

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Faculdade de Medicina

**EFEITO DO ESTRESSE CIRÚRGICO E  
DO ESTRESSE LUMINOSO NOS  
NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA EM  
RATAS ADULTAS *WISTAR***

**MÁRCIO GOMES VILELA**

Belo Horizonte

2008

**MÁRCIO GOMES VILELA**

**EFEITO DO ESTRESSE CIRÚRGICO E  
DO ESTRESSE LUMINOSO NOS  
NÍVEIS SÉRICOS DE LEPTINA EM  
RATAS ADULTAS *WISTAR***

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Patologia Ginecológica e Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio dos Santos Júnior.

Belo Horizonte

Universidade Federal de Minas Gerais

2008

Ao meu irmão Mauro,  
ao amigo irmão Ricardo Savassi Biagioni,  
e à Tia Neguinha  
(todos *in memoriam*),  
que por força do destino não presenciaram  
a conclusão deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. João Lúcio dos Santos Júnior, meu orientador, pela firmeza, disponibilidade, competência, seriedade e tantos outros predicados que fazem do homem um profissional. Também pela brandura, lealdade, força interior, honestidade, humildade e tantos outros predicados que fazem do profissional um homem. De coração e com admiração: obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Robson Augusto Souza Santos, professor titular e chefe do laboratório de hipertensão do ICB-UFMG, detentor de grande sensibilidade nata aos grandes cientistas, que permitiu que se realizasse todo este ensaio em seu laboratório, fonte de grande enriquecimento científico para mim. Minha eterna gratidão.

Ao Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral, mestre, amigo, conselheiro, que sempre estimulou o desafio e proporcionou todas as condições para o meu desenvolvimento científico. “O professor nunca sabe onde cessa a sua influência”.

Aos amigos do laboratório de hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG), que contribuíram de forma ímpar para a realização deste trabalho.

Ao Prof. João Gilberto de Castro Silva, Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, grande amigo, companheiro em momentos cruciais da minha vida.

Aos meus pais, Rafael e Filomena, pelo amor, incentivo, estímulo, educação e valores éticos e morais.

A minha irmã, Beatriz, pelo incentivo e carinho.

À Elba Chaves, pelo estímulo, amizade e solidariedade. Meu muito obrigado.

Aos amigos Carlos Sérgio Custódio de Oliveira, Lina Lapertosa, Itamar Megda Cesarini, Eliane Cesarini, Pedro Alcântara Rodrigues, Ziyona Maman, pelo apoio e incentivo nesta caminhada.

A amiga irmã Prof. Dra. Verônica Franco Parreira e Dr. Miguel Torres, por tudo que proporcionam em afeto, amizade, carinho, incentivo e lealdade.

À Universidade Federal de Minas Gerais, responsável pela minha graduação e toda a pós-graduação.

A Deus, por ter me dado paz, saúde, conforto, esperança e fé.

## RESUMO

Com o objetivo de determinar os níveis plasmáticos de leptina em ratas *Wistar* adultas (90 dias  $\pm$  7 dias) submetidas a tipos específicos de estresse, realizou-se um estudo prospectivo no qual o estímulo foi realizado na fase do proestro. Após 24 horas do início dos estímulos, as amostras foram colhidas por decapitação, centrifugadas e estocadas para a análise da leptina por radioimunoensaio (RIA). As ratas foram divididas em quatro grupos: grupo I (n=14) grupo-controle; grupo II (n=16) submetidas à laparotomia e anestesiadas com 2,2 tribromoetanol 2,5% 1 mg/100 mL de peso; grupo III (n=15) submetidas à ausência de luz por 24 horas; e grupo IV (n=15) submetidas a estímulo luminoso (luz fria 20 watts) por 24 horas. Não houve variação de peso quanto aos grupos. No grupo I, a leptina variou de 0,476 a 6,714 ng/mL, com mediana de 2,667 ng/mL; no grupo II, de 0,384 a 1,448 ng/mL, com mediana de 0,895 ng/mL; no grupo III, de 0,484 a 2,346 ng/mL, com mediana de 1,856 ng/mL; no grupo IV, de 1,003 a 3,181 ng/mL, com mediana de 2,024 ng/mL. Concluiu-se que os níveis plasmáticos de leptina mostraram-se significativamente diminuídos em ratas adultas *Wistar* submetidas ao estresse cirúrgico quando comparadas às dos demais grupos.

Palavras-chave: Leptina. Ratas adultas *Wistar*. Estresse cirúrgico. Estresse luminoso.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DG	2-Deoxiglicose
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ARC	Núcleo arcuado do hipotálamo
CART	Peptídeo regulador cocaína–anfetamina
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador das gonadotrofinas
HPA	Hipotálamo-hipófise–adrenal
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICV	Sistema intracérebro-ventricular
IGF-1	Fator de crescimento insulino-símile-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
LH	Hormônio luteinizante
NaCl	Cloreto de sódio
NDMA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPY	Neuropeptídeo Y
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RIA	Radioimunoensaio
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	Rotação por minuto
SNC	Sistema nervoso central
TGF- $\beta$	Fator transformador de crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VMN	Núcleo ventromedial do hipotálamo

$\alpha$ -MSH          Hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócitos

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Distribuição das ratas quanto ao peso, por grupo.....	35
Gráfico 2 - <i>Boxplot</i> da distribuição do peso, por grupo.....	36
Gráfico 3 - Distribuição por frequência dos valores de leptina, por grupo.....	36
Gráfico 4 - <i>Boxplot</i> dos valores de leptina, por grupo.....	37
Gráfico 5 - Distribuição por frequência dos valores de estradiol, por grupo..	37
Gráfico 6 - <i>Boxplot</i> dos valores de estradiol, por grupo.....	38
Gráfico 7 - Gráfico de dispersão: todas as observações.....	39



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatísticas descritivas por grupo.....	35
Tabela 2 - Testes de normalidade de Shapiro-Wilk – por grupo.....	38
Tabela 3 - Resultados do teste Kruskal-Wallis para leptina e dos testes de Dunn para comparação dois a dois dos quatro grupos.....	39

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Histórico.....	14
2.2 Leptina e reprodução.....	18
2.3 Leptina e eixo hipotálamo-hipófise-ovariano.....	21
2.4 Leptina e ciclo estral.....	23
2.5 Leptina e melatonina.....	27
3 OBJETIVO.....	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 Material.....	30
4.2 Métodos.....	31
4.2.1 Avaliação hormonal.....	31
4.2.2 Análise estatística.....	32
4.2.3 Método bibliográfico.....	32
5 RESULTADOS.....	33
6 DISCUSSÃO.....	40

7 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXOS.....	61

.

## 1 INTRODUÇÃO

Baseados em estudos prévios, em 1994 Zhang *et al.* clonaram e seqüenciaram em ratas o gene da obesidade. Esse gene codifica um ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) de 4,5Kb, sendo 84% de sua seqüência de aminoácidos idênticos entre ratos e humanos. Para conseguir o seqüenciamento dos genes mutantes (gene OB) em humanos, foi necessário obter inicialmente o mapeamento genético para posterior isolamento. Nesse estudo foi identificado o produto do gene da obesidade, que é uma proteína de 16KDa com 167 aminoácidos, sintetizada nos adipócitos e que age no nível hipotalâmico informando-o a respeito do estado nutricional orgânico. Como resposta, o hipotálamo gera aumento no metabolismo basal e redução do apetite, com a finalidade de diminuir o conteúdo lipídico corporal. Por agir de tal forma, essa proteína passou a ser denominada leptina (do grego *leptós*; magro) – (HALAAS *et al.*, 1995).

Recentemente, estudos demonstraram, pelo aumento nas concentrações de hormônios, de citocinas e de leptina, que esta última é importante na regulação do estresse em humanos e animais (JANIK *et al.*, 1997; MOHAMED-ALI; PINKNEY; COPPACK, 1998; ROCK *et al.*, 1992; STRATTON *et al.*, 1997; WARREN *et al.*, 1999; ZUMBACH *et al.*, 1997).

A ação da leptina através de seus receptores (OB-R), que são largamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC) e órgãos periféricos, parece ter seu principal alvo no controle da expressão do neuropeptídeo Y (NPY), conhecido por produzir hiperfagia (CIOFFI *et al.*, 1997; ELMQUIST *et al.*, 1998; GHILARDI; SKODA, 1997; GRINSPOON *et al.*, 1996; HAKANSON *et al.*, 1998; HOUSEKNECHT; PORTOCARRERO, 1998; MERCER *et al.*, 1996; ROHNER-JEANRENAUD *et al.*, 1996; SCHWARTZ *et al.*, 1996; TARTAGLIA, 1997).

A leptina e o NPY estão envolvidos no controle da função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, com efeitos estimulatórios ou inibitórios, conforme sugerem dados disponíveis (HOCHÓL *et al.*, 2000).

A leptina aumenta a expressão do RNAm do hormônio liberador de corticotropina (CRH), principalmente nos núcleos paraventriculares do hipotálamo. Também eleva ou inibe a liberação de CRH de fragmentos de hipotálamo em ratos e camundongos (HEIMAN *et al.*, 1997; HUANG; RIVEST; RICHARD, 1998), além de aumentar a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) em corticotropos *in vitro* (RABER *et al.*, 1997) e os níveis sanguíneos de ACTH e glucocorticóides *in vivo* (AL-BARAZANJI *et al.*, 1997; MALENDOWICZ *et al.*, 1998; VAN DIJK *et al.*, 1997). Outros estudos *in vivo* não demonstraram ação inibitória ou efeito da leptina (HENRY *et al.*, 1999; LADO-ABEAL *et al.*, 1999; SCHWARTZ *et al.*, 1996; THORNTON *et al.*, 1997).

Existem evidências de uma alça de retroalimentação negativa entre secreção de ACTH e níveis séricos de leptina (SPINEDI; GAILLARD, 1998). A leptina retroalimenta a produção de cortisol, considerado o mais importante hormônio que induz estresse em humanos (WALLACE; SATTAR; McMILLAN, 2000).

Não está claro se o aumento nas concentrações de cortisol eleva os níveis séricos de leptina. Trabalhos têm descrito que concentrações de leptina estão aumentadas após administração de curta duração de cortisol em pacientes normais (LARSSON; AHRÉN, 1996). Em contrapartida, nas pacientes com hipercortisolemia crônica endógena, as concentrações de leptina apresentaram-se pouco aumentadas ou apropriadas para o índice de massa corporal (IMC) – (MASUZAKI *et al.*, 1997; WIDJAJA *et al.*, 1998).

Ficou também constatado que em situações de estresse crônico, como o câncer, os níveis de leptina são baixos (WALLACE; SATTAR; McMILLAN, 1998).

É importante a investigação dos efeitos da leptina na função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal do rato em condições basais e de estresse

(HOCHÓL *et al.*, 2000). Foi demonstrada, em ratos submetidos a estresses distintos (éter e frio), uma resposta diferente do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, além dos seus efeitos terem sido modulados diferentemente pela galanina e a substância P (MALENDOWICZ *et al.*, 1994; 1996).

Para avaliar essas correlações, foi estudado o efeito agudo do estresse luminoso, o estresse agudo da ausência de luminosidade e o efeito do estresse cirúrgico agudo comparado com grupo-controle, em ratas adultas *Wistar* na mesma fase do ciclo estral.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico

A leptina é uma proteína codificada pelo gene da obesidade (*ob*), secretada pelos adipócitos e descoberta por clonagem posicional por Zhang *et al.* (1994). Atua no sistema nervoso central (SNC) como fator de sinalização para regular a homeostase do peso corporal e a energia consumida (CAMPFIELD *et al.*, 1995; PELLEYMOUNTER *et al.*, 1995). Primeiramente, pensava-se que fosse um hormônio antiobesidade, mas existem evidências de que ela participa de vários processos metabólicos e endócrinos, incluindo-se a função reprodutiva (MESSINIS *et al.*, 1999).

Camundongos geneticamente obesos (*ob/ob*), isto é, que não produzem leptina e que são obesos, hiperfágicos e inférteis perdem peso e restauram sua fertilidade após a administração de leptina recombinante (BARASH *et al.*, 1996; CHEHAB *et al.*, 1996; PELLEYMOUNTER *et al.*, 1995).

Cinco mutações recessivas gerando fenótipo obeso em camundongos foram descritas por Zhang *et al.* (1994). A primeira foi relatada em 1950 e ocorria em um único gene (*ob*), que provoca obesidade e diabetes tipo II como parte de uma síndrome que se assemelha à obesidade mórbida em humanos. O defeito primário e o sítio da síntese do produto do gene *ob* não eram conhecidos até 1994 (ZHANG *et al.*, 1994).

No cérebro, o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMN) é considerado o mais importante centro de saciedade no SNC. Lesões no núcleo ventromedial do hipotálamo levam ao aumento da ingestão de alimentos e à diminuição do gasto energético, produzindo mais ganho de peso (ZHANG *et al.*, 1994).

Lavoisier e Laplace já afirmavam, em 1783, que o balanço energético era regulado fisiologicamente. Teorias foram propostas para explicar como seria a sinalização para o cérebro com o intuito de controlar o balanço energético. Foi então aventada por Kennedy (1953) a teoria da lipostase, que sugeria ser o controle da gordura corporal feito pelo SNC a partir de produto do metabolismo lipídico circulante no plasma, que interagiria com o hipotálamo. Meyer (1955) propôs a teoria da glicostase, na qual a glicose seria o sinal para a regulação da reserva energética. Brobeck (1948) preconizou que a temperatura corporal era importante sinal para o SNC, controlando a ingestão de alimentos. A incapacidade de identificar substâncias do metabolismo lipídico invalidava a teoria da lipostase e as outras duas teorias não explicavam plenamente como era a regulação do balanço energético *in vivo*. O experimento de Hervey (1959) revelou que a transfusão de sangue de animais com lesão no núcleo ventromedial do hipotálamo resultava em diminuição de ingestão alimentar nos animais normais, enfatizando que pelo menos um componente na circulação sangüínea a ser descoberto revelava o centro da saciedade (*apud* ZHANG *et al.* 1994).

O nome leptina (do grego *leptos*, que significa magro) foi proposto por Halaas *et al.* (1995), sendo LEP o símbolo preferido para designar o gene.

A literatura tem destacado que a leptina não é apenas um mensageiro derivado do tecido adiposo para informar ao cérebro a quantidade de energia armazenada, mas um crucial hormônio para diversos processos fisiológicos, como inflamação, angiogênese, hematopoiese, função imune e reprodução (BOULOUMIE *et al.*, 1998; FANTUZZI; FAGGIONE, 2000; MANTZOROS, 2000). Os adipócitos secretam uma variedade de moléculas metabolicamente ativas, incluindo os ácidos graxos livres (que diminuem a taxa de oxidação de glicose nos tecidos periféricos), a adiposina e outros fatores de complementos envolvidos na defesa imune, como o fator de necrose tumoral alfa (que pode ser um importante determinante na insulino-sensibilidade) e a angiotensina (que promove a diferenciação entre células pré-adipócitos e adipócitos) - (WEIGLE, 1997).



