

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia**

**EFEITOS DO ESTRADIOL NA EXPRESSÃO HIPOTALÂMICA
DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA
HOMEOSTASE ENERGÉTICA**

Lilian Eslaine Costa Mendes da Silva

**Ribeirão Preto
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LILIAN ESLAINE COSTA MENDES DA SILVA

**EFEITOS DO ESTRADIOL NA EXPRESSÃO HIPOTALÂMICA
DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA
HOMEOSTASE ENERGÉTICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lucila Leico K. Elias

Ribeirão Preto

2008

LILIAN ESLAINE COSTA MENDES DA SILVA

**EFEITOS DO ESTRADIOL NA EXPRESSÃO HIPOTALÂMICA
DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA
HOMEOSTASE ENERGÉTICA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2008.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Lilian Eslaine Costa Mendes.

Efeitos dos estradiol na expressão hipotalâmica dos mediadores envolvidos no controle da homeostase energética. Ribeirão Preto, 2008.

94p; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Elias, Lucila Leico Kagohara

1. Estradiol. 2. Leptina. 3. Ingestão alimentar. 4. Peptídeos orexigênicos e anorexigênicos. 5. Hipotálamo. 6. RNAm. 7. PCR em tempo real.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Regina e José Mendes, pelo amor incondicional, confiança e por sempre dedicarem ao meu crescimento profissional.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lucila Leico K. Elias, que sempre trabalhou com muita competência e dedicação ao ensino e à pesquisa. Obrigada pela orientação, paciência e compreensão durante os meus momentos de estresse. Agradeço também por ter disponibilizado o seu tempo para me acompanhar nos experimentos noturnos e por ter contribuído para meu crescimento científico e intelectual ao longo do período de elaboração deste projeto.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, que nos anos de convivência, muito me ensinou a trabalhar com amor e dedicação, e sempre será um exemplo de humildade e cientista.

À técnica Marina Holanda pelo auxílio nos experimentos e em especial à Maria Valci dos Santos Silva (Val) que se mostrou sempre prestativa, ajudando-me todos os dias no biotério e por ter disponibilizado o seu tempo para me auxiliar nas cirurgias e nos experimentos noturnos.

Aos amigos do Laboratório de Neuroendocrinologia: Andréia, Beatriz, Daniela, Ernane, Kika, Lisandra, Luis Fernando, Milene, Rodrigo, Silvia, Wagner. Muito obrigada por tornarem o laboratório um ambiente de trabalho de ótimo convívio. Em especial ao Wagner que me ensinou a cirurgia de estereotaxia e contribuiu nos experimentos de canulação.

Às meninas de casa: Renata, Stella e Talita. Obrigada pelos momentos de alegria que vocês me proporcionaram, principalmente nas baladas.

Aos amigos da trupe pela amizade, gargalhadas e descontrações nos barzinhos e festas durante esses anos de pós-graduação. Vou sentir saudades!!!

À Prof^a. Dr^a. Margaret de Castro por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização do método de PCR em tempo real.

Ao Fernando Colbari do Amaral e à Natália Torres pela paciência e por todo ensinamento do método de PCR em tempo real.

Ao técnico Rubens Fernando de Melo, pela amizade e auxílio no criostato durante a realização das microdissecções. Valeu Rubinho!

Aos bioteristas do Departamento de Fisiologia, Léo e Eduardo, pelos cuidados com os meus animais.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Fisiologia, Cláudia, Elisa, Fernando e Carlos pela atenção durante os processos burocráticos.

À CAPES, FAPESP e CNPq pela concessão de bolsa e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A auto-satisfação é inimiga do estudo. Se queremos realmente aprender alguma coisa, devemos começar por libertar-nos disso. Em relação a nós próprios devemos ser insaciáveis na aprendizagem e em relação aos outros insaciáveis no ensino.”

