJ, K.; DAUGHERTY, A.; BROWN, D.R.; RANDALL, D.C.; CASSIS, L.A. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet- induced obesity and hypertension. **American Journal of Physiology**, v.287, n.4, p. R943-R949, 2004.
- BRENNER, B. M.; BALLERMAN, B. J.; GUNNING, M. E.; ZEIDEL, M. L. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. **Physiological Reviews**, v. 70, p.665-699, 1990.
- BROSNIHAN, K. B.; MORIGUCHI, A.; NAKAMOTO, H.; DEAN, R. H.; GATEN, D.; FERRARIO, C.M. Estrogens augment the contribution of nitric oxide to blood pressure in transgenic hypertensive rats expressing the mouse Ren-2 gene. **American Journal Hypertension**, v.7, p. 576-582, 1994.
- BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat Diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v.15, n.4, p. 798-808, 2007.

CAGNACCI, A.; ROVATI, L.; ZANNI, A.; MALMUSI, S.; FACCHINETTI, F.; VOLPE, A. Physiological doses of estradiol decrease nocturnal blood pressure in normotensive postmenopausal women. **American Journal Physiology**, v. 276, n.45, p. H1355-1360, 1999.

CAMPFIELD L.A.; SMITH, F. J.; GUISEZ, Y.; DEVOS, R.; BURN, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science.**, v. 269, p. 546-549, 1995.

CAO, J.; INOUE, K.; SODHI, K.; PURI, N.; PETERSON, S.J.; REZZANI, R.; ABRAHAM, N.G. High-Fat Diet Exacerbates Renal Dysfunction in SHR: Reversal by Induction of HO-1-Adiponectin Axis. **Obesity**, v. 365, 2011a.

CAO, J.; SODHI, K.; PURI, N.; MONU S. R.; REZZANI, R.; ABRAHAM ,N.G et al. High fat diet enhances cardiac abnormalities in SHR rats: Protective role of heme oxygenase-adiponectin axis. **Diabetol Metab Syndr.**, 3: 37, 2011b.

CARO, J.F.; SINHA, M. K.; KOLACZYNSKI, J. K.; ZHANG, P. L.; CONSIDINE, R. V. Leptin: the tale of an obesity gene. **Diabetes**, v. 45, p.1455-1462, 1996.

CARR, D.B.; UTZSCHNEIDER, K.M.; HULL, R.L.; KODAMA, K.; RETZLAFF, B.M.; BRUNZELL, J.D.; SHOFR, J.B.; FISH, B.E.; KNOPP, R.H.; KAHN, S.E. Intra-abdominal fat is a major determinant of the national cholesterol education program adult treatment panel III criteria for metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 5, p.32087–94, 2004.

CARROLL, J.F.; DWYER, T.M.; GRADY, A.W.; REINHART, G.A.; MONTANI, J.P.; COCKRELL, K.; MEYDRECH, E.F.; MIZELLE, H.L. Hypertension, cardiac hypertrophy and neurohumoral activity in a new animal model of obesity. **American Journal Physiology**, v. 271, n.1, p. H373-H378, 1996.

CASABIELL, X.; PIÑEIRO, V.; VEJA, F.; DE LA CRUZ, L.F.; DIÉGUEZ, C.; CASANUEVA, F.F. Leptin, Reproduction and Sex Steroids. **Pituitary**, v. 4, p. 93-99, 2001.

CHAPPELL, M.C.; WESTWOOD, B.M.; YAMALEYEVA, L.M. Differential effects of sex steroids in young and aged female mRen2. Lewis rats: a model of estrogen and saltsensitive hypertension. **Gend Med.**, v. 5(Suppl. A), p.65-75, 2008.

CHEN, X.N.; ZHU, H.; MENG, Q.Y.; ZHOU, J.N. Estrogen receptor-alpha and -beta regulate the human corticotropin-releasing hormone gene through similar pathways. **Brain Res.**, n.1223, p.1-10, 2008.

CHEN, Y.F.; NAFTILAN, A.J.; OPARIL, S. Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats. **Hypertension**, v. 19, p. 456–463, 1992.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by Acid Guanidinium thiocynate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**. v. 162, p. 155-159,1987.

CHUMLEA, W.C.; ROCHE, A.F.; SIERVOGEL, R.M.; KNITTLE, J.L.; WEBB, P. Adipocytes and adiposity in adults. **Am J Clin Nutr.**, v. 34, p. 1798-1803, 1981.

CLERICO, A.; FONTANA, M.; VITTORINI, S.; EMDIN, M. The search for a Pathophysiological Link between Gender, Cardiac Endocrine Function, Body Mass Regulation and Cardiac Mortality: Proposal for a Working Hypothesis. **Clin Chim Acta.**, v.405(1-2), p.1-7, 2009.

CLERICO, A.; RECCHIA, F.A.; PASSINO, C.; EMDIN, M. Cardiac endocrine function is an essential component of the homeostatic regulation network: physiological and clinical implications. **AJP Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, p.H17-29, 2006.

COLLINS, P. Vascular aspects of estrogen. **Maturitas**. v. 23, p.217-26, 1996.

COOKE, P.S. & NAAZ, A. Role of Estrogens in Adipocyte. **Exp. Biol Med.**, v. 229, p.1127-1135, 2004.

COSTA, M. A.; BOSCH, L. V.G.; MAJOWICS, M.P. ; VIDAL, N. A.; ARRANZ, C. T. Atrial natriuretic peptide modifies arterial blood pressure through nitric oxide pathway in rats. **Hypertension**, v. 35, p. 1119-1123, 2000.

COSTA, M.A.; LORIA, A.; ELES GARAY, R.; BALASZCZUK, A.M.; ARRANZ, C. Role of nitric oxide pathway in hypotensive and renal effects of furosemide during extracellular volume expansion. **Hypertension**, v. 22, p.1-9, 2004.

DANTAS, A. V. ; SCIVOLETTO, R.; FORTES, Z. B.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. C. Influence of female sex hormones on Endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**. v. 34, p. 914-919, 1999.

DeBOLD, M.L.K. Estrogen, natriuretic peptides and the rennin-angiotensin system, **Cardiovascular Research**, v.41, p. 524-531, 1999.

DENG, Y & KAUFMAN, S. The influence of reproductive hormones on ANF release by rat atria. **Life Science**, v. 53, p. 689-695, 1993.

DESSI-FULGHERI, P.; SARZANI, R.; RAPPELLI, A. The natriuretic peptide system in obesity-related hypertension: new pathophysiological aspects. **J Nephrol.**, v. 11, p. 296-299, 1998.