Esse produto da transcrição do gene *ob* que regula a saciedade, a termogênese e a taxa metabólica mantém um elo de comunicação entre o SNC e o tecido adiposo, cujo objetivo principal parece ser o controle da expressão do NPY, conhecido por produzir hiperfagia. Tanto a leptina como o NPY estão envolvidos também no controle da função do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), ressaltando um efeito estimulatório ou inibitório (HOCHÓL *et al.*, 2000).

A regulação da ingestão de alimentos e o gasto energético são acompanhados por atividades de várias regiões cerebrais. Entretanto, a estimulação gênica e as lesões experimentais sinalizam que o hipotálamo é crítico para a integração do balanço energético (DALLMAN *et al.*, 1995).

O núcleo hipotalâmico medial tem diferentes efeitos no balanço de energia. A perda dos efeitos da atividade normal do núcleo ventromedial (VMN) e paraventricular (PVN) do hipotálamo pode ser distinguida prontamente entre eles (BELL *et al.*, 2000). Entretanto, a atividade do PVN e do núcleo arcuado (ARC) é importante para a manutenção do peso corporal normal. Os efeitos das lesões nesses dois grupos são difíceis de serem distinguidos entre si (BELL *et al.*, 2000).

Disrupção da atividade no ARC ou no PVN resulta em obesidade caracterizada pelo aumento da ingestão de alimentos nos períodos de luz e noite e diminuição da perda de peso durante o período de luz do dia (BELL *et al.*, 2000).

Terminações de neurônios do ARC inervam fortemente o PVN e pelo menos dois peptídeos derivados de proteínas sintetizadas no ARC são importantes na regulação do balanço energético. O NPY que estimula a ingestão de alimentos quando injetado dentro do PVN causa obesidade quando infundido no sistema intracérebro-ventricular (ICV) - (STANLEY *et al.*, 1992).

Em roedores com obesidade de origem genética devido a um defeito na síntese ou nos receptores de leptina, há elevação do RNAm prepro-NPY no ARC (SANACORA *et al.*, 1990) e do NPY no PVN (McKIBBIN *et al.*, 1991), sugerindo que o aumento da ingestão de alimentos poderia ser resultado da hipersecreção

de NPY no PVN. Por outro lado, o hormônio estimulante de  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH), que é um peptídeo derivado da proopiomelanocortina (POMC), sintetizado no ARC, inibe a ingestão de alimentos quando injetado no PVN ou infundido no sistema ICV (FAN *et al.*, 1997; MURPHY *et al.*, 1998).

Camundongos com lesões genéticas do receptor de melanocortina também são obesos, indicando que esse sistema reprime a ingestão de alimentos (HUSZAR *et al.*, 1997).

Peptídeos derivados POMC e NPY interagem com o eixo HPA. Ambos inervam neurônios do CRH no PVN, evidenciando que eles podem regular a atividade do eixo HPA (LIPOSITS; SIEVERS; PAULL, 1988). O NPY injetado agudamente no PVN estimula a secreção do ACTH (WAHLESTEDT *et al.*, 1987); e o  $\alpha$ -MSH infundido no sistema ICV inibe a secreção de ACTH (CALOGERO *et al.*, 1988; SHALTS *et al.*, 1992).

A considerável inervação do PVN por axônios do ARC e os conhecidos efeitos dos peptídeos derivados NPY- e POMC- no balanço energético e na função do HPA mostram que NPY e  $\alpha$ -MSH podem regular a saciedade e a atividade adrenocortical (BELL *et al.*, 2000).

Receptores de leptina (OB-R) estão presentes em vários núcleos hipotalâmicos, onde a leptina aumenta a expressão do CRH RNAm no PVN (HOCHÓL *et al.*, 2000).

Alguns trabalhos demonstram que a leptina aumenta a liberação de CRH em cultura de tecido hipotalâmico (COSTA *et al.*, 1997; HOCHÓL *et al.*, 2000; NISHIYAMA *et al.*, 1999; POWIS; BAINS; FERGUSON, 1998; RABER *et al.*, 1997; ZAMORANO *et al.*, 1997) e outros referenciam seu efeito inibitório (HEIMAN *et al.*, 1997; HOCHÓL *et al.*, 2000; HUANG; RIVEST; RICHARD, 1998).

Receptores de leptina estão presentes na hipófise. A leptina aumenta o ACTH em células corticotróficas *in vitro* (RABER *et al.*, 1997) e o ACTH eleva os níveis plasmáticos de glicocorticóides *in vivo* em ratos (HOCHÓL *et al.*, 2000).

Mas também existem estudos que não demonstram o efeito da leptina, nem mesmo uma ação inibitória (HEIMAN *et al.*, 1997; HOCHÓL *et al.*, 2000; HUANG; RIVEST; RICHARD, 1998; LICINIO *et al.*, 1997; NISHIYAMA *et al.*, 1999; POWIS; BAINS; FERGUSON, 1998; RABER *et al.*, 1997; SCHWARTZ *et al.*, 1996).

Há indícios da existência de uma alça de controle negativo entre a secreção de ACTH hipofisário e níveis circulantes de leptina (HOCHÓL *et al.*, 2000; SPINEDI; GAILLARD, 1998).

## 2.2 Leptina e reprodução

Receptores de leptina (OB-R) são expressos no plexo coróide, leptomeninges e hipotálamo (BASKIN *et al.*, 1999; BRANN *et al.*, 2002; FEI *et al.*, 1997; SHIODA *et al.*, 1998; ZAMORANO *et al.*, 1997). Esses receptores localizados no plexo coróide e leptomeninges estão envolvidos no transporte de leptina através da barreira hemato-encefálica (BRANN *et al.*, 2002). No hipotálamo, a isoforma OB-Rb é a predominante, sendo altamente expressa no ARC, VMN e PVN, que são núcleos importantes na regulação da saciedade e da reprodução (BRANN *et al.*, 2002; ELMQUIST *et al.*, 1998; FEI *et al.*, 1997; HAKANSSON *et al.*, 1998; MERCER *et al.*, 1996; ZAMORANO *et al.*, 1997).

Estudos imuno-histoquímicos demonstraram localização similar de proteínas de receptores OB-R nos núcleos hipotalâmicos de ratos e humanos (COUCE *et al.*, 1997; MERCER *et al.*, 1996).

Expressão de RNAm OB-R está presente em neurônios produtores de hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH). Outros sítios extra-hipotalâmicos de OB-R são: hipófise, células epiteliais mamárias, ovários, útero, placenta, testículos e estômago (BRANN *et al.*, 2002; CIOFFI *et al.*, 1997; HOGGARD *et al.*, 1997;

KARLSSON *et al.*, 1997; KITAWAKI *et al.*, 2000; MIX *et al.*, 2000; ZAMORANO *et al.*, 1997).

Receptores  $\alpha$  de estrogênios foram identificados co-localizados em neurônios positivos para OB-R no hipotálamo de ratas (DIANO *et al.*, 1998), indicando que o estrogênio regula níveis hipotalâmicos de OB-R (BRANN *et al.*, 2002).

Bennett *et al.* (1998) demonstraram que o tratamento com 17- $\beta$  estradiol em ratas ooforectomizadas diminui a expressão do gene OB-Rb no ARC e VMN. Em estudo posterior, esses mesmos autores relataram que os níveis de OB-R no ARC e VMN não se correlacionaram com níveis de estradiol em ratas ciclando regularmente (BENNETT *et al.*, 1999).

Uma queda nos níveis de RNAm OB-R no proestro foi constatada no plexo coróide, que foi inversamente correlacionado com os níveis circulantes de 17- $\beta$  estradiol (BRANN *et al.*, 2002).

Níveis extra-hipotalâmicos de OB-R podem estar sujeitos à regulação por esteróides, como os níveis de RNAm OB-R no endométrio, que flutuam durante todo o ciclo menstrual em humanos, com níveis mais altos na fase lútea precoce (BRANN *et al.*, 2002; KITAWAKI *et al.*, 2000).

O dimorfismo sexual está presente nas concentrações de leptina. Fêmeas apresentam níveis plasmáticos mais altos que os machos, independentemente do índice de massa corporal (IMC) e da distribuição da gordura corporal. O mecanismo para o entendimento desse dimorfismo ainda não está completamente esclarecido. Portanto, alguns trabalhos sugerem que a função gonadal e, conseqüentemente, os níveis de esteróides sexuais circulantes podem exercer papel importante na regulação da expressão e produção do gene da leptina. A partir dessa teoria, observou-se diminuição da expressão de RNAm leptina em tecido adiposo subcutâneo, retroperitoneal, perimétrico e peri-renal em ratas ooforectomizadas. Os níveis de leptina diminuíram após oito semanas em ratas ooforectomizadas e reverteram-se com o tratamento de 17-  $\beta$ -estradiol

(SHIMIZU *et al.*, 1997). Por outro lado, alguns autores observaram aumento da expressão do gene da leptina e dos níveis plasmáticos de leptina em ratas ooforectomizadas (BRANN *et al.*, 1999; MACHINAL *et al.*, 1999).

A localização do receptor de leptina no eixo hipotálamo-hipófise indica que essa proteína influencia o controle neuroendócrino da reprodução (BRANN *et al.*, 2002). A leptina estimula a liberação de gonadotrofinas por intermédio da hipófise e/ou agindo em regiões hipotalâmicas (BRANN *et al.*, 2002; YU *et al.*, 1997b).

Estudos em cultura de tecidos hipofisários demonstraram que a leptina induziu de maneira dose-dependente o aumento na liberação de hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH) e prolactina (BRANN *et al.*, 2002; YU *et al.*, 1997b).

A leptina aumenta a secreção de GnRH *in vitro* de fragmentos hipotalâmicos do núcleo ARC e eminência média (BRANN *et al.*, 2002; YU *et al.*, 1997b). Em fragmentos do hipotálamo retroquiasmático, a leptina aumentou também a amplitude de pulso em todas as fases do ciclo estral em ratas, mas não a aumentou em ratos (BRANN *et al.*, 1999; PARENT *et al.*, 2000).

Além do mais, a leptina pode atuar diretamente nos neurônios produtores de GnRH ou indiretamente através de interneurônios para a liberação de GnRH (BRANN *et al.*, 2002).

O peptídeo regulador cocaína–anfetamina (CART), expresso na eminência média, pode mediar em parte a ação da leptina, demonstrando que tratamento com anticorpo CART atenua a estimulação da pulsatilidade de GnRH, enquanto um antagonista do receptor NPY Y5 mostrou-se sem efeito na ação da leptina (PARENT *et al.*, 2000) que, por sua vez, diminui o RNAm NPY no hipotálamo; e o NPY estimulou a secreção de GnRH (BRANN *et al.*, 2002).

A leptina sofre influência dos hormônios esteroidais e pode atuar estimulando a liberação de LH, sendo hipotetizado, o que pode ser um importante sinal no

desenvolvimento da puberdade. Alguns autores, entretanto, acreditam que ela não é o sinal primário para o início da puberdade, mas atua como fator permissivo (CHEUNG *et al.*, 1997). Estudos em ratos descreveram que níveis de leptina aumentaram com 47 dias, coincidindo com a elevação da testosterona. Isso permitiu concluir que em ratos não se verificou a ação da leptina no começo da puberdade (NAZIAN; CAMERON, 1999). Em ratas, houve aumento dos níveis de leptina na fase juvenil tardia do desenvolvimento, diminuindo no período peripuberal. A leptina não agiu na liberação de LH de ratas nas quatro fases do ciclo estral durante o primeiro ciclo estral (BRANN *et al.*, 2002; DEARTH; HINEY; DEES *et al.*, 2000).

O controle da leptina na reprodução tem sido intensamente estudado. Mecanismos de ativação de vias de sinalização intracelular e ações neuroendócrinas são importantes no controle da reprodução. A chave do efeito neuroendócrino reprodutivo é a regulação da secreção de gonadotrofinas. A ação da leptina é alcançada por meio de seus efeitos no hipotálamo controlando a liberação de GnRH, além de efeitos diretos na hipófise (BRANN *et al.*, 2002).

### 2.3 Leptina e eixo hipotálamo-hipófise-ovariano

Sabe-se que a leptina atua na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano. Lebrethon *et al.* (2000b) e Moschos, Chan e Montzoros (2002) relataram que ela acelera a pulsatilidade do GnRH, mas não a amplitude em neurônios do núcleo arcuado de maneira dose-dependente. Cunningham, Clifton e Steiner (1999) observaram a presença de receptores de leptina em neurônios secretores de GnRH. Magni *et al.* (1999), estudando *in vitro* neurônios secretores de GnRH, referiram que a leptina estimula a liberação de GnRH.

O mecanismo pelo qual a leptina atua na liberação de GnRH é predominantemente indireto, agindo nos interneurônios secretores de neuropeptídeos como CART, peptídeo galanina símile e/ou hormônio concentrador de melanocortina na zona incerta do hipotálamo. A leptina pode aumentar a liberação de óxido nítrico de interneurônios adrenérgicos que

induzem a liberação de GnRH e de seus neurônios secretores por meio da ativação da guanilato-ciclase e da ciclooxygenase 1 (JUREUS *et al.*, 2000; LEBRETHON *et al.*, 2000b; MURRAY *et al.*, 2000; PARENT *et al.*, 2000; YU *et al.*, 1997a).

O neuropeptídeo Y (NPY) pode ter efeito estimulatório ou inibitório na secreção de GnRH, dependendo do sítio de administração, espécie, sexo e se injetado aguda ou cronicamente. A exposição de NPY aguda em hipotálamos de ratos pré-puberes aumenta a pulsatilidade da secreção de GnRH, enquanto a administração crônica no sistema intracérebro-ventricular (ICV) inibe-o (LEBRETHON *et al.*, 2000a; PIERROZ *et al.*, 1996).

É evidente que a leptina não é o único regulador da secreção de GnRH, mas atua juntamente com outras moléculas por meio de distintas vias de sinalização e mecanismos (TERASAWA, 1998).

Já na hipófise anterior, ela tem efeito direto, devido a 90% dos gonadotrofos da haste hipofisária e 30% dos gonadotrofos da parte distal expressarem seus receptores. Ela pode estimular diretamente a liberação de LH e, em menor extensão, o FSH via ativação da óxido nítrico sintase (NOS) nos gonadotrofos (IQBAL *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 1999; YU *et al.*, 1997a).