Mao Tse-Tung

SILVA, L.E.C.M. EFEITOS DO ESTRADIOL NA EXPRESSÃO HIPOTALÂMICA DOS MEDIADORES ENVOLVIDOS NO CONTROLE DA HOMEOSTASE ENERGÉTICA. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A ingestão alimentar é controlada por fatores neurais, endócrinos, adipocitários e intestinais. O sistema nervoso central, mais especificamente o hipotálamo, juntamente com os sinais periféricos indicadores do estado nutricional interagem no controle da homeostase energética. Diferentes neuropeptídeos e receptores expressos no hipotálamo apresentam efeitos específicos na ingestão alimentar por meio de suas ações anorexígenas ou orexígenas e no balanço energético. O estradiol também participa na regulação da homeostase energética, como evidenciado pelo aumento da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal após ovariectomia. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da ovariectomia, com e sem reposição de estradiol, na ingestão alimentar e na expressão gênica de mediadores hipotalâmicos envolvidos no controle da homeostase energética. Para tanto, ratas Wistar foram submetidas à ovariectomia bilateral (OVX) e divididas em dois grupos: animais que receberam injeção subcutânea de cipionato de estradiol (10 µg/Kg peso corporal, grupo OVX+E); e animais sem reposição que receberam apenas veículo (óleo de milho, grupo OVX), por oito dias consecutivos. A ingestão alimentar e o peso corporal foram avaliados durante este período, e no oitavo dia, a dieta foi retirada às 16h e um subgrupo de ratas OVX e OVX+E foi decapitado às 17h (período pré-alimentação). Outro subgrupo de ratas OVX e OVX+E, teve a dieta rerepresentada às 18h, e decapitado às 22h (período pós-alimentação). Amostras de sangue do tronco e o cérebro foram coletados sob condições livres de RNase. O plasma foi utilizado para dosagem de leptina por radioimunoensaio e o cérebro para quantificação, por PCR em tempo real, da expressão de RNAm de neuropeptídeo Y (NPY), proteína relacionada ao agouti (AgRP), pró-opiomelanocortina (POMC), transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), fator liberador de corticotrofina (CRF), pró-hormônio concentrador de melanina (pró-MCH), orexina A, receptor de forma longa de leptina (ObRb) e receptor 4 da melanocortina (MC4-R) em núcleos específicos do hipotálamo: núcleo arqueado (ARC), núcleo paraventricular (PVN) e área hipotalâmica lateral (LHA). Em um outro protocolo experimental realizou-se a injeção

intracerebroventricular (ventrículo lateral, icv) de leptina (10 µg/5µL) ou salina estéril em ratas OVX e OVX+E, uma hora antes do início da fase escura (17h) para determinação da ingestão alimentar e do peso corporal. Observamos que a reposição de estradiol em ratas ovariectomizadas induziu: menor ingestão alimentar e menor ganho de peso corporal, maiores concentrações plasmáticas de leptina no estado pré-alimentar, bem como em resposta à alimentação; redução da expressão de RNAm de NPY, AgRP e CART no ARC; e de orexina A na LHA; aumento da expressão de RNAm de ObRb, MC4-R, CART e, principalmente, de CRF no PVN e de ObRb e CART na LHA. No protocolo de injeção icv de leptina, a resposta anorexigênica foi semelhante entre os grupos OVX e OVX+E, porém, a perda de peso foi maior no grupo OVX+E, indicando efeito maior da leptina no gasto energético com a reposição estrogênica. O conjunto desses dados sugere que o efeito hipofágico do estradiol está associado à redução da expressão gênica de neuropeptídeos orexigênicos como NPY, AgRP e orexina A e aumento da expressão gênica de MC4-R, ObRb e do CRF, receptores e neuropeptídeo com efeitos anorexigênicos, no hipotálamo. Além disso, a expressão maior de CRF poderia contribuir para o aumento do efeito da leptina no gasto energético na presença do estradiol. Sendo assim, os efeitos do estradiol na homeostase energética são observados tanto na ingestão alimentar como no gasto energético. Esses efeitos são mediados por fatores periféricos, como a liberação de leptina pelo tecido adiposo; e por fatores centrais, como expressão diferenciada de neuropeptídeos hipotalâmicos.

Palavras-chaves: estradiol, leptina, ingestão alimentar, peptídeos orexigênicos e anorexigênicos, hipotálamo, RNAm, PCR em tempo real.

SILVA, L.E.C.M. EFFECTS OF ESTRADIOL ON HYPOTHALAMIC EXPRESSION OF NEUROPEPTIDES INVOLVED IN THE CONTROL OF ENERGY HOMEOSTASIS. School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2008.

Food intake is under control of neural, endocrine, adipokines and gut hormones. The hypothalamus and peripheral signals of energy store play an important role on the balance of energy homeostasis. Several neuropeptides expressed in the hypothalamus possess orexigenic or anorexigenic effects and also affect energy expenditure. Estradiol also participates in the control of energy homeostasis, as demonstrated by the increase in food intake and body weight gain after ovariectomy. The present study aimed to evaluate food intake, body weight changes and the hypothalamic expression of neuropeptides involved in the control of energy homeostasis. Wistar female rats were ovariectomized and received daily subcutaneous injections of either estradiol cypionate (10 µg/Kg bw, OVX+E) or vehicle (corn oil, OVX) during 8 days. Food intake and body weight were determined during this period. On 8th day, food was removed from the cage at 4 PM and two subgroups of rats (OVX and OVX+E) were decapitated at 5 PM (pre-feeding) or at 10 PM (4 hours after feeding). Blood samples and brain tissues were collected under RNase free conditions, respectively, for plasma leptin determination by RIE and mRNA expression, carried out by real time PCR, of neuropeptide Y (NPY), agouti-related protein (AgRP), proopiomelanocortin (POMC), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), corticotrophin-releasing factor (CRF), orexin A, melanin-concentrating hormone (MCH), long form of the leptin receptor (ObRb) and melanocortin-4 receptor (MC4-R) in the arcuate (ARC), paraventricular (PVN) nuclei and lateral hypothalamic area (LHA). We also performed intracerebroventricular (lateral ventricle, icv) injection of recombinant leptin (10 µg/5µL) or saline in OVX and OVX+E rats for food intake and body weight determination. We observed that estradiol replacement in OVX rats induced lower food intake and body weight gain, lower leptin plasma levels both before and after feeding. We also observed a reduction of NPY, AgRP and CART mRNA expression in the ARC; and orexin A in the LHA and an increase of ObRb, MC4-R, CART mRNA and mostly CRF mRNA in the PVN and ObRb and CART mRNA in the LHA. After central leptin stimulation, there was a similar reduction of food intake in OVX and OVX+E rats. However, body