DIANO, S.; KALRA, S.P.; SAKAMOTO, H.; HORVATH, T.L. Leptin in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. **Brain Res.**, v. 812, p. 256-259, 1998.

DI CARLO, C. Leptin and female reproduction. **J Endocrinol Investig.**, v. 26, p.93-95, 2003.

DIETZ, J. R. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. **Cardiovascular Research**, v. 68, p.8-17, 2005.

DUBEY, R.K; OPARIL, S; IMTHURN, B.; JACKSON, E.K. Sex hormones and hypertension. **Cardiovascular Research.**, v. 53, p. 688-708, 2002.

ELBERS, J.M.; ASSCHEMAN, H.; SEIDELL, J.C.; FRÖLICH, M.; MEINDERS, A.E.; GOOREN, L.J. Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex

hormone administration in transsexuals. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 82, p.3267-3270, 1997.

ELESGARAY, R.; CANIFFI, C.; RODRÍGUEZ, I.D.; VISINTINI, J. M F ; FELLET, A.; ARRANZ, C.; COSTA, M.A. Signaling cascade that mediates endothelial nitric oxide synthase activation induced by atrial natriuretic peptide. **Regulatory Peptides.** v. 151, p.130–134, 2008.

ESPINER, E.A.; RICHARDS, A.M.; YANDLE, T.G.; NICHOLLS, M.G. **Natriuretic Hormones.** v. 24, n.3, 1995.

EVANS, G.S.; GIBSON, D.F.; ROBERTS, S.A.; HIND, T.M.; POTTEN, C.S. Proliferative changes in the genital tissue of female mice during the estrous cycle. **Cell Tissue Kinet.**, v. 23, p. 619-35, 1990.

FAIN, J.N. & BAHOUTH, S.W. Regulation of leptin release by mammalian adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 274, n. 3, p.571-575, 2000.

FAIN, J. N.; KANU, A.; BAHOUTH, S.W.; COWAN, G.S.; LLOYD HILER, M. Inhibition of leptin release by atrial natriuretic peptide (ANP) in human adipocytes. **Biochemical Pharmacology.**, v. 65, p.1883-1888, 2003.

FAM, B.C.; MORRIS, M.J.; HANSEN, M.J.; KEBEDE, M.; ANDRIKOPOULOS, S.; PROIETTO, J.; THORBURN, A.W. Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. **Diabetes Obes Metab.**, v. 9, n.6, p.840-52, 2007.

FAROOQI, I. S.; MATARESE, G.; LORD, G.M.; KEOGH, J.M.; LAWRENCE, E.; AGWU, C.; SANNA, V.; JEBB, S.A.; PERNA, F.; FONTANA, S.; LECHLER, R.I.; DEPAOLI, A.M.; O'RAHILLY, S. Beneficial effects of leptin obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **J. Clin. Invest.**, v. 110, p. 1093-1103, 2002.

FAROOQI, I. S.; SUSAN, A.; JEBB, S. A. ; LANGMACK, G.; LAWRENCE, E; CHEETHAM, C.H.; PRENTICE, A.M.; HUGHES, I.A.; MARK A. MCCAMISH, M. A.; O'RAHILLY, S. Effects of recombinants leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. **N. Engl. J. Med.**, v.341, p.879-884, 1999.

FERRARA, M.C.; LYNCH, N.A.; NICKLAS, B.J.; RYAN, A. S.; BERMAN, D. M. Differences in Adipose Tissue Metabolism between Postmenopausal and Perimenopausal Women. **The J Clin Endocrinol Metab.**, v. 87, p.4166-4170, 2002.

FLEGAL, K.M.; GRAUBARD, B.I.; WILLIAMSON, D.F.; GAIL, M.H. Excess death associated with underweight, overweight, and obesity. **JAMA**, v. 293, p.1861-1867, 2005.

FLIER, J.S. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. **Cell**, v. 116, p. 337-350, 2004.

FREDERICH, R.C.; HAMAN, A.; ANDERSON S.; LÖLLMANN, B.; LOWELL, B.B.; FLIER, J.S. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet induced resistance to leptin action. **Nat. Med.**, v.1, p.1311-1314, 1995a.

FREDERICH, R.C.; HAMAN, A.; HAMAN, A.; NAPOLITANO-ROSEN, A. ; B B KAHN; LOWELL, B.B; FLIER, J.S. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. **J. Clin. Invest.**, v. 96, p.1658-1663, 1995b.

FRUHBECK, G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. **Diabetes**, v. 48, p. 903–908, 1999.

GÁLVEZ-PRIETO, B; ABDERRAHIM, F.; FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S. Influence of perivascular adipose tissue and leptin on mesenteric vascular resistance in hypertension [abstract]. **J Hypertens.**, v. 22, S335, 2004.

GAMBINO, Y.P.; MAYMO´, J.L.; PE´REZ-PE´REZ, A.; DUEÑAS, J.L.; SA´NCHEZ-MARGALET,V.; CALVO, J.C.; VARONE, C.L. 17Beta-Estradiol enhances leptin expression in human placental cells through genomic and nongenomic actions. **Biology of Reproduction.**, v. 83, p. 42-51, 2010.

GAO, Q. & HORVATH, T.L. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 294, p.817-E826, 2008.

GORRES, B.K.; BOMHOFF, G.L.; GUPTE, A.A.; GEIGER, P.C. Altered estrogen receptor expression in skeletal muscle and adipose tissue of female rats fed a high-fat diet. **J Appl Physiol.** v.110, n.4, p. 1046-53, 2011.

GUTIERREZ-JUAREZ, R.; OBICI, S.; ROSSETI, L. Melacortin-independent effects of leptin on hepatic glucose fluxes. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 49704-49705, 2004.

HAHN T. M.; BREININGER, J.F.; BASKIN, D.G.; SCHWARTZ, M.W. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. **Nat. Neurosci.**, v.1, p. 271-272, 1998.

HARDIE, L.; TRAYHURN, P.; ABRAMOVICH, D.; FOWLER, P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. **Clin Endocrinol.**, v. 47, n.1, p.101-106, 1997.

HASSANGER, C.; CHRITIANSEN, C.; RISS, B.J.;STOM, V.; GUYENE, T.T. The long-term effect of oral and percutaneous estradiol on plasma renin substrate and blood pressure. **Circulation**, v.76, n.4, p.753-758, 1987.