A leptina pode agir de maneira endócrina ou parácrina nas gônadas devido à presença de receptores na superfície de células foliculares, incluindo teca, granulosa, células intersticiais e células de Leydig (CAPRIO *et al.*, 1999; KARLSSON *et al.*, 1997). Injetada periodicamente *in vivo* ou em ovários perfundidos *in vitro*, reduz as ovulações sem alterar o número de folículos pré-ovulatórios ou a secreção de esteróides na ausência de aumento de fatores de crescimento (DUGGAL *et al.*, 2000). Em médias e altas doses fisiológicas, a leptina parece antagonizar o efeito aumentado de vários fatores de crescimento, como fator de crescimento insulino-símile-1 (IGF-1); fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ); insulina; e glucocorticóides na esteroidogênese estimulada por FSH/ LH em células da teca ovariana e do folículo durante o ciclo

menstrual. Concentrações altas no ovário suprimem a produção de estradiol e interferem no desenvolvimento e na maturação de folículos (AGARWAL *et al.*, 1999; BARKAN *et al.*, 1999; BRANNIAN; HANSEN, 2002; KITAWAKI *et al.*, 1999; MOSCHOS; CHAN; MANTZOROS, 2002; SPICER; FRANCISCO, 1998; ZACHOW; WEITSMAN; MAGOFFIN, 1999).

O efeito indireto da leptina na reprodução pode ser relatado pela sua alteração no metabolismo periférico, aumentando a captação de glicose, gluconeogênese hepática e oxidação de ácidos graxos e carboidratos (KAMOHARA *et al.*, 1997, ZHOU *et al.*, 1997).

Em *hamsters*, a interrupção do ciclo estral e do comportamento sexual induzido pela inibição da glicose intracelular e oxidação de ácidos graxos pode não ser revertida pela administração de leptina, implicando que esta deve atuar em nível mais alto da via metabólica ou através de outras vias metabólicas ou não metabólicas, o que significa que a reprodução ocorre normalmente (MOSCHOS; CHAN; MANTZOROS, 2000; SCHNEIDER; ZHOU, 1999).

#### 2.4 Leptina e ciclo estral

Vários trabalhos referenciaram que a leptina atua como importante regulador do eixo hipotálamo-hipófise-ovariano. Carro *et al.* (1997), estudando o efeito dessa proteína na pulsatilidade de LH e ciclo estral em ratas adultas *Sprague-Dawley*, encontraram que a administração de soro antileptina no sistema intracérebro-ventricular diminui significativamente a pulsatilidade do LH em relação ao grupo-controle, além das ratas permanecerem em anestro. Os autores concluíram que o soro antileptina prejudica a função reprodutiva e influencia a secreção de LH e o ciclo estral.

Shimizu *et al.* (1997) analisaram o envolvimento do estrogênio na produção de leptina *in vivo* em ratas *Wistar*, ooforectomizadas, analisadas após dois e oito semanas da cirurgia. Em metade dos animais foram colocados implantes



contendo benzoato de estradiol e a outra metade foi analisada sem medicamento. Observou-se aumento significativo na ingestão de alimentos e no peso dos animais ooforectomizados, que foi atenuado com o implante de estrogênios. Os níveis de leptina foram mais baixos nas ratas ooforectomizadas do que nas controles. Nas ratas submetidas à suplementação de estrogênios, os níveis de leptina elevaram significativamente seus níveis plasmáticos, destacando que o estrogênio está envolvido na regulação da expressão do gene *ob*.

Avaliando as concentrações de leptina no soro de ratas durante o ciclo estral normal, ratas grávidas e em lactação, Amico *et al.* (1998) verificaram que as concentrações de leptina sérica não variaram significativamente durante o ciclo estral nas ratas normais. Por outro lado, aumentaram significativamente na prenhez avançada. Após o parto, houve declínio nos níveis dessa proteína, que se mantiveram estáveis durante toda a lactação. Ratas prenhas sacrificadas entre o 14<sup>o</sup> e o 21<sup>o</sup> dia apresentaram aumento de quatro a cinco vezes na quantidade de RNAm da leptina placentária, traduzindo a possibilidade da leptina desempenhar papel fisiológico na gravidez e lactação.

Pinilla *et al.* (1999), investigando a regulação dos níveis séricos da leptina em relação a sexo e função gonadal em ratos, encontraram que nas fêmeas eles foram mais altos que nos machos e que essas concentrações não foram influenciadas pela fase do ciclo estral. Ambos os sexos, após a orquiectomia e ooforectomia, apresentaram elevação desses níveis. Nos machos, após orquiectomia, essas mudanças nos níveis de leptina foram dependentes das alterações observadas no peso corporal desses animais, já que, quando comparados a animais intactos de mesmo peso, não se verificaram alterações. Em fêmeas ooforectomizadas, as alterações não foram dependentes das mudanças no peso corporal, diferentemente do que ocorreu com ratas intactas do mesmo peso e na mesma fase do ciclo estral, o que sugere que as concentrações da leptina são controladas pela função gonadal diretamente ou como uma consequência de mudança do peso corporal.

Estudo em ratos e ratas com o mesmo peso revelou dimorfismo sexual nos níveis de leptina, ou seja, as fêmeas apresentaram níveis mais altos dessa substância (WATANOBE; SUDA, 1999). Como na pesquisa anterior (PINILLA *et al.*, 1999), ratos orquiectomizados exibiram elevação significativa dos níveis de leptina. A reposição de testosterona em doses fisiológicas nesses animais aboliu completamente o efeito da orquiectomia. Nas fêmeas, os níveis de leptina não foram alterados durante o ciclo estral nem após ooforectomia ou após a reposição de dose fisiológica de estrógenos, progesterona ou ambos.

Bennett *et al.* (1999) verificaram que doses farmacológicas de estradiol diminuíam a expressão de receptores de leptina no hipotálamo. Analisaram a expressão dos receptores de leptina durante o ciclo estral na rata, por meio de técnica histoquímica de hibridização *in situ* radioativa, e relataram no plexo coróide que a transcrição total do receptor de leptina foi mais baixa na fase de proestro, correspondendo inversamente a níveis de estradiol circulante na rata com ciclo estral normal. Concluíram que a expressão dos receptores de leptina é regulada durante o ciclo estral (BENNETT *et al.*, 1999).

A pesquisa de Nagatani, Guthikonda e Foster (2000) em ratas descreveu o aparecimento de um pico noturno na secreção de leptina, que começou no 28<sup>o</sup> dia de vida, aumentou na amplitude até o 32<sup>o</sup> e o 36<sup>o</sup> dias e permaneceu até a última, no 48<sup>o</sup> dia (ratas adultas na fase diestro do ciclo estral). Além da abertura vaginal que ocorre geralmente com 35 dias, a prolactina considerada índice endócrino de puberdade não exibiu ritmo diurno, mas aumentou seus níveis no 32<sup>o</sup> ao 48<sup>o</sup> dia do nascimento, indicando que o aparecimento do ritmo noturno da leptina e o aumento dos níveis de leptina plasmática são importantes para a sinalização do começo da puberdade.

A leptina atua como uma alça de retroalimentação negativa para o controle hipotalâmico do apetite a partir da supressão da secreção do NPY e como estimulação do CART. Com o objetivo de analisar os efeitos de leptina, CART e NPY, Parent *et al.* (2000) investigaram os efeitos no controle hipotalâmico do sistema hipófise-gonadal. Estudando *in vitro* fragmentos retroquiasmáticos de

ratas adultas, destacaram que a amplitude de pulso do GnRH foi significativamente aumentada pela leptina e CART, independentemente da fase do ciclo estral. Em machos não foram registradas essas alterações. O NPY causou discreto, mas significativo, aumento na amplitude de pulso de GnRH em fêmeas. A leptina causou efeito facilitador específico na amplitude de pulso do GnRH, que é mediado pelo CART e ocorre independentemente da fase do ciclo estral.

Tanaka *et al.* (2001) analisaram as mudanças nos níveis séricos de leptina durante o ciclo estral de ratas normais e ooforectomizadas e as mudanças ocorridas pela indução de 17  $\beta$ -estradiol. Revelaram que os níveis séricos de leptina alteram-se durante o ciclo estral, com pico na fase de proestro, evidenciando que esse aumento induzido pelo estrogênio pode ser um gatilho para a liberação de LH pré-ovulatório.

Os efeitos da leptina *in vitro* na liberação do pico de LH pela hipófise anterior em ratas, espontaneamente e induzida por esteróides sexuais, foram analisados por De Biasi, Apfelbaum e Apfelbaum (2001). Eles concluíram que a leptina aumenta a liberação de LH em todas as fases do ciclo estral, ocorrendo o maior estímulo na fase de proestro e o menor no diestro I. Sua ação na hipófise é similar à do GnRH, porém com potência significativamente menor. Portanto, a leptina estimula a liberação do pico de LH pela hipófise anterior e sua ação é mediada pelos esteróides sexuais e pelo óxido nítrico.

Luukkaa *et al.* (2001) encontraram em ratas com ciclo estral normal que os níveis plasmáticos de leptina estavam significativamente diminuídos no estro na comparação com o proestro. Em ratas ooforectomizadas, a reposição com estrogênios e/ou progesterona não modificou os níveis de leptina, indicando o improvável papel dos esteróides na regulação de leptina.

Avaliando as isoformas de receptores de leptina durante o ciclo estral nos ovários de ratas maduras, Duggal *et al.* (2002) verificaram que a expressão RNAm de receptores OB-Rb foi menor durante as fases do proestro e diestro II e elevada

durante o estro e diestro I. As concentrações plasmáticas de estradiol foram maiores durante o proestro do que nas outras três fases do ciclo estral. Os níveis de estradiol foram similares no diestro I, diestro II e estro. Os níveis de progesterona foram mais altos no diestro I e diestro II do que no proestro e estro. Esses autores ressaltaram que as flutuações do RNAm dos receptores de leptina podem ser uma resposta para as concentrações de esteróides circulantes e de leptina e que as concentrações de receptores desta última variam durante o ciclo estral em resposta a mudanças no ambiente ovariano.

Também usando a imuno-histoquímica, Ryan *et al.* (2003) constataram em ovários de ratas o aumento da expressão protéica da forma longa do receptor da leptina (OB-Rb), com mais intensidade nos oócitos, células endoteliais, assim como células da teca e corpo lúteo. Perceberam que a expressão ovariana da leptina é regulada durante o ciclo estral pelas gonadotrofinas com o pico da expressão na ovulação, ocorrendo possível envolvimento na maturação oocitária, na angiogênese, na ruptura folicular ou na subsequente formação do corpo lúteo.

## 2.5 Leptina e melatonina

A glândula pineal secreta o hormônio melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) envolvido em uma série de processos fisiológicos, incluindo a regulação dos ritmos endócrinos, efeitos antigonadotróficos, efeitos neuroprotetores e estimulação da função imune (BAYDAS *et al.* 2001; CANPOLAT *et al.*, 2001; FORSLING *et al.* 1993; GUERREIRO; REITER, 1992; KILIC *et al.*, 1999; KUS *et al.*, 2004; YILMAZ *et al.*, 2000). Tem-se também encontrado que a melatonina pode regular a musculatura lisa (AYAR *et al.*, 2001). Ao lado dessas funções, ela pode ter efeito regulador na liberação de leptina (CANPOLAT *et al.*, 2001). Estudos são contraditórios em relação à melatonina e à liberação de leptina. Alguns descreveram que a administração de melatonina suprime os níveis plasmáticos de leptina em ratos (BAYDAS *et al.*, 2001; CANPOLAT *et al.*, 2001; RASMUSSEN *et al.* 1999; WOLDEN-HANSON *et al.*, 2000). Em contrapartida, Mastronardi *et al.* (2000) relataram níveis plasmáticos mais baixos de leptina à noite após a administração de melatonina (1 mg/rato), não havendo efeito na liberação de leptina durante a manhã.

O mecanismo pelo qual a pinealectomia aumenta e a administração de melatonina diminui a liberação de leptina permanece a ser determinado no rato (CANPOLAT *et al.*, 2001). Acredita-se que a melatonina tem efeito direto nos adipócitos, bloqueando a via de transporte de ácidos graxos por meio de mecanismo mediado pelo seu receptor (BLASK *et al.*, 1999, *apud* CANPOLAT *et al.* 2001).

A administração aguda ou crônica de melatonina diminui a liberação de leptina sem afetar a gordura corporal total. Sua função mais conhecida é fornecer informação do fotoperíodo (CANPOLAT *et al.*, 2001).

Yilmaz *et al.* (2000) referenciaram que a melatonina inibe a liberação de gonadotrofinas no hipotálamo, enquanto a leptina estimula a secreção de gonadotrofinas (McCANN *et al.*, 1998).

A melatonina não regula o ciclo circadiano da leptina em ratos *Wistar* e a melatonina fisiologicamente liberada inibe a liberação de leptina (BAYDAS *et al.*, 2001).

Kus *et al.* (2004) avaliaram 18 amostras de hipófises de ratos *Wistar*, incluindo pinealectomizados, *sham* e pinealectomizados recebendo 3mg/kg de melatonina por via subcutânea, e constataram que a pinealectomia estimula a secreção de leptina na hipófise anterior, podendo esse aumento ser prevenido com a administração de melatonina exógena.

### **3 OBJETIVO**

Determinar os níveis plasmáticos de leptina em ratas adultas *Wistar* submetidas ao estresse cirúrgico, ao estresse luminoso e ao estresse com ausência de luz.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Material

Realizou-se estudo prospectivo em 60 ratas adultas *Wistar* (90 dias, 155-250 g de peso) mantidas em ciclo dia-noite de 12:12 horas, em temperatura ambiente de 23° Celsius, condicionadas a dieta padrão e suprimento de água *ad libitum*.

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- Grupo I: as ratas (n=14) tiveram seu ciclo estral rastreado por citologia vaginal, coletado por lavado vaginal em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, diariamente, das oito às 10 horas da manhã. Na fase de proestro, após o seguimento de dois ciclos estrais completos para averiguação da ciclicidade ovariana, foi realizada a coleta de sangue por decapitação 24 horas após a determinação do proestro. A amostra foi obtida em um tubo

de ensaio de 5 mL contendo 10 UI de heparina e centrifugada à temperatura de 4° Celsius, com velocidade de 2.500 rotações por minuto (rpm), em rotor de 40, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi pipetado e estocado em microtubos de *ependorff* a -20° Celsius.