HAVEL, P.J.; HAVEL, P.J, KASIM-KARAKAS, S.; MUELLER, W.; JOHNSON, P.R.; GINGERICH, R.L.; STERN, J.S. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: Effects of dietary fat content and sustained weight loss. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 81, p. 4406-4413, 1996.

HE, X.; WANG, W. GROFTON, J.T.; SHARE, L. Effects of 17 β -estradiol on the sympathetic activity and pressor response to phenylephrine in ovariectomized rats. **American Journal Physiology**, v.275, p.R493-498,1999.

HEINE, P.A ; TAYLOR, J.A.; IWAMOTO, G.A.; LUBAHN, D. B.; COOKE, P.S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-a knockout mice. **PNAS**, v. 97, p.12729-12734, 2000.

HENRIKSEN, J.H.; HOLST, J.J.; MOLLER, S.; ANDERSEN, U.B.; BENDTSEN, F.; JENSEN, G. Elevated circulating leptin levels in arterial hypertension: relationship to arteriovenous overflow and extraction of leptin. **Clin Sci.**, v.99, p. 527-534, 2000.

HERNADEZ, I.; DELGADO, J.L.; DIAZ, J.; QUESADA, T.; TERVEL, M.J.G.; LLANOS, M.C.; CARSBONELL, L.F. 17 β -estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. **American Journal of Physiology**, v. 279, p.R1599-1605, 2000.

HESHKA, J.T. & JONES, P.J. A role for dietary fat in leptin receptor, OB-Rb, function. **Life Sci.**, v. 69, n.9, p.987-1003, 2001.

HIRAOKA, J.; HOSODA, K.; OGAWA, Y.; IKEDA, K.; NARA, Y.; MASUZAKI, H.; TAKAYA, K.; NAKAGAWA, K.; MASHIMO, T.; SAWAMURA, M.; KOLETSKY, R.J.; YAMORI, Y.; NAKAO K. Augmentation of obese (ob) gene expression and leptin secretion in obese spontaneously hypertensive rats (obese SHR or Koletsky rats). **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 231, p. 582-585, 1997.

HOEG, J.M.; WILLIS, L.R.; WEINBERGERM, H. Estrogen attenuation of the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology**. v. 233, n. 3, p.369-373, 1977.

HOJNA, S.; JORDAN, M.D.; KOLLIAS, H.; PAUSOVA, Z. High-fat diet induces emergence of brown-like adipocytes in white adipose tissue of spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res.**, v.188, 2011.

HOMMA, H. ; KURACHI, H.; NISHIO, Y.; TAKEDA, T.; YAMAMOTO, T.; ADACHI, K.; MORISHIGE, K.; OHMICH, M.; MATSUZAWA, Y.; MURATA, Y. Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p.11404-11411, 2000.

HONG, M.; YAN, Q.; TAO, B.; BOERSMA, A.; HAN, K.K.; VANTYGHM, M.C.; RACADOT, A.; LEFEBVRE, J. Estradiol, progesterone and testosterone exposures affect the atrial natriuretic peptide gene expression in vivo in rats. **Biol Chem Hoppe-Seyler**, v. 373, p.213-218, 1992.

HUANG, A.; SUN, D.; KOLLER, A; KALEY, G. Gender difference in myogenic tone of rats arterioles is due to estrogen-induced, enhanced release of NO. **American Journal Physiology**, v. 272, n.41, p. H1804-1809, 1997.

JAKOBSEN, M.U.; O'REILLY, E.J.; HEITMANN, B.L.; PEREIRA, M.A.; BÄLTER, K.; FRASER, G.E.; GOLDBOURT, U.; HALLMANS, G.; KNEKT, P.; LIU, S.; PIETINEN, P.; SPIEGELMAN, D.; STEVENS, J.; VIRTAMO, J.; WILLETT, W.C.; ASCHERIO, A. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. **Am J Clin Nutr.**, v. 89, n.5, p.1425-1432, 2009.

JANKOWSKI, M.; RACHELSKA, G.; DONGHAO, W.; MCCANN, S.M.; GUTKOWSKA, J. Estrogens receptors activate atrial natriuretic in the rat heart. **PNAS**. v. 98, n.20, p.11765-11770, 2001.

JAVESHGHANI D, SCHIFFRIN EL, SAIRAM MR, TOUYZ RM. Potentiation of vascular oxidative stress and nitric oxide-mediated endothelial dysfunction by high-

fat diet in a mouse model of estrogen deficiency and hyperandrogenemia. **J Am Soc Hypertens.** v.3, n.5, p.295-305, 2009.

JAZBUTYTE, V.; ARIAS-LOZA, P.A.; HU, K.; WIDDER, J.; GOVINDARAJ, V.; POSER-KLEIN, C.; BAUERSACHS, J.; FRITZEMEIER, K-H; HEGELE-HARTUNG C., NEYSES, L.; ERTL, G.; PELZER, T. Ligand-dependent activation of ER β lowers blood pressure and attenuates cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Cardiovascular Research.**, v. 77, p. 774-781, 2008.

JAZBUTYTE, V.; HU, K.; KRUCHTEN, P.; BEY, E.; MAIER, S.K.; FRITZEMEIER, K.H.; PRELLE, K.; HEGELE-HARTUNG, C; HARTMANN, R.W.; NEYSES, L.; ERTL, G., PELZER, T. Aging reduces the efficacy of estrogen substitution to attenuate cardiac hypertrophy in female spontaneously hypertensive rats. **Hypertension.**, v.48, n.4, p. 579-86, 2006.

JEANDEL, L.; OKAMURA, H.; BELLES-ISLES, M.; CHABOT, J.G.; DIHL, F.; MOREL, G.; KELLY, P.A.; HEISLER. S. Immunocytochemical localization, binding, and effects of atrial natriuretic peptide in rat adipocytes. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 62, p. 69-78, 1989.

JIANG, C.; SARREL, P.M.; POOLE-WILSON, P.A.; COLLINS, P. Acute effect of the 17 β -estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1. **American Journal of Physiology**, v. 263, p.271-275, 1992.

JONES, M.E.E.; THORBURN, A.W.; BRITT, K.L.; HEWITT, K.N.; WREFORD, N.G.; PROIETTO, J.; OZ, O.K.; LEURY, B.J.; ROBERTSON, K.M.; YAO, S.; SIMPSON, E.R. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. **PNAS**, v. 97, p. 12735-12740, 2000.

JUDD, S.J. Disturbance of the reproductive axis induced by negative energy balance. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, n.1, p. 65-72, 1998.

KAHN, B.B.; ALQUIER, T.; CARLING, D.; HARDIE, D.G. Amp-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism.*, v. 1, 2005.

KALSBECK, A.; FLIERS, E.; HOFMAN, M.A.; SWAAB, D.F.; VAN SOMEREN, E.J.W.; BUIJS, R.M. **Progress in Brain research: Hypothalamic Integration of Energy Metabolism.** Amsterdam, Netherlands: Elsevier, v. 153, 2006.

KAMOHARA, S.; BURCELIN, R.; HALAAS, J.L.; FRIEDMAN, J.M.; CHARRON, M.J. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. **Nature.**, v. 389, p.374-377, 1997.

KARJALAINEN, A. H.; RUSKOAHO, H.; VUOLTEENAHO, O.; HEIKKINEN, J.E.; BÄCKSTRÖM, A.C.; SAVOLAINEN, M.J.; KESÄNIEMI, Y.A. Effects of estrogen replacement therapy on natriuretic peptides and blood pressure. **Maturitas**, v. 47, p. 201-208, 2004.

KAWAI, K.; SUGIMOTO, K.; NAKASHIMA, K; MIURA, H.; NINOMIYA, Y. Leptin as a modulator of sweet taste sensitive in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 11044-11049, 2000.

- KENNEDY, G. C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Biol. Sci.**, v. 140, p. 578-596, 1953.
- KHOKHAR, K.K.; SIDHU, S.; KAUR, G. Correlation between leptin level and hypertension in normal and obese pre- and postmenopausal women. **Eur J Endocrinol.**, v.163, n.6, p.873-878, 2010.
- KNIGHT, S.F.; QUIGLEY, J.E.; YUAN, J.; ROY, S.S.; ELMARAKBY, A.; IMIG, J.D. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. **Hypertension.**, v. 51, p.352-359, 2008.
- KOLACZYNSKI, J.W.; OHANNESIAN, J.P.; CONSIDINE, R.V.; MARCO, C.C.; CARO, J.F. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81, p. 4162-4165, 1996.
- KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v.404, p. 635-643, 2000.
- KOPP, W.; BLUM, W. F.; VON PRITTWITZ, S.; ZIEGLER, A.; LÜBBERT, H.; EMONS, G.; HERZOG, W.; HERPERTZ, S.; DETER, H.C.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Low leptin levels predict amenorrhea in underweight and eating disordered females. **Mol Psychiatry**, v.2, n.4, p. 335-340, 1997.
- KRISTENSEN K.; PEDERSEN, S. B.; VESTERGAARD, P.; MOSEKILDE, L.; RICHELSEN, B. Hormone replacement therapy affects body composition and leptin differently in obese and non- obese postmenopausal women. **J Endocrinol.**, v.163, p.55- 62, 1999.
- LEVIN, E.R.; GARDNER, D.G.; SAMSON, W.K. Natriuretic peptides. **N England J Med.**, v. 339, p.321-328, 1998.
- LEWINGTON, S.; CLARKE, R.; QIZILBASH, N.; PETO, R.; COLLINS, R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. **Lancet**, v. 360, p.1903-1913, 2002.
- LEY, C.J.; LEES, B.; STEVENSON, J.C. Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. **Am J Clin Nutr.**, v. 55, p, 950-954, 1992.
- LICATA, G; VOLPE, M; SCAGLIONE, R.; RUBATTU S. Salt-regulating hormones in young normotensive obese subjects: effects of saline load. **Hypertension.**, v. 23, p. 120-124, 1994.
- LOTUFO, P.A. Stroke in Brazil: a neglected disease. **Med J.**, v. 123, n.1, p.3-4, 2005.
- LOVEJOY, J.C; CHAMPAGNE, C.M.; JONGE, L.; XIE, H.; SMITH, S.R. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. **Int J Obes.**, v.32, n.6, p.949-58, 2008.
- LUOTO, R., KAPRIO, J.; REUNANEN, A.; RUTANEN, E.M. Cardiovascular morbidity in relation to ovarian function after hysterectomy. **Obstet Gynecol.**, v. 85, p. 515–522,1995.

- MACHINAL, F.; DIEUDONNE, M-N.; LENEVEU, M-C.; PECQUERY, R.; GIUDICELLI, Y. In Vivo and in Vitro ob Gene Expression and Leptin Secretion in Rat Adipocytes: Evidence for a Regional Specific Regulation by Sex Steroid Hormones. **Endocrinology**, v.140, n. 4, 1999.
- MADANI, S.; DE, G.S.; MUNOZ, D.M.; LI, R. K.; SWEENEY, G. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. **Cardiovascular Research**, v. 69, p. 716–725, 2006.
- MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSI, E.; PRATLEY, R. E.; LEE, G.H.; ZHANG, Y.; FEI, H. ; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN ,S.; KERN, P.A.; FRIEDMAN, J.M. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nat Med.**, v. 1, p.1155-1161, 1995.
- MAFFEI, S.; DEL, R.Y.S.; PRONTERA, C.; CLERICO, A. Increase in circulating levels of cardiac natriuretic peptides after hormone replacement therapy in postmenopausal women. **Clin Sci.**, v.101, p. 447-453, 2001.
- MAGNESS, R.R.; PARKER, C.R.; ROSENFELD, C.R. Systemic and uterine responses to chronic infusion of estradiol-17 β . **American Journal Physiology**, v. 265, p. E690-698, 1993.
- MANSON, J.E. & BASSUK, S.S. Invited Commentary: Hormone Therapy and Risk of Coronary Heart Disease-Why Renew the Focus on the Early Years of Menopause? **American Journal of Epidemiology**, v.166, n.5, p. 511-517, 2007.
- MASCARENO, E.; BECKLES, D.; DHAR-MASCARENO, M.; SIDDIQUI, M.A.Q. Enhanced hypertrophy in ob/ob mice due to an impairment in expression of atrial natriuretic peptide. **Vascular Pharmacology**, v. 51, p.198-204, 2009.
- MASUZAKI, H.; MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; HOSODA, K.; MIYAWAKI, T.; HANAOKA, I.; HIRAOKA, J.; YASUNO, A.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y.; NISHI, S.; NAKAO, K. Glucocorticoid regulation of leptin synthesis and secretion in humans: elevated plasma leptin levels in Cushing's syndrome. **J. Clin Endocrinol. Metab.**, v.82, p. 2542-2547, 1997.
- MATSUDA, K.; TERAGAWA, H.; FUKUDA, Y.; NAKAGAWA, K.; HIGASHI, Y.; CHAYAMA, K. Leptin causes nitric-oxide independent coronary artery vasodilation in humans. **Hypertens Res.**, v. 26, p.147-152, 2003.
- MATVIENKO, O.A.; ALEKEL, D.L.; GENSCHER, U., RITLAND, L.; VAN LOAN, M.D.; KOEHLER, K.J. Appetitive hormones, but not isoflavone tablets, influence overall and central adiposity in healthy postmenopausal woman. **Menopause**, v.17, n.3, p.1-8, 2010.
- MATYSKOVÁ, R.; ZELEZNÁ, B.; MAIXNEROVÁ, J.; KOUTOVÁ, D.; HALUZÍK, M.; MALETÍNSKÁ, L. Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet. **Horm Metab Res.**, v.42, n.3, p.182-6, 2010.
- MEERSMAN, R.E.; ZION, A.S.; GIARDINA, E.G.V.; WEIR, J.P.; LIEBERMAN, J.S.; DOWNEY, J.A. Estrogen replacement, vascular distensibility, and blood pressures in postmenopausal women. **Am J Physiol.**, v. 274, p. H1539-1544, 1998.