- Grupo II: as ratas (n=16) tiveram seu ciclo estral rastreado por citologia vaginal, coletado por lavado vaginal em solução de NaCl 0,9%, diariamente, das oito às 10 horas da manhã. Na fase de proestro, após seguimento de dois ciclos estrais completos para averiguação da ciclicidade ovariana, foi realizada laparotomia usando o tribromoetanol a 2,5% em solução de NaCl 0,9%, na dosagem de 1 mL para cada 100 mg de peso, por via intraperitoneal. A coleta de sangue por decapitação foi realizada 24 horas após a realização da cirurgia. A amostra foi obtida em tubo de ensaio de 5 mL contendo 10 UI de heparina e centrifugada à temperatura de 4° Celsius, com velocidade de 2.500 rpm, em rotor de 40, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi pipetado e estocado em microtubos de *ependorff* a -20° Celsius.
- Grupo III: as ratas (n=15) tiveram seu ciclo estral rastreado por citologia vaginal, coletado por lavado vaginal em solução de NaCl 0,9%, diariamente, das oito às 10 horas da manhã. Na fase de proestro, após seguimento de dois ciclos estrais completos para averiguação da ciclicidade ovariana, foram acondicionadas em gaiolas de plásticos de coloração preta medindo 17 cm de altura x 47 cm de comprimento x 30 cm de largura, em ambiente com ausência de luz durante 24 horas. A coleta de sangue por decapitação foi realizada 24 horas após esse estímulo. A amostra foi obtida em tubo de ensaio de 5 mL contendo 10 UI de heparina e centrifugada à temperatura de 4° Celsius, com velocidade de 2.500 rpm, em rotor de 40, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi pipetado e estocado em microtubos de *ependorff* a -20° Celsius.
- Grupo IV: as ratas (n=15) tiveram seu ciclo estral rastreado por citologia vaginal, coletado por lavado vaginal em solução de NaCl 0,9%, diariamente, das oito às 10 horas da manhã. Na fase de proestro, após seguimento de dois ciclos estrais completos para averiguação da ciclicidade ovariana, foram acondicionadas em gaiolas de plásticos de



coloração branca medindo 16 cm de altura x 47 cm de comprimento x 30 cm de largura, em ambiente com estímulo de luz fria (20 watts) durante 24 horas. A coleta de sangue por decapitação foi realizada 24 horas após esse estímulo. A amostra foi obtida em tubo de ensaio de 5 mL contendo 10 UI de heparina e centrifugada à temperatura de 4° Celsius, com velocidade de 2.500 rpm, em rotor de 40, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi pipetado e estocado em microtubos de *ependorff* a -20° Celsius.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Avaliação hormonal

Os níveis séricos de leptina e estradiol foram medidos por análise pelo radioimunoensaio. Os *kits* continham anticorpo contra leptina de ratos (*Linco Research, St Charles, MO, USA*). Os resultados foram em nanogramas (ng/mL). Os *kits* de estradiol continham anticorpo contra estradiol obtido em coelhos (*Adaltis Itália, Casalecchio di Reno, Itália*). Os resultados foram em picogramas (pg/mL).

As amostras de sangue para dosagem da leptina e estradiol foram colhidas de 10 às 11 horas da manhã, 24 horas após a comprovação do proestro (grupo I), 24 horas após a cirurgia (grupo II), 24 horas após a ausência de luz (grupo III) e 24 horas após o estímulo luminoso (grupo IV).

### 4.2.2 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para averiguar a normalidade do peso, leptina e estradiol em cada grupo e na amostra total. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparação das medianas dos pesos entre os quatro grupos. A comparação entre as medianas dos valores de

leptina e estradiol foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis; e o pós-teste de Dunn para comparação entre os pares de grupos quando o teste de Kruskal-Wallis foi considerado significativo. Além disso, utilizou-se a correlação de *Spearman* para avaliar-se a relação entre as duas variáveis de interesse (peso e leptina).

Adotou-se o nível de significância de 5% em todas as análises estatísticas realizadas, sendo determinados intervalos de confiança de 95%.

#### 4.2.3 Método bibliográfico

Para a redação da tese e das referências, foram consultados o Manual para Elaboração e Apresentação de Dissertações e Teses no curso de Pós-graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG (CABRAL *et al.*, 2001) e o Manual para Normalização de Publicações Técnico-Científicas da ABNT (FRANÇA *et al.*, 2007). Os estudos e autores foram obtidos de pesquisa de artigos médicos e científicos na MEDLINE e de livros-texto citados.

## 5 RESULTADOS

Foram estudadas 60 ratas adultas *Wistar* divididas em quatro grupos. A idade dos animais foi de aproximadamente 90 dias  $\pm$  uma semana. No grupo I (n=14), o peso variou de 195,00 a 245,00 g, com mediana de 230,00 g. No grupo II (n=16), o peso foi de 155,00 a 250,00 g, com mediana de 212,50. No grupo III (n=15), de 160,00 a 240,00 g, com mediana de 210,00 g. E no grupo IV (n=15), de 195,00 a 245,00 g, com mediana de 220,00 g. Quando comparadas as medianas do peso dos quatro grupos por meio do teste de Kruskal-Wallis, o resultado demonstrou que não houve diferenças significativas entre elas ( $p=0,2350$ ) - (GRÁF. 1) - (TAB.1).

Ao observar os histogramas e *boxplots*, nota-se que o grupo que apresentou maior variabilidade de peso foi o grupo da cirurgia, enquanto os outros

apresentaram variabilidade semelhante. O *boxplot* demonstra que a distribuição do peso foi aproximadamente a mesma entre os grupos (GRÁF. 2).

A variação da leptina foi, respectivamente: no grupo I, de 0,476 a 6,714 ng/mL, com mediana de 2,667 ng/mL; no grupo II, de 0,384 a 1,448 ng/mL, com mediana de 0,895 ng/mL; no grupo III, de 0,484 a 2,346 ng/mL, com mediana de 1,856 ng/mL; e no grupo IV, de 1,003 a 3,181 ng/mL, com mediana de 2,024 ng/mL (GRÁF. 3).

O grupo II foi o que apresentou menor variabilidade dos valores de leptina e também o mais baixo valor de mediana. O grupo III e o grupo IV tiveram distribuições parecidas em termos de mediana e de variabilidade (GRÁF. 4).

A variação do estradiol foi, respectivamente: no grupo I, de 3,952 a 14,785 pg/mL, com mediana de 4,861 pg/mL; no grupo II, de 2,867 a 5,089 pg/mL, com mediana de 3,679 pg/mL; no grupo III, de 3,709 a 17,479 pg/mL, com mediana de 5,071 pg/mL; no grupo IV, de 4,114 a 13,324 pg/mL, com mediana de 4,715 pg/mL (GRÁF. 5).

O grupo II foi o que apresentou menor variabilidade dos valores de estradiol e também o mais baixo valor da mediana. Os grupos apresentam distribuições parecidas em termos de mediana e de variabilidade (GRÁF. 6).

Com o objetivo de avaliar se o peso e a leptina apresentavam alguma correlação entre si, utilizou-se a análise de correlação de *Spearman*. O coeficiente da correlação de toda a amostra foi de 0,176 ( $p=0,180$ ). No grupo I, o coeficiente da correlação foi de 0,231 ( $p=0,426$ ); no grupo II, de -0,270 ( $p=0,311$ ); no grupo III, de 0,004 ( $p=0,990$ ); e no grupo IV, de 0,411 ( $p=0,128$ ), demonstrando que não houve correlação significativa entre o peso e a leptina em cada grupo (GRÁF.7).

Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk para leptina, peso e estradiol, sugerindo distribuição normal nos grupos II, III e IV para o peso. Já a leptina apresentou distribuição normal apenas nos grupos I, II e IV. O estradiol apresentou distribuição normal somente no grupo II (TAB. 2).

O teste de Kruskal-Wallis para leptina indicou que pelo menos um dos grupos apresentou mediana diferente da dos demais ( $p < 0,001$ ). O teste de Dunn foi realizado para a comparação de medianas entre dois grupos. Comparados os grupos dois a dois, houve diferenças significativas entre as medianas dos grupos I e II ( $p < 0,001$ ), II e III ( $p < 0,05$ ) e II e IV ( $p < 0,01$ ). Não houve diferenças significativas entre as medianas dos grupos I e III ( $p > 0,05$ ), I e IV ( $p > 0,05$ ), III e IV ( $p > 0,05$ ) - (TAB. 3).

O teste de Kruskal-Wallis para estradiol indicou que pelo menos um dos grupos exibiu mediana diferente da dos demais ( $p < 0,001$ ). O teste de Dunn foi realizado para a comparação de medianas entre dois grupos. Comparados os grupos dois a dois, houve diferenças significativas entre as medianas dos grupos I e II ( $p < 0,001$ ), II e III ( $p < 0,001$ ) e II e IV ( $p < 0,01$ ). Não houve diferenças significativas entre as medianas dos grupo I e III ( $p > 0,05$ ), I e IV ( $p > 0,05$ ), III e o grupo IV ( $p > 0,05$ ).

TABELA 1  
Estatísticas descritivas por grupo

	n	Mínimo	Máximo	Percentil 25 1º quartil	Mediana Percentil 50 2º quartil	Percentil 75 3º quartil
<b>Leptina (ng/m)</b>						
Controle	14	0,476	6,714	1,447	<b>2,667</b>	3,968
Cirurgia	16	0,384	1,448	0,628	<b>0,895</b>	1,082
Ausência de Luz	15	0,484	2,346	1,311	<b>1,856</b>	2,204
Estímulo Luminoso	15	1,003	3,181	1,347	<b>2,024</b>	2,370
<b>Peso (gramas)</b>						
Controle	14	195,000	245,000	198,750	<b>230,000</b>	236,250
Cirurgia	16	155,000	250,000	195,000	<b>212,500</b>	230,000
Ausência de Luz	15	160,000	240,000	200,000	<b>210,000</b>	220,000
Estímulo Luminoso	15	195,000	245,000	205,000	<b>220,000</b>	235,000
<b>Estradiol (pg/mL)</b>						
Controle	14	3,952	14,785	4,384	<b>4,861</b>	5,859
Cirurgia	16	2,867	5,089	3,309	<b>3,679</b>	4,192
Ausência de Luz	15	3,709	17,479	4,167	<b>5,071</b>	5,328
Estímulo Luminoso	15	4,114	13,324	4,363	<b>4,715</b>	5,303

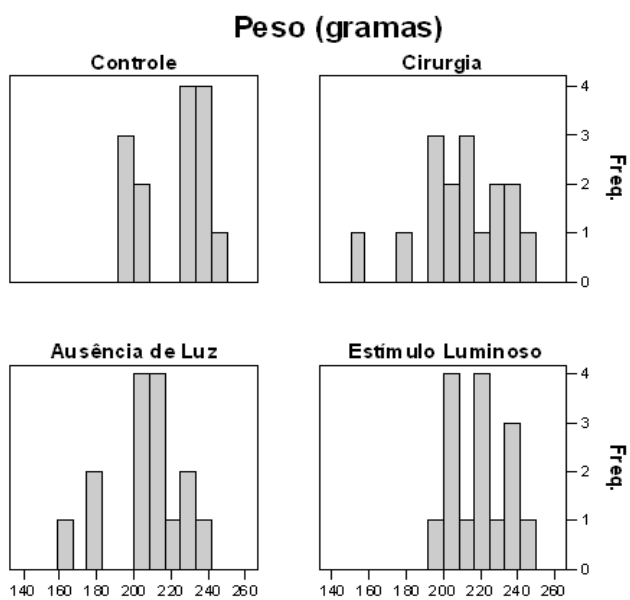


GRÁFICO 1 – Distribuição das ratas quanto ao peso, por grupo.

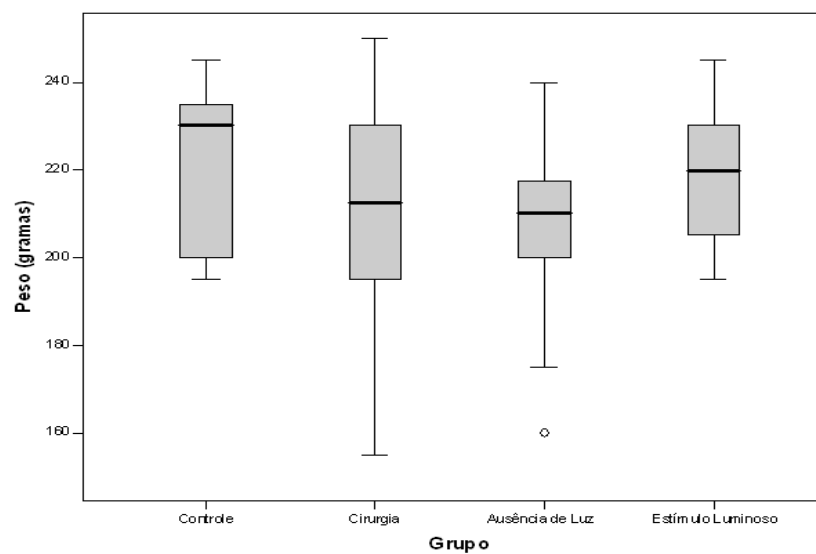


GRÁFICO 2 – *Boxplot* da distribuição do peso, por grupo.