- MENDELSON, M. E. & KARAS, R. H. Mechanisms of disease: the protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 23, p. 1801-1811, 1999.
- MERCEDES, L.; KUROSUKI, B. Estrogen, natriuretic peptides and the renin-angiotensin system. **Cardiovascular Research**, v. 41, p. 524-531, 1999.
- MERCER, J.G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L.M.; LAWRENCE, C.B.; HANNAH, L.T.; MORGAN, P.J.; TRAYHURN, P. Coexpression of leptin receptor and prepro-neuropeptide Y RNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. **J. Neuroendocrinol**, v.8, p. 733-735, 1996.
- MESSINIS I.E.; MILINGOS, S.D.; ALEXANDRIS, E.; KARIOTIS, I.; KOLLIOS, G.; SEFERIADIS, K. Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. **Hum Reprod.**, v. 14, p. 913-918, 1999.
- MONTAGUE, C. T. Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. **Nature**, v. 387, p. 903-908, 1997.
- MORABITO, D.; VALLOTTON, M.B.; LANG, U. Obesity is associated with impaired ventricular protein kinase C-MAP kinase signaling and altered ANP mRNA expression in the heart of adult Zucker rats. **J Invest Med.**, v. 49, p.310-318, 2001.
- MORO, C.; GALITZKY, J.; SENGENES, C.; OISCRAMPES, F.; LAFONTAN, M.; BERLAN, M. Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 308, n. 3, p.984-992, 2004.
- MORO, C.; KLIMCAKOVA, E.; LAFONTAN, M.; BERLAN, M.; GALITZKY, J. Phosphodiesterase-5A and neutral endopeptidase in human adipocytes do not control atrial peptide-mediated lipolysis. **Br J Pharmacol.**, v.152, p.1102-1110, 2007.
- MOUNZIH, K.; LU, R.; CHEHAB, F.F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. **Endocrinology**, v.138, p. 1190-1193, 1997.
- MUGGE, A.; RIEDEL, M; BARTON, M., KUHN, M., LICHTLEN, P.R. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-estradiol in vitro. **Cardiovasc.**, v.27, p. 1939- 1942, 1993.
- MUNOZ, J.; DERSTINE, A.; GOWER, B.A. Fat distribution and insulin sensitivity in postmenopausal women: influence of hormone replacement. **Obes Res.**, v.10, p.424-431, 2002.
- MURPHY, J. G. & KHALIL, R. A. Gender-specific reduction in contractility and $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle cells of female rat. **Am J Physiol.**, v. 278, p.C830-844, 2000.
- MUST, A.; SPADAN, J.; COAKLEY, E.H.; FIELD, A.E.; COLDITZ, G.; DIETZ, W.H. The disease burden associated with overweight and obesity. **JAMA**, v. 282, p.523-529, 1999.
- NAZZ, A.; ZAKROCZYMSKI, M.; HEINE, P.; TAYLOR, J.; SAUNDERS, P.; LUBAHN, D.; COOKE, P.S. Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the

absence of estrogen receptor-alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). **Horm Metab Res.**, v. 34, n11/12, p. 758-763, 2002.

NETER, J.E.; STAM, B.E.; KOK, F.J.; GROBBEE, D.E.; GELEIJNSE, J.M. Influence of weight reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Hypertension**, v. 42, p.878–84, 2003.

NG, K.Y.; YONG, J.; CHAKRABORTY, T.R. Estrous cycle in ob/ob and ovariectomized female mice and its relation with estrogen and leptin. **Physiology & Behavior.**, v. 99, p. 125-130, 2010.

NICKOLA, M.W.; WOLD, L.E.; COLLIGAN, P.B.; WANG, G.J.; SAMSON, W.K.; REN, J. Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes: Role of NO. **Hypertension**, v. 36, p. 501–505, 2000.

NISHIKIMI, T.; MAEDA, N.; MATSUOKA, H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. **Cardiovascular Research**, v. 69, p. 318 - 328, 2006.

NISWENDER K. D.; MORRISON, C.D.; CLEGG, D.J.; OLSON, R.; BASKIN, D.G.; MYERS, M.G. ; SEELEY, R.J.; SCHWARTZ, M.W. Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus: a key mediator of insulin-induced anorexia. **Diabetes**, v. 52, p. 227-231, 2003.

OHLSSON C.; HELLBERG, N.; PARINI, P.; VIDAL, O.; BOHLOOLY-Y, M.; RUDLING, M.; LINDBERG, M.K.; WARNER, M.; ANGELIN, B.; GUSTAFSSON, J.A. Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 278, n.3, p. 640-645, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2004. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, IBGE, Diretoria de pesquisas, coordenação de índices de preços. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil, 2004. Disponível em <http://www.who.int/infobase/report.aspx?rid=111&iso=BRA&gobutton=Go>. Acesso em 28 de março de 2010.

OZATA, M.; OSDEMIR, I.C.E; LICINIO, J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin –mediated defects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.84, p. 3686-3695, 1999.

PALIN, S.L.; MCTERNAN, P.G.; ANDERSON, L.A.; STURDEE, D.W.; BARNETT, A.H.; KUMAR, S. 17Beta-estradiol and anti-estrogen ICI: compound 182,780 regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. **Metabolism**, v.52, p. 383-388, 2003.

PANTALEÃO, T. U; MOUSOVICH, F.; ROSENTHAL, D.; PADRÓN, A.S.; CARVALHO, D.P.; COSTA, V.M. Effect of serum estradiol and leptin levels on thyroid function, food intake and body weight gain in female Wistar rats. **Steroids**, v.75, n.10, p.638-642, 2010.

PARDUCZ, A.; ZSARNOVSZKY, A.; NAFTOLIN, F.; HORVATH, T.L. Estradiol affects axo-somatic contacts of neuroendocrine cells in the arcuate nucleus of adult rats. **Neuroscience**, v.117, p. 791-794, 2003.

PELLEYMOUNTER, M. A.; CULLEN, M.J.; BAKER, M.B.; HECHT, R.; WINTERS, D.; BOONE, T.; COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v. 269, p. 540-543, 1995.

PERCEGONI, N.; FERREIRA, A.C.; RODRIGUES, C.F.; ROSENTHAL, D.; CASTELO BRANCO, M.T.; RUMJANEK, V.M.; CARVALHO, D.P. Profile of serum IL-1beta and IL-10 shortly after ovariectomy and estradiol replacement in rats. **Horm Metab Res.**, v.41, n.1, p.50-54, 2009.

PINILLA, L.; SEOANE, L.M.; GONZALEZ, L.; CARRO, E.; AGUILAR, E.; CASANUEVA, F.F.; DIEGUEZ, C. Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. **Eur J Endocrinol.**, v.140, p. 468-473, 1999.

PORTALUPPI, F.; PANSINI, F.; MANFREDINI, R.; MOLLICA, G. Relative influence of menopausal status, age, and body mass index on blood pressure. **Hypertension**, v. 29, p. 976-979, 1997.

POTTER, L.R., ABBEY-HOSCH, S.; DICKEY, D.M. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate dependent signaling functions. **Endocrinology**, v. 27, p.47-72, 2006.

PRIEGO, T.; SÁNCHEZ, J.; PICÓ, C.; PALOU, A. Sex-associated differences in the leptin and ghrelin systems related with the induction of hyperphagia under high-fat diet exposure in rats. **Horm Behav.**, v. 55, n.1, p.33-40, 2009.

PURDHAM, D. M.; RAJAPUROHITAM, V.; ZEIDAN, A.; HUANG, C.; GROSS, G.J.; KARMAZYN, M. A neutralizing leptin receptor antibody mitigates hypertrophy and hemodynamic dysfunction in the post infarcted rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.295, n.1, p. H441-446, 2008.

PURDHAM, D.M.; ZOU, M.X.; RAJAPUROHITAM, V.; KARMAZYN, M. Rat heart is a site of leptin production and action. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.287, p. H2877-H2884, 2004.

QUINTON, N. D; LAIRD, S. M; OKON, M.A.; LI, T.C.; SMITH, R.F.; ROSS, R.J.; BLAKEMORE, A.I. Serum leptin levels during the menstrual cycle of healthy fertile women. **J Biomed Sci.**, v. 56, p.16-19, 1999.

RAHMOUNI, K.; MORGAN, D.A.; MORGAN, G.M.; MARK, A.L.; HAYNES, W.G. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. **Diabetes**, v. 54, p.2012-2018, 2005.

RAJAPUROHITAM, V.; GAN, X.T.; KIRSHENBAUM, L.A.; KARMAZYN, M. The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. **Circ Res.**, v. 93, p. 277-279, 2003.

RECKELHOFF, J.F. & FORTEPIANI, L.A. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. **Hypertension**, v. 43, n. 5, p. 918-923, 2004.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 Purified diets for laboratories rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, p.1939-1951, 1993.

RICHARDS, M. Natriuretic Peptides Update on Peptide Release, Bioactivity, and Clinical Use. **Hypertension**, v. 50, p. 25-30, 2007.

ROBINSON, S.W.; DINULESCO, D.M.; CONE, R.D. Genetic models of obesity and energy balance in the mouse. **Ann Rev Genet.**, v. 34, p. 687-745, 2000.

RODRÍGUEZ, A.; FRÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; CATALÁN, V.; SÁINZ, N.; DÍEZ, J.; ZALBA, G.; FORTUÑO, A. The inhibitory effect of leptin on angiotensina II-induced vasoconstriction is blunted in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 24, p.1589-1597, 2006.

ROSENBAUM, M.; NICOLSON, M.; HIRSCH, J.; HEYMSFIELD, S.B.; GALLAGHER, D.; CHU, F.LEIBEL, R.L. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 81, n. 9, p. 3424-3427, 1996.

ROSSOUW, J.E.; PRENTICE, R.L.; MANSON, J.E.; WU, L. ; BARAD, D.; BARNABEI, V.M.; KO, M.; LACROIX, A.Z.; MARGOLIS, K.L.; STEFANICK, M.L. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. **JAMA**, v. 297, n.13, p.1465-1477, 2007.

SAAD, M.F.; DAMANI, S.; GINGERICH, R.L.; RIAD-GABRIEL, M.G.; KHAN, A.; BOYADJIAN, R.; JINAGOUDA, S.D.; EL-TAWIL, K.; RUDE, R.K.; KAMDAR V. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 82, n. 2, p. 579-584, 1997.

SALEH, M.; CONNELL, B.J.; SALEH, T.M. Autonomic and cardiovascular reflex responses to central estrogen injection in ovariectomized female rats. **Brain Research**, v.879, p.105-114, 2000.

SALEH, M. T. & CONNELL, B. Centrally mediated effect of 17 β -estradiol on parasympathetic tone in male rats. **American Journal Physiology**, v.276, p.R474-481, 1999.

SANCHEZ-MATEOS, S.; ALONSO-GONZALEZ,C.; GONZALEZ, A; MARTINEZ-CAMPA C.M.; MEDIAVILLA, M.D.; COS,S. ; SANCHEZ-BARCELO, E.J. Melatonin and estradiol effects on food intake, body weight, and leptin in ovariectomized rats. **Maturitas**. v.58, p. 91-101, 2007.

SANTOLLO, J.; ECKEL, L.A. Estradiol decreases the orexigenic effect of neuropeptide Y, but not agouti-related protein, in ovariectomized rats. **Behav Brain Res.**, v.191, n.2, p.173-177, 2008.

SARZANI, R.; DESSÌ-FULGHERI, P.; PACI, V.M.; ESPINOSA, E.; RAPPELLI, A. Expression of natriuretic peptide receptors in human adipose and other tissues. **J Endocrinol Invest.**, v.19, p. 581- 585, 1996.