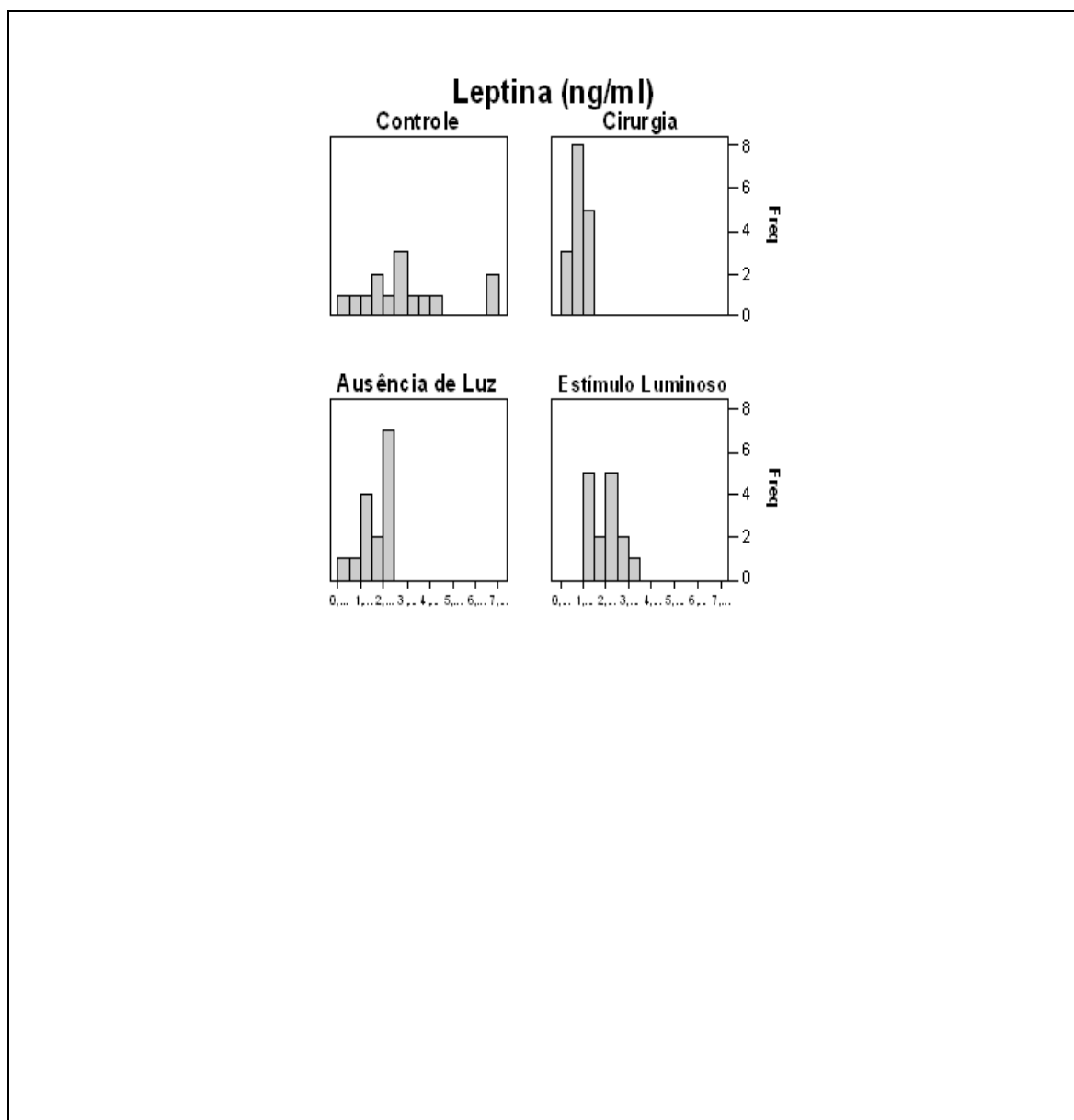


GRÁFICO 3 – Distribuição por frequência dos valores de leptina, por grupo.

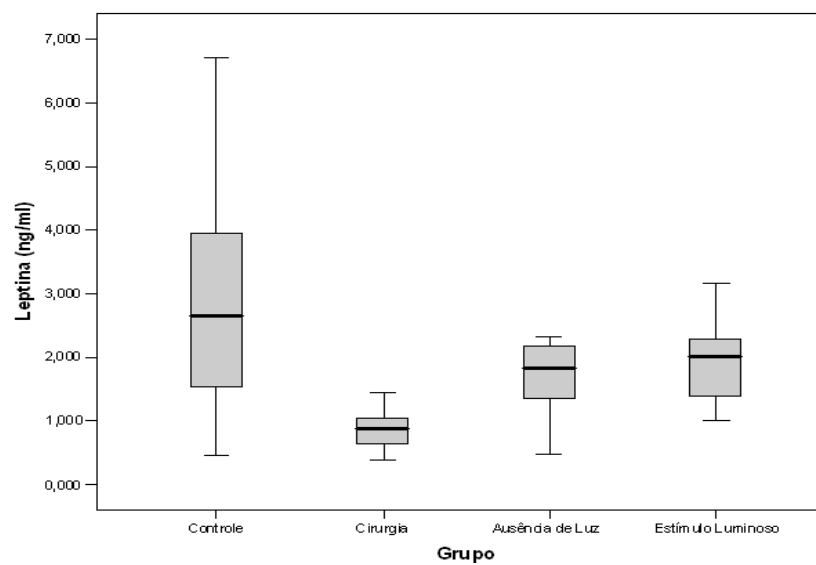


GRÁFICO 4 – *Boxplot* dos valores de leptina, por grupo.



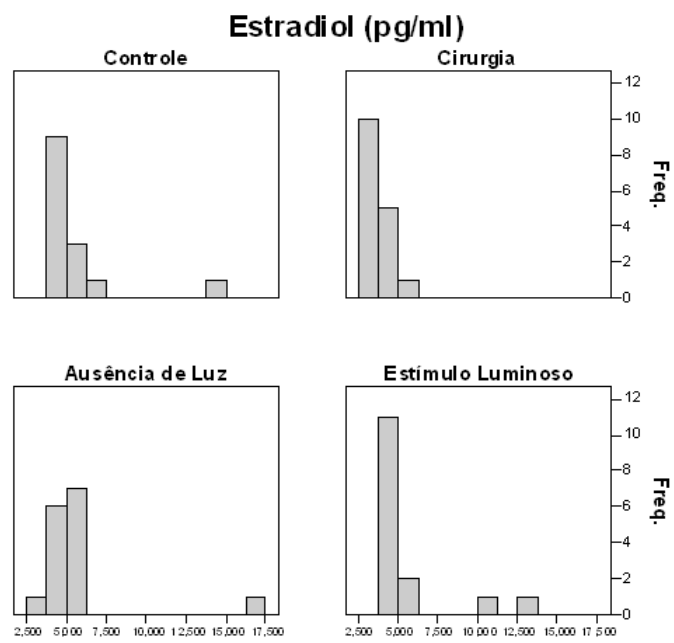


GRÁFICO 5 – Distribuição por frequência dos valores de estradiol, por grupo.

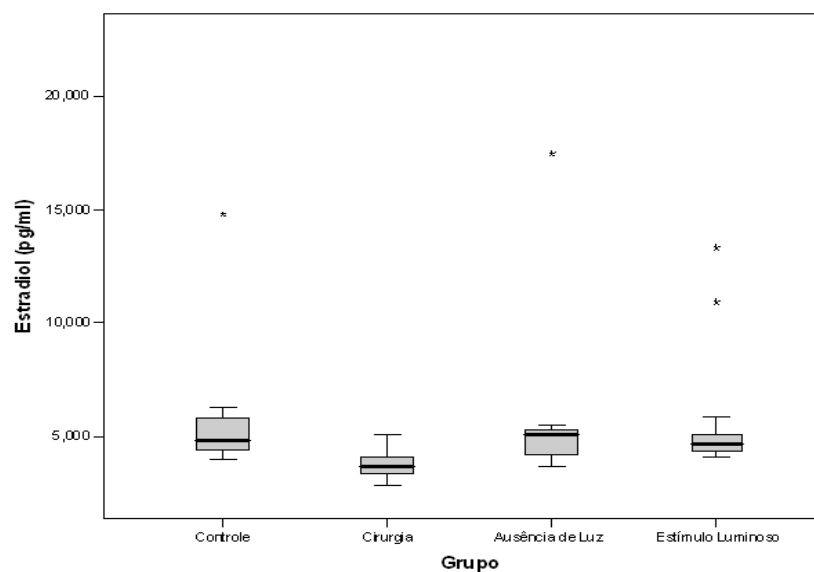


GRÁFICO 6 – *Boxplot* dos valores de estradiol, por grupo.

TABELA 2

Testes de normalidade de Shapiro-Wilk – por grupo

	n	Shapiro-Wilk k	Valor-p
<b>Leptina (ng/mL)</b>	6	0,810	<b>0,000</b>
<b>Controle</b>	14	0,898	0,104
<b>Cirurgia</b>	16	0,959	0,645
<b>Ausência de Luz</b>	15	0,872	<b>0,036</b>
<b>Estímulo Luminoso</b>	15	0,955	0,608

<b>Peso (gramas)</b>	6	0,957	<b>0,034</b>
<b>Controle</b>	1	0,824	<b>0,010</b>
<b>Cirurgia</b>	4	0,970	0,836
<b>Ausência de Luz</b>	1	0,957	0,648
<b>Estímulo Luminoso</b>	5	0,928	0,251
<b>Estradiol (pg/mL)</b>	6	0,550	<b>0,000</b>
<b>Controle</b>	1	0,540	<b>0,000</b>
<b>Cirurgia</b>	4	0,947	0,438
<b>Ausência de Luz</b>	1	0,443	<b>0,000</b>
<b>Estímulo Luminoso</b>	5	0,577	<b>0,000</b>

TABELA 3

Resultados do teste Kruskal-Wallis para leptina e dos testes de Dunn para comparação dois a dois dos quatro grupos

	<b>Kruskal-Wallis</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Todos os grupos</b>	23,1	p < <b>0,001</b>
<b>Pós teste</b>	<b>Dunn</b>	<b>Valor-p</b>
Controle x <b>Cirurgia</b>	28,6	p < <b>0,001</b>
Controle x Ausência de Luz	9,50	p > 0,05
Controle x Estímulo Luminoso	5,76	p > 0,05
<b>Cirurgia</b> x Ausência de Luz	-19,1	p < <b>0,05</b>
<b>Cirurgia</b> x Estímulo Luminoso	-22,8	p < <b>0,01</b>
Ausência de Luz x Estímulo Luminoso	-3,73	p > 0,05

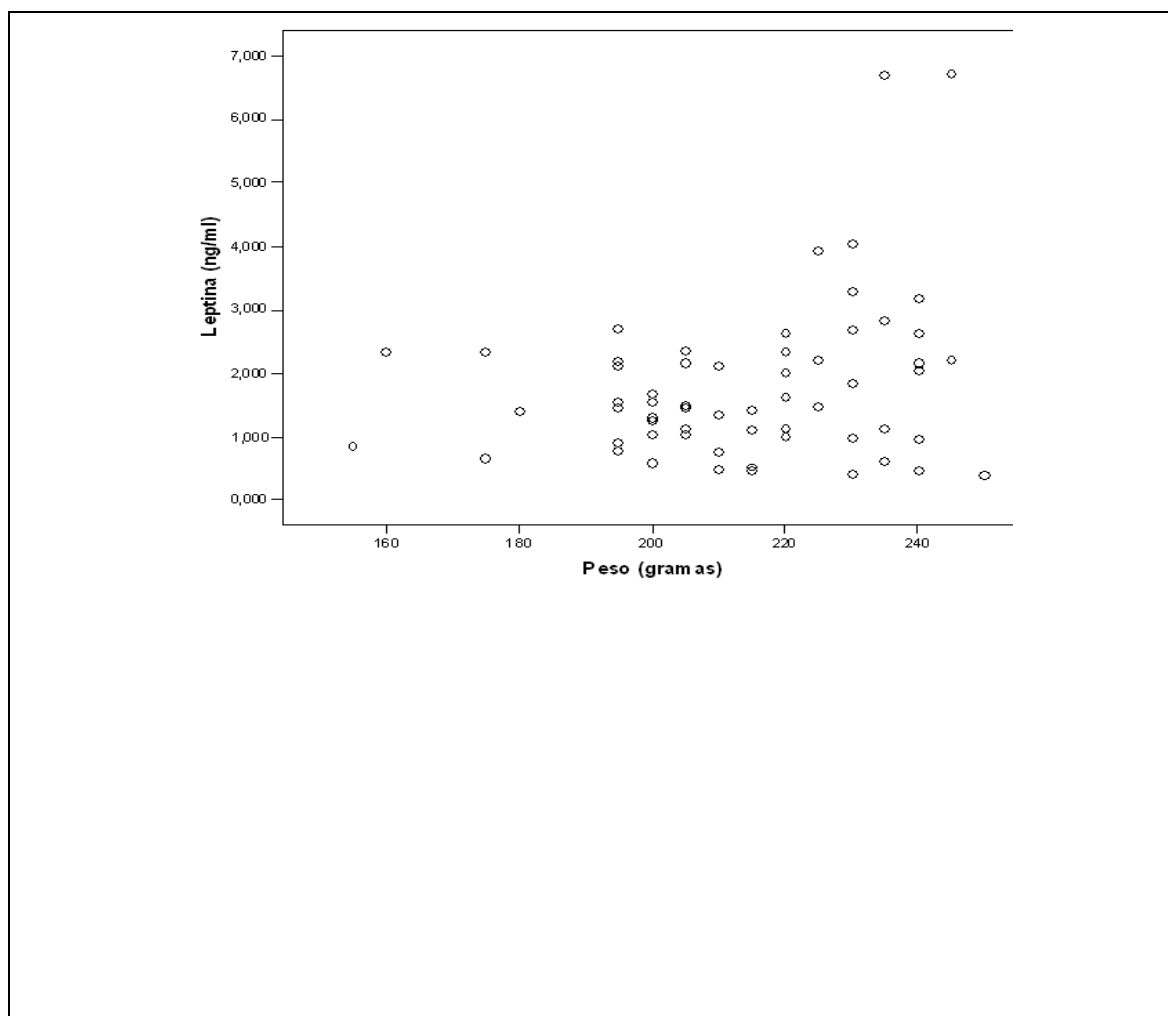


GRÁFICO 7 - Gráfico de dispersão: todas as observações.

	<b>r-Spearman</b>	<b>Valor p</b>	<b>Conclusão</b>
<b>Grupos juntos</b>	0,176	0,180	Correlação não significativa

## 6 DISCUSSÃO

Os mecanismos pelos quais a leptina regula a atividade do eixo HPA não estão completamente elucidados. Como a leptina participa na termorregulação e é reconhecida por aumentar a utilização de energia nos tecidos, uma possibilidade seria que o déficit de disponibilidade de glicose ativaria o eixo HPA, evidenciado

pelo aumento de ACTH e corticosterona e pela diminuição na secreção de LH durante uma transitória glicoprivação produzida por um antagonista competitivo da glicose, a 2-Deoxiglicose (2-DG). Poderia haver também relação direta entre leptina e eixo HPA (NAGATANI *et al.*, 1998; NAGATANI; THOMPSON; FOSTER, 2001).

A leptina tem a capacidade de diminuir a resposta de diferentes tipos de estresse e de permitir que estes regulem sua secreção. Estudando dois tipos de estresses em ratos, um não metabólico (imobilização por duas horas) e o outro o qual foi denominado de metabólico, em que foi usado o 2-DG, IV, 400 mg/kg, observou-se que durante o estresse metabólico o nível plasmático de leptina diminuiu, o de corticosterona aumentou e a secreção de LH diminuiu. A leptina administrada após o estresse reduziu os níveis plasmáticos de corticosterona, mas não restaurou a pulsatilidade da secreção de LH. Durante o estresse de contenção (não-metabólico), os níveis plasmáticos de leptina não se alteraram, os níveis plasmáticos da corticosterona aumentaram e a secreção de LH diminuiu, não ocorrendo alterações nos níveis plasmáticos de corticosterona e LH após a administração de leptina (NAGATANI; THOMPSON; FOSTER, 2001). Isto enfatiza a capacidade da leptina de atuar em determinados tipos de estresse, como a prevenção da elevação dos níveis de corticosterona e o estresse metabólico, provocado pelo 2-DG, mas não de prevenir esse aumento da corticosterona quando do estresse de contenção, ao contrário do que relataram Heiman *et al.* (1997).

O tipo de estresse também influencia a secreção de leptina. No estresse metabólico, provocado pelo 2-DG, houve inibição da secreção de leptina endógena quando a corticosterona começou a elevar-se. O estresse por contenção não alterou os níveis de leptina endógena (NAGATANI; THOMPSON; FOSTER, 2001).

A leptina não preveniu o aumento de corticosterona induzido por estresse não metabólico, mas preveniu o aumento da corticosterona induzida por estresse metabólico. A diminuição nos níveis plasmáticos de leptina provocada pelo jejum

é revertida pela administração de insulina. A insulina é um potente estimulador da secreção de leptina e o metabolismo de glicose medeia o aumento da secreção *in vitro* (MUELLER *et al.*, 1998; NAGATANI; THOMPSON; FOSTER, 2001; SALADIN *et al.*, 1995).

A administração de leptina atenua o aumento de ACTH e corticosterona em camundongos submetidos ao estresse de contenção, como também foi verificado em ratos submetidos ao jejum. Essa inibição deve ser exercida no nível hipotalâmico, porque a leptina inibe a liberação de CRH em resposta à hipoglicemia, sem alterar a liberação de ACTH diretamente (HEIMAN *et al.*, 1997).

A relação entre HPA e a supressão da secreção de LH leva a concluir que o componente hipotalâmico é o responsável pela supressão de LH, visto que a injeção intracraniana de CRH em ratos deprime a secreção de LH e o antagonista de CRH bloqueia o declínio dos níveis séricos de LH em determinados tipos de estresse (estímulo elétrico). É possível que a ação da leptina seja mediada por neurônios liberadores de CRH e não no nível da glândula adrenal e hipófise. Evidências mostram que o mecanismo que regula a leptina no eixo do estresse é independente do eixo da reprodução, visto que a leptina conseguiu inibir o aumento de corticosterona, mas não conseguiu restabelecer os níveis de LH no estresse de glicoprivação. Portanto, durante o estresse, uma outra via deve ser acionada inibindo a secreção de LH e que não envolva a hipófise e adrenal. Axônios terminais de neurônios liberadores de CRH entram em contato com dendritos de neurônios liberadores de GnRH na região pré-óptica de ratos. A infusão de CRH inibe a secreção de GnRH na eminência média (NAGATANI; THOMPSON; FOSTER, 2001).

Trabalhos demonstraram que tanto a leptina como o NPY estão envolvidos no controle do eixo-hipotálamo-adrenal, sugerindo efeito estimulatório ou inibitório. A administração de leptina induz a ativação transitória desse eixo em ratos em condições basais. Alguns tipos de estresse o ativam com diferentes mecanismos. Submetendo ratos a estresse por frio e por éter, a administração de leptina

aumentou os níveis plasmáticos de ACTH com duas e quatro horas após o estresse com frio (ratos em gaiolas a 4° Celsius por 10 minutos). Ratos colocados por dois minutos em uma jarra de 10 litros borrifada com éter 10 minutos antes exibiram aumento nos níveis de ACTH com duas horas e queda nesses valores com quatro horas, concordando com os resultados de Heiman *et al.* (1997), que afirmaram que a leptina atenua a resposta ao estresse. Nestes dois tipos específicos de estresses, diferentes mecanismos neurais são envolvidos na ativação do HPA (HOCHÓL *et al.*, 2000).

Com o intuito de avaliar a existência de modificações nos níveis plasmáticos de leptina, quatro grupos de ratas foram comparados na mesma fase do ciclo estral, submetidos a três tipos diferentes de estresse agudo. Um grupo foi submetido à laparotomia - estresse cirúrgico; outro a estresse luminoso durante 24 horas; outro a estresse de ausência de luz por 24 horas; e o grupo-controle.

Os grupos mostraram-se iguais quanto ao peso, não havendo diferenças significativas entre as medianas ( $p=0,2350$ ). A leptina correlaciona-se com o índice de massa corporal, segundo dados da literatura, ou seja, quanto mais alto o índice de massa corporal, mais altos os níveis de leptina encontrados (MAFFEI *et al.*, 1995; MESSINIS *et al.*, 1999; 2000; RECHBERGER *et al.*, 1999; ZHAO; KREGER; BRANNIAN, 2000). Os grupos não apresentaram diferenças estatísticas no índice de massa corporal devido ao fato de serem homogêneos quanto ao peso. Pode-se, segundo as avaliações da correlação de leptina com o peso corporal, esperar que não haja alterações na dosagem de leptina baseada no nível de massa corporal, o que seria importante para não apresentar níveis diferenciados em relação ao peso.

As ratas foram acompanhadas diariamente durante dois ciclos estrais completos para a determinação da ciclicidade ovariana e a determinação da fase de proestro para início da realização do experimento. Somente foram incluídas no experimento ratas ciclando normalmente. A determinação da fase do ciclo estral foi feita com o objetivo de se constatar o padrão normal de atividade ovariana e para evitar a interrupção do ciclo normal por agentes tóxicos ou ambientais que

pudessem interferir nos resultados. A facilidade na identificação e na predição na citologia vaginal ocorre em virtude das flutuações abruptas nos níveis de estradiol durante as fases do ciclo estral. O ciclo estral é dividido em quatro fases: diestro I, diestro II, proestro e estro e a mudança de fase geralmente ocorre a cada 24 horas. O proestro foi escolhido por ser esta a fase em que os níveis de estradiol estão mais altos durante todo o ciclo estral (EVANS; LONG, 1922) e para evitar vieses nas oscilações nos níveis plasmáticos de estradiol que ocorrem em um ciclo estral normal.

Os estrogênios induzem a produção de leptina, fato este comprovado por Shimizu *et al.* (1997).

Inúmeros trabalhos mostraram que a leptina correlaciona-se positivamente com o índice de massa corporal (MAFFEI *et al.*, 1995; MESSINIS *et al.*, 2000). A análise de correlação de Spearman de toda a amostra apresentou fraco coeficiente de correlação (0,176), confirmando significância verificada no teste de hipóteses ( $p=0,180$ ) e comprovando que não há correlação entre peso e leptina. Separadamente, entre os grupos não se observou associação entre o peso e a leptina no nível de significância de 5%, talvez pelo fato de todos os elementos apresentarem valores normais dos dois.

No grupo II, submetido a estímulo cirúrgico - a laparotomia, utilizou-se como anestésico o 2,2 tribromoetanol a 2,5% diluído em NaCl 0,9%, na dose de 1 mL/100 mg de peso, via intraperitoneal. Este é usado para anestésias de períodos moderados (10–60 minutos) - (WAYNFORTH; FLECKNEL, 1992). Esse anestésico usado no laboratório de hipertensão do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG mostrou-se eficaz na concentração usada e não apresentando efeito adverso com o produto neste experimento, além de ter proporcionado bom plano anestésico para a cirurgia. A associação ketamina/acepromazina/xylazina, largamente utilizada em experimentos, não foi usada devido ao principal componente do anestésico - a ketamina - ser um inibidor não competitivo dos receptores N-metil-D-aspartato (NDMA) que se encontram distribuídos no cérebro e medula. O agonista natural dos receptores



NDMA, o ácido glutâmico, está presente em um terço das sinapses com o cérebro e estimula a produção de óxido nítrico (NO). Considerado o principal transmissor excitatório no cérebro, a perda do efeito excitatório do ácido glutâmico pela ketamina pode ser o mecanismo de ação de indução da anestesia pela ketamina (MASTRONARDI; YU; McCANN, 2001).

Estudos *in vivo* em humanos utilizando ketamina marcada com carbono radioativo referenciam que esse anestésico alcança rapidamente e em altas concentrações regiões cerebrais como o núcleo estriado, núcleo talâmico, regiões corticais e presumivelmente o hipotálamo e o tronco cerebral, onde pode bloquear o controle central de liberação da leptina, óxido nítrico e fator alfa-tumoral (TNF- $\alpha$ ). A ketamina foi preterida devido à sua capacidade de alterar o controle no nível central da leptina, podendo provocar variações plasmáticas indesejáveis.

Não há efeito claro na liberação de leptina no estresse cirúrgico, ao contrário do que acontece com o TNF- $\alpha$ , o qual considera o hormônio mais responsivo ao estresse já descoberto. Em outro tipo de estresse, injeção de lipossacárides bacterianos estimulou a liberação massiva de TNF- $\alpha$ , óxido nítrico e, em menor extensão, a leptina, concluindo que esta pode responder ao estresse, mas com muito menos sensibilidade que o TNF- $\alpha$  (MASTRONARDI; YU; McCANN, 2001). A leptina desempenhou importante papel quando do estresse cirúrgico, com redução dos seus níveis e acréscimo do cortisol nas primeiras horas da cirurgia e elevação dos seus níveis com 24 horas. Isto sugere a possibilidade de relação desses dois sistemas neurobiológicos, podendo ter importantes implicações neuroendócrinas de resposta ao estresse cirúrgico (KAIN; ZIMOLO; HENINGER, 1999).

Queda significativa nos níveis plasmáticos de leptina foi registrada no grupo submetido à cirurgia. No grupo do estresse cirúrgico, a avaliação foi realizada com 24 horas, pois trabalhos ressaltam que alterações nos níveis de leptina como resposta a uma injúria aguda ocorrem no prazo de 18 horas (SCHOOOF *et al.*, 2003; WALLACE; SATTAR; McMILLAN, 2000). A queda nos níveis de leptina somente nas primeiras três horas significa que a causa não foi o estresse

cirúrgico e sim a anestesia, indicando controle neural na liberação de leptina (MASTRONARDI; YU; McCANN, 2001).

A leptina aumentou durante a resposta inflamatória aguda induzida por citocinas em animais e humanos. Seu pico ocorre 18 horas depois do começo do estímulo inflamatório agudo e tem lugar na seqüência de tempo da resposta citocina/hormonal. O cortisol elevou-se com seis horas de estímulo inflamatório, seguido depois de um pico nos níveis de ácidos graxos livres com nove horas e, por fim, o pico de leptina com 18 horas. Parece ser importante essa cascata de resposta, pois a presença de ácidos graxos livres antecedendo o pico de leptina demonstra que a lipólise pode ser importante sinal na estimulação da leptina. O cortisol desempenha papel regulador na produção de citocinas (estimulatório na fase aguda e inibitório na fase crônica), como TNF- $\alpha$ , interleucina-6 (IL-6) e seus efeitos nos órgãos-alvo (WALLACE; SATTAR; McMILLAN, 2000). Esperava-se que houvesse aumento nos níveis plasmáticos de leptina no grupo submetido à cirurgia, de acordo com os trabalhos de Schoof *et al.* (2003) e Wallace, Sattar e McMillan (2000), mas o resultado mostrou redução acentuada nos níveis plasmáticos de leptina, o que justificaria se houvesse redução alimentar no período pós-operatório que levasse a esta redução, o que não foi avaliado no presente estudo.

As ratas foram submetidas a estímulo luminoso por 24 horas por meio de fonte fria de 20 watts, correspondendo à luminosidade de 90 watts de fonte de luz incandescente. O uso da fonte de luz fria teve como objetivo não aumentar a temperatura ambiente, provocando um viés na avaliação do efeito do estresse luminoso. Em todos os vertebrados o metabolismo da glândula pineal está sob controle dos ciclos diário e sazonal de iluminação ambiental. Em mamíferos, a luz agindo através da retina cumpre o papel arrastador da ritmicidade circadiana na produção de melatonina, fazendo o pico diário coincidir sempre com a noite. A luz incidindo sobre a retina durante o período escuro da noite circadiana bloqueia instantaneamente a produção de melatonina, fazendo com que a concentração plasmática caia a níveis basais em poucos minutos, podendo ser ou não

retomada, dependendo da duração e do momento da noite em que se dá a fotoestimulação retiniana.

A melatonina tem efeito inibidor sobre a liberação de leptina e esperava-se aumento nos níveis de leptina em relação ao grupo sem estímulo luminoso. A diminuição dos níveis de leptina neste caso se daria por bloqueio no transporte de ácidos graxos nos adipócitos, mediado por receptores de melatonina (CANPOLAT *et al.*, 2001) ou por outro fator produzido pela glândula pineal, ressaltado por Baydas *et al.* (2001), cujos níveis plasmáticos de leptina em ratos pinealectomizados estão elevados quando comparados com ratos não pinealectomizados (*sham*), tanto durante o dia quanto à noite. No grupo submetido ao estímulo luminoso, os níveis plasmáticos de leptina não foram significativamente mais baixos do que no grupo-controle.

No grupo III utilizou-se como estímulo de estresse a ausência de luz durante um período de 24 horas. Esse grupo serviu também para comparar se houve alguma diferença nos níveis de leptina em relação ao grupo IV (estímulo luminoso). Era esperada diferença entre os dois grupos submetidos ao estresse luminoso, mas os dados obtidos não revelaram diferenças significativas. O núcleo supraquiasmático no hipotálamo é onde se situa o marcapasso do relógio biológico no SNC e controla a atividade circadiana. A luz incidindo na retina inibe a produção de melatonina imediatamente. Mas quando aumenta o período do escuro do ciclo noite-dia, agudamente, esse marcapasso continua com a atividade circadiana da melatonina normalmente. Neste caso, houve assincronismo no ritmo circadiano da melatonina sem as alterações agudas observadas com o estímulo luminoso.

Em ratos *Wistar* a melatonina fisiologicamente liberada tem efeito inibidor na liberação de leptina (BAYDAS *et al.*, 2001; CANPOLAT *et al.*, 2001; RASMUSSEN *et al.*, 1999; WOLDEN-HANSON *et al.*, 2000). A leptina plasmática não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as medianas do grupo submetido ao estímulo luminoso quando comparado ao submetido ao estresse por ausência de luz. Mas quando se relacionou ao grupo-controle, as medianas

dos valores de leptina do grupo IV ( $p > 0,05$ ) e do grupo III ( $p > 0,05$ ) não tiveram redução significativa dos valores, o que contrasta com resultado de Baydas *et al.* (2001), que encontraram efeito inibidor pelo estresse, podendo ser devido à melatonina. Em uma amostra maior talvez seja encontrada essa diferença, pois os grupos submetidos ao estresse por ausência de luz e ao estímulo luminoso tiveram medianas mais baixas do que o grupo-controle.