SARZANI, R.; DESSÌ-FULGHERI, P.; SALVI, F.; SERENELLI, M; SPAGNOLO, D.; COLA, G.; PUPITA, M.; GIANTOMASSI, L.; RAPPELLI, A. A novel promoter variant of the natriuretic peptide clearance receptor gene is associated with lower atrial natriuretic peptide and higher blood pressure in obese hypertensives. **J Hypertens.**, v. 17, p.1301-1305, 1999.

SARZANI, R.; MARCUCCI, P.; SALVI, F.; BORDICCHIA, M.; ESPINOSA, E.; MUCCI, L.; LORENZETTI, B.; MINARDI, D.; MUZZONIGRO, G.; DESSÌ-FULGHERI, P.; RAPPELLI, A. Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth. **Int J Obes.**, v. 32, p.259-267, 2008.

SARZANI, R.; PACI, V.M.; DESSÌ-FULGHERI, P.; ESPINOSA, E.; RAPPELLI, A. Comparative analysis of atrial natriuretic peptide receptor expression in rat tissues. **J Hypertens Suppl.**, v.11(suppl 5), p.S214-215, 1993.

SARZANI, R.; STRAZZULLO, P.; SALVI, F.; IACONE, R.; PIETRUCCHI, F.; SIANI, A.; BARBA, G.; GERARDI, M.C.; DESSÌ-FULGHERI, P.; RAPPELLI, A. Natriuretic peptide clearance receptor alleles and susceptibility to abdominal adiposity. **Obes Res.**, 12:351-56, 2004.

SASAKI, T.; OHNO, Y.; OTSUKA, K.; SUZAWA, T.; SUZUKI, H.; SARUTA, T. Estrogen attenuates the increases in blood pressure and platelet aggregation in ovariectomized and SALT-Iodaded Dahl SALT-sensitive rats. **Journal of Hypertension**, v.18, p. 911-917, 2000.

SCHLING, P. & SCHAFFER, T. Human adipose tissue cells keep tight control on the angiotensin II levels in their vicinity. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 48066-48075, 2002.

SCHNEIDER, J.E. & WADE G.N. Availability of metabolic fuels controls estrous cyclicity of Syrian hamsters. **Science**, v. 244, p. 1326-1328, 1989.

SEELY, E.W.; WALSH, B.W.; GERHARD, M.D.; WILLIAMS, G.H. Estradiol with or without progesterone and ambulatory blood pressure in postmenopausal women. **Hypertension**, v.33, p.1190-1194, 1999.

SENGENÈS, C.; BERLAN, M.; GLISEZINSKI, I.; LAFONTAN, M.; GALITZKY, J. Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. **FASEB J.**, v.14, n. 10, p. 1345-1351, 2000.

SENGENÈS, C; BOULOUMIE, A.; HAUNER, H; BERLANT, M; BUSSES, R.; LAFONTAN, M; GALITZKY, J. Involvement of a cGMP-dependent Pathway in the Natriuretic Peptide-mediated Hormone-sensitive Lipase Phosphorylation in Human Adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 49, p. 48617-48626, 2003.

SENGENÈS, C.; ZAKAROFF-GIRARD, A.; MOULIN, A.; BERLAN, M.; BOULOUMIE, A.; LAFONTAN, M.; GALITZKY, J. Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 283, p. 257-265, 2002.

SHARKEY, L.C.; HOLYCROSS, B.J.; PARK, S.; SHIRY, L.J.; HOEPF, T.M.; McCUNE, S. A.; RADIN, M.J. Effect of ovariectomy and estrogen replacement on

cardiovascular disease in heart failure-prone SHHF/Mcc-fa cp rats. **Journal Molecular Cellular Cardiology**, v.31, n.8, p.1527-37, 1999.

SHEK, E. W.; BRANDS, M. W.; HALL, JE. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. **Hypertension**, v.31, p. 409-414, 1998.

SHIN, J. H.; HUR, J.; SEO, H. S.; JEONG, Y.; LEE, J.K; OH, M.; KIM, T.; SAW, H. S.; KIM, S. H. The ration of estrogen receptor α to estrogen receptor β in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. **Steroids**, v.72, p.592-599, 2007.

SONG, D.; ARIKAWA, E.; GALIPEAU, D.M.; YEH, J.N.; BATTELL, M.L.; YUEN, V.G.; MCNEILL, J.H. Chronic estrogen treatment modifies insulin-induced insulin resistance and hypertension in ovariectomized rats. **Am J Hypertens**. v.18, n.9, p.1189-94, 2005.

STAESSEN, J.; BULPITT, C.J.; FAGARD, R.; LIJNEN, P.; AMERY, A. The influence of menopause on blood pressure. *Journal of Human Hypertension*, v.3, p. 427-433, 1989.

STEPHENS, T.W.; BASINSKI, M.; BRISTOW, P.K.; BUE-VALLESKEY, J.M.; BURGETT, S.G.; CRAFT, L.; HALE, J.;HOFFMANN, J.; HSIUNG, H.M.; KRIAUCIUNAS, A.; MACKELLAR, W.; ROSTECK, J. P.R.; SCHONER, B.; SMITH, D.; TINSLEY, F.C.; ZHANG, X.; HEIMAN, M. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. **Nature**, v.377, p. 530-534, 1995.

STUBBINS, R.E.; HOLCOMB, V.B.; HONG, J.; NÚÑEZ, N.P. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. **Eur J Nutr.**, 2011.

STUBBINS, R.E.; NAJJAR, K.; HOLCOMB, V.B.; HONG, J.; NÚÑEZ, N.P. Estrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. **Diabetes Obes Metab**. v. 14, n. 1, p.:58-66, 2012.

TAKAHASHI, N.; PATEL, H.R.; QI, Y.; DUSHAY, J.; AHIMA, R.S. Divergent effects of leptin in mice susceptible or resistance to obesity. **Horm. Metab. Res.**, v. 34, p. 691-697, 2002.

TAKAYA K.; OGAWA, Y.; HIRAOKA, J.; HOSODA, K.; YAMORI, Y.; NAKAO, K.; KOLETSKY, R.J. Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. **Nature Genet.**, v. 14, p.130-131, 1996.

TANAKA M.; NAKAYA, S.; KUMAI, T.; WATANABE, M.; TATEISHI, T.; SHIMIZU, H.; KOBAYASHI, S. Effects of estrogen on serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue in rats. **Horm Res.**, v. 56, p. 98-104, 2001.