As amostras de todos os quatro grupos foram colhidas para determinação dos níveis de leptina 24 horas após o começo do estímulo do estresse. Contrariamente aos dados da literatura, os níveis plasmáticos de leptina foram significativamente baixos no grupo II em relação ao grupo I ( $p < 0,001$ ), não correspondendo aos resultados apresentados por Schoof *et al.* (2003) e Wallace, Sattar e McMillan (2000), que descreveram níveis elevados de leptina em resposta ao estresse cirúrgico após 18 horas do ato operatório, devido à resposta citocina/hormonal ao estresse cirúrgico agudo.

O 2,2-tribromoetanol 2,5% utilizado para anestesia, que segundo Waynforth e Flecknell (1992) permite a rápida recuperação e é recomendado para anestésias de média duração (10-60 minutos), foi a única variável em relação aos outros grupos, não podendo excluir um efeito central de longo prazo interferindo nos níveis de leptina. A redução pode estar ligada ao anestésico e/ ou à associação do efeito da cirurgia mais anestésico ou relacionada ao estresse com associação do efeito da cirurgia e mais o anestésico.

O grupo submetido à cirurgia apresentou medianas significativamente mais baixas do que os submetidos ao estresse luminoso e ausência de luz ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente), talvez pela resposta ao estresse cirúrgico e à possibilidade de alterações pelo agente anestésico e outras alterações fisiológicas atribuídas ao procedimento cirúrgico.

Todos os grupos submetidos ao estresse agudo apresentaram medianas mais baixas que as do grupo-controle. As quedas nos níveis plasmáticos de leptina foram significativas no grupo II em relação ao grupo I.

Com os dados obtidos neste estudo com tipos específicos de estresse impostos agudamente em ratas, sugere-se que novas pesquisas sejam realizadas para melhor conhecimento de mecanismos de ação de anestésicos no SNC, neste caso o 2,2-tribromoetanol e suas repercussões em nível neural.

No primeiro tipo de estresse, o cirúrgico, esperava-se aumento nos níveis de leptina como uma resposta à reação inflamatória aguda, como demonstrado em outros estudos, mas os resultados deste trabalho encontraram diminuição significativa em relação a todos os outros grupos, sugerindo a possibilidade de atuação de outras vias neurais ativadas pelo estresse cirúrgico ou a associação deste com o anestésico. O segundo tipo de estresse, o luminoso, preconizava diminuição devido à ação da melatonina sobre os níveis de leptina. Os dados obtidos neste grupo em relação ao grupo-controle não mostrou diminuição significativa dos níveis de leptina, conforme o esperado. Faz-se necessário estudo sobre a relação da leptina e quebra do fotoperíodo com amostras maiores e antagonistas específicos da melatonina para melhor compreensão da influência hormonal ou fatores relacionados à glândula pineal e/ou associação do estresse. Já que não houve diferença nos níveis de leptina entre os grupos III e IV, existe a necessidade de determinar-se que vias devem ser acionadas para contraporem-se à atuação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) durante a quebra do ritmo circadiano por estímulo luminoso.

## 7 CONCLUSÃO

Os níveis plasmáticos de leptina mostraram-se significativamente diminuídos em ratas adultas *Wistar* submetidas ao estresse cirúrgico, quando comparados ao grupo-controle, ao estresse luminoso e ao estresse por ausência de luz.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.K. *et al.* Leptin antagonizes the insulin-like growth factor- I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.84, n.3: p.1072-1076, 1999.

AL-BARAZANJI, K.A. *et al.* Effects of intracerebroventricular infusion of leptin in obese Zucker rats. **Obes Res**, Silver Spring- MD, v.5, n.5: p.387-394, Sep., 1997.

AMICO, J.A. *et al.* Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue. **Life Sci**, Oxford, v.63, n.16: p.1387-1395, 1998.

AYAR, A. *et al.* Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium *in vitro*. **Neuro Endocrinol Lett**, Stockholm, v.22, n.3: p.199-207, Jun., 2001.

BARASH, I.A. *et al.* Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, Baltimore, v.137, n.7: p.3144-3147, 1996.

BARKAN, D. *et al.* Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. **Endocrinology**, Baltimore, v.140, n.4: p.1731-1738, Apr., 1999.

BASKIN, D.G. *et al.* Leptin receptor long-form splice- variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. **J Histochem Cytochem**, New York, v.47, n.3: p.353-362, Mar., 1999.

BAYDAS, G. *et al.* Effects of pinealectomy on the circadian release pattern in male rat. **Neuro Endocrinol Lett**, Stockholm, v.22, n.6: p.449-452, Dec., 2001.

BELL, M.E. *et al.* Disruption of arcuate / paraventricular nucleus connections changes body energy balance and response to acute stress. **J Neurosci**, Washington, v.20, n.17: p.6707-6713, Sep.1, 2000.

BENNETT, P.A. *et al.* Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen. **Neuroendocrinology**, Basel, v.67, n.1: p.29-36, Jan., 1998.

BENNETT, P.A. *et al.* Cyclical variations in the abundance of leptin receptors, but not in circulating leptin, correlate with NPY expression during the oestrous cycle. **Neuroendocrinology**, Basel, v.69, n.6: p.417-423, 1999.

BOULOUIMIE, A. *et al.* Leptin, the product of Ob gene, promote angiogenesis. **Circ Res**, Baltimore, v.83, n.10: p.1059-1066, Nov., 1998.

BRANN, D.W. *et al.* Regulation of leptin gene expression and secretion by steroids hormones. **Steroids**, Stoneham, v.64, n.9: p.659-663, Sep., 1999.

BRANN, D.W. *et al.* Leptin and reproduction. **Steroids**, Stoneham, v.67: p.95-04, 2002.

BRANNIAN, J.D.; HANSEN, K.A. Leptin and folliculogenesis: implications for ovulation induction and ART outcomes. **Semin Reprod Med**, New York, v.20, n.2: p.103-112, May, 2002.

CABRAL, A.C.V. *et al.* **Manual para elaboração e apresentação de dissertações e teses no curso de pós-graduação em ginecologia e obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG**, Belo Horizonte, Escola de Medicina da UFMG, 2001.

CALOGERO, A.E. *et al.* Interaction between GABAergic neurotransmission and rat hypothalamic corticotrophin – releasing hormone secretion in vitro. **Brain Res**, Amsterdam, v.463, n.1: p.28-33, 1988.

CAMPFIELD, L.A. *et al.* Recombinant mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, Washington-DC, v.269, n.5223: p.546-549, Jul., 1995.

CANPOLAT, S. *et al.* Effects of pinealectomy and exogenous melatonin on serum of leptin levels in male rat. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v.428, n.1: p.145-148, Sep.28, 2001.

CAPRIO, M. *et al.* Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. **Endocrinology**, Baltimore, v.140, n.11: p.4939-4947, Nov., 1999.

CARRO, E. *et al.* Influence of endogenous leptin tone on the estrous cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. **Neuroendocrinology**, Basel, v.66: p.375-377, 1997.

CHEHAB, F.F.; LIM, M.E.; LU, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nat Genet**, New York, v.12, n.3: p.318-320, 1996.

CHEUNG, C.C. *et al.* Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. **Endocrinology**, Baltimore, v. 138, n.2: p. 855-858, Feb., 1997.

CIOFFI, J.A. *et al.* The expression of leptin and its receptors in pre – ovulatory human follicles. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v.3, n.6: p.467-472, Jun., 1997.

COSTA, A. *et al.* Stimulation of corticotrophin-releasing hormone release by the obese (ob) gene product, leptin, from hypothalamic explants. **Neuroreport**, Oxford, v.8, n.5: p.1131-1134, Mar.24, 1997.



COUCE, M.E. *et al.* Localization of leptin receptor in the human brain. **Neuroendocrinology**, Basel, v.66, n.3: p.145-150, Sep., 1997.

CUNNINGHAM, M.J.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biol Reprod**, Madison, v.60, n.2: p.216-212, Feb., 1999.

DALLMAN, M.F. *et al.* The neural network that regulates energy balance is responsive to glucocorticoids and insulin and also regulates HPA axis responsivity at a site proximal to CRF neurons. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v.771: p.730-742, Dec., 1995.

DEARTH, R.K.; HINEY, J.K.; DEES, W.L. Leptin acts centrally to induce the prepubertal secretion of luteinizing hormone in the female rat. **Peptides**, New York, v.21, n.3: p.387-392, Mar., 2000.

DE BIASI, S.N.; APFELBAUM, L.I.; APFELBAUM, M.E. *In vitro* effect of leptin on LH release by anterior pituitary glands from female rats at the time of spontaneous and steroid-induced LH surge. **Eur J Endocrinol**, Oslo, v.145, n.5: p.659-665, Nov., 2001.

DIANO, S. *et al.* Leptin receptors in estrogen receptor-containing neurons of the female rat hypothalamus. **Brain Res**, Amsterdam, v.812, n.1-2: p.256-259, Nov., 1998.

DUGGAL, P.S. *et al.* The vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. **Endocrinology**, Baltimore, v.141, n.6: p.1971-1976, Jun., 2000.

DUGGAL, P.S. *et al.* Expression of the long (OB-RB) and short (OB-RA) forms of the leptin receptor throughout the oestrous cycle in the mature rat ovary. **Reproduction**, Cambridge, v.123, n.6: p.899-905, Jun., 2002.

ELMQUIST, J.K. *et al.* Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J Comp Neurol**, New York, v.395, n.4: p.535-547, Jun. 15, 1998.

EVANS, H.M.; LONG, J.A. Characteristic effects upon growth, oestrous and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. **Proc Natl Acad Sci**, Washington-DC, v.8, n.3: p.38-39, Mar., 1922.

FAN, W. *et al.* Role of melanocortinergetic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. **Nature**, London, v.385, n.6612, p.165-168, Jan., 1997.

FANTUZZI, G; FAGGIONI, R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation and hematopoiesis. **J Leukoc Biol**, New York, v.68, n.4: p.437- 446, 2000.

FEI, H. *et al.* Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (OB-R) in mouse brain and other tissues. **Proc Natl Acad Sci**, Washington-DC, v.94, n.13: p.7001-7005, Jun, 1997.

FORSLING, M.L. *et al.* The role of the pineal gland in the control of the daily patterns of neurohypophysial hormone secretion. **J Pineal Res**, New York, v.14, n.1: p.45-51, Jan., 1993.

FRANÇA, J.L. *et al.* **Manual para normalização de publicações técnico-científicas**. Belo Horizonte, ed. UFMG, 8ed, 2007.

GHILARD, N.; SKODA, R.C. The leptin receptor activates Janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. **Mol Endocrinol**, Baltimore, v.11, n.4: p.393-399, Apr., 1997.

GRINSPOON, S. *et al.* Serum leptin in women with anorexia nervosa. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.81, n.11: p.3861-3863, Nov., 1996.

GUERRERO, J.M.; REITER, R.J. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. **Endocr Res**, New York, v.18, n.2: p.91-113, 1992.

HAKANSSON, M. *et al.* Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. **J Neurosci**, Baltimore, v.18, n.1: p.559-572, Jan., 1998.

HALAAS, J.L. *et al.* Weight – reducing effects on the plasma protein encoded by the obese gene. **Science**, Washington-DC, v.269, n.5223: p.543 – 546, Jul., 1995.

HEIMAN, M.L. *et al.* Leptin inhibition of hypothalamic – pituitary – adrenal axis in response to stress. **Endocrinology**, Baltimore, v.138, n.9: p.3.859-63, Sep., 1997.

HENRY, B.A. *et al.* Central administration of leptin to ovariectomized ewes inhibits food intake without affecting the secretion of hormones from the pituitary gland: evidence for a dissociation of effects on appetite and neuroendocrine function. **Endocrinology**, Baltimore, v.140, n.3: p.1175-1182, Mar., 1999.

HOCHÓL, A. *et al.* Effects of leptin on the response of rat pituitary – adrenocortical axis to ether and cold stress. **Endocr Res**, New York, v.26, n.2: p.129-140, 2000.

HOGGARD, N. *et al.* Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington-DC, v.94, n.20: p.11073-11078, Sep., 1997.

HOUSEKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Domest Anim Endocrinol**, Auburn, v.15, n.6: p.457-475, Nov., 1998.

HUANG, Q.; RIVEST, R.; RICHARD, D. Effects of leptin on corticotrophin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. **Endocrinology**, Baltimore, v.139, n.4: p.1524-1532, Apr., 1998.

HUSZAR, D. *et al.* Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. **Cell**, Cambridge, v.88, n.1: p.131-141, Jan. 10, 1997.

IQBAL, J. *et al.* Localization of leptin receptor – like immunoreactivity in the corticotropes, somatotropes, and gonadotropes in the ovine anterior pituitary. **Endocrinology**, Baltimore, v.141, n.4: p. 1515-1520, Apr., 2000.

JANIK, J.E. *et al.* Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.82, n.9: p.3084-3086, Sep., 1997.

JIN, L. *et al.* Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.84, n.8: p.2903-2911, 1999.

JUREUS, A. *et al.* Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat. **Endocrinology**, Baltimore, v.141, n.7: p.2703-2706, Jul., 2000.

KAIN, Z.N.; ZIMOLO, Z.; HENINGER, G. Leptin and the perioperative neuroendocrinological stress response. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.84, n.7: p. 2438-2442, 1999.

KAMOHARA, S. *et al.* Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. **Nature**, London, v.389, n.6649: p.374-377, Sep., 1997.

KARLSSON, C. *et al.* Expression of functional leptin receptors in the human ovary. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.82, n.12: p.4144-4148, Dec., 1997.

KILIC, E. *et al.* Pinealectomy aggravates and melatonin administration attenuates brain damage in focal ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab**, New York, v.19, n.5: p.511-516, May, 1999.

KITAWAKI, J. *et al.* Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. **Mol Hum Reprod**, Oxford, v.5, n.8: p.708-713, Aug., 1999.

KITAWAKI, J. *et al.* Expression of leptin receptor in endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.85, n.5: p.1946-1950, May., 2000.

KUS, I. *et al.* Pinealectomy increases and exogenous melatonin decreases leptin production in rat anterior pituitary cells: an immunohistochemical study. **Physiol Res**, Prague, v.53, n.4: p.403-408, 2004.

LADO-ABEAL, J. *et al.* Short-term leptin infusion does not affect circulating levels of LH, testosterone or cortisol in food-restricted pubertal male rhesus macaques. **Clin Endocrinol (Oxf)**, Oxford, v.51, n.1: p.41-51, Jul., 1999.

LARSSON, H.; AHRÉN, B. Short-term dexamethasone treatment increases plasma leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.81, n.12: p.4428-4432, Dec., 1996.

LEBRETHON, M.C. *et al.* Cocaine and amphetamine-regulated-transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on the rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator *in vitro*. **J Neuroendocrinology**, Oxford, v.12, n.5: p.383-385, May., 2000a.

LEBRETHON, M.C. *et al.* *In vitro* stimulation of the prepubertal rat gonadotrophin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanism. **Endocrinology**, Baltimore, v.141, n.4: p.1464-1469, Apr., 2000b.

LICINIO, J. *et al.* Human leptin are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. **Nat Med**, New York, v.3, n.5: p.575-579, May., 1997.

LIPOSITS, Z.S.; SIEVERS, L.; PAULL, W.K. Neuropeptide – Y and ACTH: immunoreactive innervation of corticotrophin releasing factor (CRF) – synthesizing neurons in the hypothalamus of the rat. **Histochemistry**, Berlin, v.88: p.227-234, 1998.

LUUKKAA, V. *et al.* Effects of estrous cycle and steroid replacement on the expression of leptin and uncoupling proteins in adipose tissue in the rat. **Gynecol Endocrinol**, Park Ridge, v.15, n.2: p.103-112, 2001.

MACHINAL, F. *et al.* *In Vivo* and *In Vitro* ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: Evidence for a regional specific regulation by sex steroids hormones. **Endocrinology**, Baltimore, v.140, n.4: p. 1567-1574, Apr., 1999.

MAFFEI, M. *et al.* Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nat Med**, New York, v.1, n.11: p.1155-1161, Nov., 1995.

MAGNI, P. *et al.* Expression of a leptin receptor immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. **Endocrinology**, Baltimore, v.140, n.4: p.1581-1585, Apr., 1999.

MALENDOWICZ, L.K. *et al.* The possible involvement of galanin in the modulation of the function of rat pituitary-adrenocortical axis under basal and stressful conditions. **Endocr Res**, New York, v.20, n.3: p.307-317, Aug., 1994.

MALENDOWICZ, L.K. *et al.* The possible role of endogeneous substance P in the modulation of the response of the rat pituitary-adrenal axis to stresses. **Endocr Res**, New York, v.22, n.3: p.311-318, Aug., 1996.

MALENDOWICZ, L.K. *et al.* Acute effects of recombinant murine leptin on rat pituitary-adrenocortical function. **Endocr Res**, New York, v.24, n.2: p.235-246, May, 1998.

MANTZOROS, C.S. Role of leptin in reproduction. **Ann NY Acad Sci**, New York, v.900: p.174-183, 2000.

MASTRONARDI, C.A. *et al.* The possible role of prolactin in the circadian rhythm of leptin secretion in male rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, Malden, v.224, n.3: p.152-158, 2000.

MASTRONARDI, C.A.; YU, W.H.; McCANN, S.M. Comparisons of the effects of anesthesia and stress on release of tumor necrosis factor- $\alpha$ , leptin, and nitric oxide in adult male rats. **Exp Biol Med**, Basel, v.226, n.4, p.296-300, Apr., 2001.

MASUZAKI, H. *et al.* Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans **Nat Med**, New York, v.3, n.9: p.1029-1033, Sep., 1997.

McCANN, S.M. *et al.* Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines, and leptin. **Domest Anim Endocrinol**, Auburn, v.15, n.5: p.333-344, Sep., 1998.

McKIBBIN, P.E. *et al.* Altered neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of obese (fa/fa) Zucker rats. Possible relationship to obesity and neuroendocrine disturbances. **Diabetes**, Alexandria, v.40, n.11: p.1423-1429, Nov., 1991.

MERCER, J.G. *et al.* Localization of leptin receptor m RNA and the long form splice variant ( Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Lett**, Amsterdam, v.387, n.2-3: p.113-116, Jun., 1996.

MESSINIS, I.E. *et al.* Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. **Hum Reprod**, Oxford, v.14, n.4: p.913-918, Apr., 1999.

MESSINIS, I.E. *et al.* Treatment of normal women with oestradiol plus progesterone prevents the decrease of leptin concentrations induced by ovariectomy. **Hum Reprod**, Oxford, v.15, n.11: p.2383-2387, 2000.

MIX, H. *et al.* Expression of leptin and leptin receptor isoforms in the human stomach. **Gut**, London, v.47, n.4: p. 481-486, Oct., 2000.

MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J.H.; COPPACK, S.W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int J Obes Relat Metab Disord**, Hampshire-UK, v.22, n.12: p.1145-1158, Dec., 1998.

MOSCHOS, S.; CHAN, J.L.; MANTZOROS, C.S. Leptin and reproduction: a review. **Fertil Steril**, Birmingham, v.77, n.3: p.433-444, Mar., 2002.

MURPHY, B. *et al.* Melanocortin mediated inhibition of feeding behavior in rats. **Neuropeptides**, Edinburgh, v.32, n.6: p.491-497, Dec., 1998.

MUELLER, K.K. *et al.* Decreased leptin levels in normal weight women with hypothalamic amenorrhea; the effects of body composition and nutritional intake. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.83, n.7: p.2309-2312, Jul., 1998.

MURRAY, J.F. *et al.* The effect of leptin on luteinizing hormone release is exerted in the zona incerta and mediated by melanin-concentrating hormone. **J Neuroendocrinol**, Oxford, v.12: p.1133-1139, 2000.

NAGATANI, S. *et al.* Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. **Neuroendocrinology**, Basel, v.67, n.6: p.370-376, Jun., 1998.

NAGATANI, S.; GUTHIKONDA, P.; FOSTER, D.L. Appearance of a nocturnal peak of leptin secretion in the pubertal rat. **Horm Behav**, New York, v.37, n.4: p.345- 52, Jun., 2000.

NAGATANI, S; THOMPSON, R.C.; FOSTER, D.L. Prevention of glucoprivic stimulation of corticosterone secretion by leptin does not restore high frequency luteinizing hormone pulses. **J Neuroendocrinol**, Oxford, v.13, n.4: p.371-377, Apr., 2001.

NAZIAN, S.J.; CAMERON, D.F. Temporal relation between leptin and various indices of sexual maturation in the male rat. **J Androl**, Philadelphia, v.20, n.4: p.487-491, Jul.-Aug., 1999.

NISHIYAMA, M. *et al.* Leptin effects on the expression of type-2 CRH receptor mRNA in the ventromedial hypothalamus in the rat. **J Neuroendocrinol**, Oxford, v.11, n.4: p.307-314, Apr., 1999.

PARENT, A.S. *et al.* Leptin effects on pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from the adult rat hypothalamus and interaction with cocaine and amphetamine regulated transcript peptide and neuropeptide Y. **Regul Pept**, Amsterdam, n.92: p.17-24, 2000.

PELLEYMOUNTER, M.A. *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, Washington-DC, v.269, n.5223: p.540-542, Jul., 1995.

PIERROZ, D.D. *et al.* Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary – testicular axis and growth hormone and insulin – like growth factor I secretion in intact adult male rats. **Endocrinology**, v.137, n.1: p.3-12, Jan., 1996.

PINILLA, L. *et al.* Regulation of serum leptin levels by gonadal function in rats. **Eur J Endocrinol**, Bristol, v.140, n.5: p.468-473, 1999.

POWIS, J.; BAINS, J.S.; FERGUNSON, A.V. Leptin despolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. **Am J Physiol**, Bethesda, v.274, n.5: p.R1468-R1472, May, 1998.

RABER, J. *et al.* Corticotropin: releasing factor and adrenocorticotrophic hormone as potential central mediators of OB effects. **J Biol Chem**, Baltimore, v.272, n.24: p.15057- 15060, Jun., 1997.

RASMUSSEN, D.D. *et al.* Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. **Endocrinology**, Baltimore, v.140, n.2: p.1009-1012, 1999.

RECHBERGER, T. *et al.* Serum leptin concentrations in women taking oral contraceptives. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, Limerick, v.83, n.1: p.105-108, Mar., 1999.

ROCK, C.S. *et al.* Influence of hipercortisolemia on the acute-phase protein response to endotoxin in humans. **Surgery**, St. Louis, v.112, n.2: p.467-474, Aug., 1992.

ROHNER-JEANRENAUD, F. *et al.* The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. **Horm Metab Res**, Stuttgart, v.28, n.12: p.642-648, Dec., 1996.

RYAN, N.K. *et al.* Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary. **Endocrinology**, Baltimore, v.144, n.11: p.5006-5013, Nov., 2003.

SALADIN, R. *et al.* Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature**, London, v.377, n.6549: p.527-529, Oct., 1995.

SANACORA, G. *et al.* Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. **Endocrinology**, Baltimore, v.127, n.2: p.730-737, Aug., 1990.

SCHNEIDER, J.E.; ZHOU, D. Interactive effects of central leptin and peripheral fuel oxidation on estrous cyclicity. **Am J Physiol**, Bethesda, v.277, n.4: pt 2, p.1020-1024, Oct., 1999.

SCHOOOF, E. *et al.* No influence of surgical stress on postoperative leptin gene expression in different adipose tissues and soluble leptin receptor plasma levels. **Horm Res**, Basel, v.59, n.4, p.184-190, 2003.

SCHWARTZ, M.W. *et al.* Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v.98, n.5: p.1101-1106, Sep., 1996.

SHALTS, E. *et al.* Alpha-melanocyte-stimulating hormone antagonizes the neuroendocrine effects of corticotrophin – releasing factor and interleukin – 1 alpha in the primate. **Endocrinology**, Baltimore, v.131, n.1: p.132-138, Jul., 1992.

SHIMIZU, H. *et al.* Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. **J Endocrinol**, Bristol, v.154, n.2: p.285-292, Aug., 1997.

SHIODA, S. *et al.* Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v.243, n.1-3: p. 41-44, Feb., 1998.

SPICER, L.J.; FRANCISCO, C.C.. Adipose obese gene product, leptin, inhibits ovarian thecal cell steroidogenesis. **Biol Reprod**, Madison, v.58, n.1: p.207-212, Jan., 1998.

SPINEDI, E.; GAILLARD, R.C. A regulatory loop between the hypothalamo – pituitary – adrenal (HPA) axis and circulating leptin: A physiological role of ACTH. **Endocrinology**, Baltimore, v.139, n.9: p. 4016-4020, Sep., 1998.

STANLEY, B.G. *et al.* Evidence for neuropeptide Y mediation of eating produced by food deprivation and for a variant on the Y<sub>1</sub> receptor mediating this peptide's effect. **Peptides**, New York, v.13, n.3: p.581-587, May.-Jun., 1992.

STRATTON, R.J. *et al.* Plasma leptin, energy intake and hunger following total hip replacement surgery. **Clin Sci (Lond)**, London, v.93, n.2: p.113-117, 1997.

TANAKA, M. *et al.* Effects of estrogen on serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue in rats. **Horm Res**, Basel, v.56: p.98-104, 2001.

TARTAGLIA, L.A. The leptin receptor. **J Biol Chem**, Baltimore, v.272, n.10: p.6093-6096, Mar., 1997.

TERASAWA, E. Cellular mechanism of pulsatile LHRH release. **Gen Comp Endocrinol**, New York, v.112, n.3: p.283-295, Dec., 1998.

THORNTON, J.E. *et al.* Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin ob/ob mice. **Endocrinology**, Baltimore, v.138, n.11: p.5063-5066, Nov., 1997.

VAN DIJK, G. *et al.* Central leptin stimulates corticosterone secretion at the onset of dark phase. **Diabetes**, New York, v.46, n.11: p.1911-1914, Nov., 1997.

WAHLESTEDT, C. *et al.* Neuropeptide Y (NPY) in the area of hypothalamic paraventricular nucleus activates the pituitary–adrenocortical axis in the rat. **Brain Res**, Amsterdam, v.417, n.1, p.33 – 38, Aug., 1987.

WALLACE, A.M.; SATTAR, N.; McMILLAN, D.C. Effect of weight loss and inflammatory response on leptin concentrations in gastrointestinal cancer patients. **Clin Cancer Res**, Denville-NJ, v.4: p.2977-2979, Dec., 1998.

WALLACE, A.M.; SATTAR, N.; McMILLAN, D.C. The co–ordinated cytokine /hormone response to acute injury incorporates leptin. **Cytokine**, San Diego, v.12, n.7: p.1042-1045, Jul., 2000.

WARREN, M.P. *et al.* Functional hypothalamic amenorrhea: hypoleptinemia and disordered eating. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.84, n.3: p.873-877, Mar., 1999.



WATANOBE, H.; SUDA, T. A detailed study on the role of sex steroid milieu in determining plasma leptin concentrations in adult male and female rats. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v.259, n.1: p.56-59, May, 1999.

WAYNFORTH, H.B.; FLECKNELL, P.A. **Experimental and surgical technique in the rat**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1992. 382p.

WEIGLE, D S. Leptin and other secretory products of adipocytes modulate multiple physiological functions. **Ann Endocrinol Paris**, Paris, v.58, n.2: p.132-136; 1997.

WIDJAJA, A. *et al.* Determinants of serum leptin levels in Cushing's syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.83, n.2: p.600-603, Feb., 1998.

WOLDEN-HANSON, T. *et al.* Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. **Endocrinology**, Baltimore, v.141, n.2: p. 487- 497, Feb., 2000.

YILMAZ, B. *et al.* Melatonin inhibits testosterone secretion by acting at hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat. **Neuro Endocrinol Lett**, Stockholm, v.21, n.4: p.301-306, 2000.

YU, W.H. *et al.* Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin – induced LH release from the pituitary gland. **Endocrinology**, Baltimore, v.138, n.11: p.5055-5058, Nov., 1997a.

YU, W.H. *et al.* Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington-DC, v.94, n.3: p.1023-1028, Feb., 1997b.

ZACHOW, R.J.; WEITSMAN, S.R.; MAGOFFIN, D.A. Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-beta of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. **Biol Reprod**, Madison, v.61, n.4: p.1104-1109, Oct., 1999.

ZAMORANO, P.L. *et al.* Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. **Neuroendocrinology**, Basel, v.65, n.3: p.223-228, 1997.

ZHANG, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, London, v.372, n.6505: p.425 - 432, Dec., 1994.

ZHAO, Y.; KREGER, D.O.; BRANNIAN, J.D. Serum leptin concentrations in women during gonadotropin stimulation cycles. **J Reprod Med**, St. Louis, v.45, n.2: p.121-125, Feb., 2000.

ZHOU, Y.T. *et al.* Induction by leptin of uncoupling protein- 2 and enzymes of fatty acid oxidation. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington-DC, v.94, n.12: p.6386-6390, Jun., 1997.

ZUMBACH, M.S. *et al.* Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, Bethesda, v.82, n.11: p.4080-4082, Dec., 1997.

## **ANEXO A**

## **Anexo B**