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

TOSTES, R.C.; NIGRO, D.; FORTES, Z.B.; CARVALHO, M.H.C. Effects of estrogen on the vascular system. *Estrogen and the vascular system*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1143-1158, 2003.

UMEDA, M.; KANDA, T.; MURAKAMI, M. Effects of angiotensin II receptor antagonists on insulin resistance syndrome and leptin in sucrose-fed spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res.**, v.26, p. 485- 492, 2003.

VULLIÉMOZ, N.R.; XIAO, E.; XIA-ZHANG, L.; WARDLAW, S.L.; FERIN, M. Central infusion of agouti-related peptide suppresses pulsatile luteinizing hormone release in the ovariectomized rhesus monkey. **Endocrinology**, v. 146, n.784-789, 2005.

WANG, M.Y.; ORCI, L.; RAVAZZOLA, M.; **UNGER, R.H.** Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. **PNAS**, v.102, n.50, p.18011-18016, 2005.

WANG, T.J.; LARSON, M.G.; LEVY, D.; BENJAMIN, E.J.; LEIP, E.P.; WILSON, P.W.; VASAN, R.S. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide. **American Heart Association**, v.109, p.594-600, 2004.

WEIGT, C.; HERTRAMPF, T.; ZOTH, N.; FRITZEMEIER, K.H.; DIEL, P. Impact of estradiol, ER subtype specific agonists and genistein on energy homeostasis in a rat model of nutrition induced obesity. **Mol Cell Endocrinol.**, 2011.

WEST, S.; HINDERLITER, A. L.; WELLS, E.C.; GIRDLER, S.S.; LIGHT, K.C. Transdermal estrogen reduces vascular resistance and serum cholesterol in postmenopausal women. **American J. Obstet. Gynecol.**, v. 84, n.5, p. 926-933, 2001.

WILKINS, M.R.; REDONDO, J.; BROWN, L.A. The natriuretic-peptide family. **Hum Reprod Lancet.**, v. 349, p.1307-1310, 1997.

WILLIAMS, S.P.; SHACKELFORD, D.P.; IAMS, S.G.; MUSTAFA, S.J. Endothelium-dependent relaxation in estrogen-treated spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacol.**, v.145, p. 295-207, 1988.

WOJCIK-GLADYSZ, A. & POLKOWSKA, J. Neuropeptide Y- a neuromodulatory link between nutrition and reproduction at the central nervous system level. **Reprod Biol.**, v. 6 (Suppl 2), p.21-28, 2006.

WOLD, L. E.; RELLING, D.P.; DUAN, J.; NORBY, F.L.; REN, J. Abrogated leptin-induced cardiac contractile response in ventricular myocytes under spontaneous hypertension role of JAK/STAT pathway. **Hypertension**, v.39, p. 69-74, 2002.

WOOD, G. A.; FATA, J.E.; WATSON, K.L.; KHOKHA, R. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. **Reproduction**, v.133 p.1035-1044, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Bulletin**. Division of Malaria and Parasitic diseases., v.54, 1976.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity**. Preventing and managing the global epidemic. WHO/NUT/NCD 98.1, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2008a. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Acesso em 25 de janeiro de 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2008b. Disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence/en/index.html. Acesso em 25 de janeiro de 2012.

XU, X.; XIAO, J.C.; LUO, L.F.; WANG, S.; ZHANG, J.P.; HUANG, J.J.; LIU, M.L.; LIU, C.G.; XU, K.Q.; LI, Y.J.; SONG, H.P. Effects of ovariectomy and 17 β -estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure. **International Journal of Cardiology**, v. 135, n.2, p. 196-204, 2008.

YANG, R. & BAROUCH, L. A. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. **Circulation Research**., v. 101, p.545-559, 2007.

YEPURU, M.; ESWARAKA, J.; KEARBNEY, J.D.; BARRETT, C.,M.; RAGHOW, S.; VEVERKA, K.A.; MILLER, D.D.; DALTON, J.T.; NARAYANAN, R. Estrogen receptor- β -selective ligands alleviate high-fat diet- and ovariectomy-induced obesity in mice. **J Biol Chem**., v. 285, n. 41, p. 31292-31303, 2010.

YOSHIBAYASHI, M.; SAITO, Y.; NAKAO K. Brain natriuretic peptide versus atrial natriuretic peptide - physiological and pathophysiological significance in children and adults: A review. **Eur J Endocrinol**., v. 135, n.3, p. 265-268, 1996.

YOSHIMOTO, T.; NARUSE, M.; NARUSE, K.; FUJIMAKI, Y.; TANABE, A.; MURAKI, T.; ITAKURA, M.; HAGIWARA, H.; HIROSE, S.; DEMURA, H. Modulation of vascular natriuretic peptide receptor gene expression in hypertensive and obese hyperglycemic rats. **Endocrinology**, v. 136, n. 6, p. 2427-2434, 1995.

YUAN, K.; YU, J.; SHAH, A.; GAO, S.; KIM, S.Y.; KIM, S.Z.; PARK, B.H.; KIM, S.H. Leptin reduces plasma ANP level via nitric oxide dependent mechanism. **Am J Physiol**., v. 298, n.4, p.R1007-1016, 2010.

ZARJEVSKI N.; CUSIN, I.; VETTOR, R.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; JEANRENAUD, B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide- Y administration to normal rats mimic hormonal and metabolic changes of obesity. **Endocrinology**, v.133, p. 1753-1758, 1993.

ZEIDAN, A.; JAVADOV, S.; CHAKRABARTI, S.; KARMAZYN, M. Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy involves selective caveolae and RhoA/ROCK-dependent p38 MAPK translocation to nuclei. **Cardiovasc Res**., v. 77, p. 64-72, 2008.

ZHANG, F.; RAM, J.L.; STANDLEY, P.R.; SOWERS, J.R.. 17 β -Estradiol attenuates voltage-dependent Ca²⁺ currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. **Am J Physiol**., v. 266, p. 975-980, 1994.

ZHANG, Y.; NOVAK, K.; KAUFMAN, S. Atrial natriuretic factor release during pregnancy in rats. **Journal of Physiology**, v. 488, p. 509-514, 1995.

ZICHA, J. & KUNES, J. Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. **Physiological Reviews**, v.79, n.4, p.1227-1282, 1999.

ZIETZ, B.; SCHÄFFLER, A. ; BÜTTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; PALITZSCH, K.D. Elevated levels of leptin and insulin but not of TNF alpha are associated with hypertension in type 2 diabetic males. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.108, p.259-264, 2000.