weight was more reduced in OVX+E rats, indicating a higher effect of leptin on energy expenditure under estradiol replacement. Taken together, these data show that hypophagia induced by estradiol treatment is associated with reduced hypothalamic expression of orexigenic peptides, for instance NPY, AgRP and orexin A, and increased expression of anorexigenic mediators, for instance MC4-R, ObRb and CRF. In addition, it is suggested that the increased CRF expression may contribute to the enhanced effect of leptin on energy expenditure under estradiol replacement. In conclusion, estradiol affects energy homeostasis through its effects on food intake and energy expenditure, which are mediated by peripheral factors, such as leptin, released by adipose tissue, and differential expression of hypothalamic neuropeptides.

Key words: estradiol, leptin, food intake, orexigenic and anorexigenic peptides, hypothalamus, mRNA, real time PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Valores diários (A e C) (Média±EPM) e média (B e D) da ingestão alimentar (g/100 g peso corporal) e do peso corporal (g), respectivamente, de ratas ovariectomizadas com (OVX+E, n=15) e sem reposição (OVX, n=13) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal.....37
- Figura 2.** Concentração plasmática de leptina (ng/mL) (Média±EPM), no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX + E, n= 7-8) e sem reposição (OVX, n= 7-8) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal.....38
- Figura 3.** Expressão relativa de RNAm (Média±EPM) de ObRb, NPY, AgRP, POMC e CART no ARC, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem reposição (OVX) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal.....40
- Figura 4.** Expressão relativa de RNAm (Média±EPM) de ObRb, MC4-R, CRF e CART no PVN, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem reposição (OVX) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal..... 42
- Figura 5.** Expressão relativa de RNAm (Média±EPM) de ObRb, MC4-R, orexina A, Pró-MCH e CART da LHA, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX + E) e sem reposição (OVX) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal.....44
- Figura 6.** Valores (Média±EPM) de ingestão alimentar (g/100g peso corporal) (A) e variação do peso corporal (g) (B) de ratas ovariectomizadas com (OVX + E, n= 7-10) e sem reposição (OVX, n= 10) de estradiol, e submetidas à administração central de salina ou leptina no oitavo dia pós-cirúrgico.....46

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Ensaio de expressão gênica para PCR em tempo real..... | 34 |
|---|----|

LISTA DE SIGLAS

β -LPH: Beta-lipotrofina

α -MSH: Hormônio estimulador do alfa-melanócito

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

AgRP: Proteína relacionada ao agouti

ARC: Núcleo arqueado

AVP: Vasopressina

CART: Transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CLIP: Peptídeo intermediário semelhante à corticotrofina/ACTH

CRF: Fator liberador de corticotrofina

DMH: Núcleo hipotalâmico dorsomedial

DMV: Núcleo dorsal motor do vago

ER α : Receptor de estrógeno do tipo alfa

ER β : Receptor de estrógeno do tipo beta

GABA: Ácido gama-aminobutírico

icv: Intracerebroventricular

LHA: Área hipotalâmica lateral

MC1-R: Receptor 1 da melanocortina

MC2-R: Receptor 2 da melanocortina

MC3-R: Receptor 3 da melanocortina

MC4-R: Receptor 4 da melanocortina

MC5-R: Receptor 5 da melanocortina

MCH: Hormônio concentrador de melanina

NPY: Neuropeptídeo Y

NTS: Núcleo do trato solitário

ObRb: Receptor de forma longa da leptina

OT: Ocitocina

OVX: Ovariectomia

OVX+E: Ovariectomia com reposição de estradiol

POMC: Pró-opiomelanocortina

PVN: Núcleo paraventricular

SNA: Sistema nervoso autônomo

SNC: Sistema nervoso central

STAT 3: Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TRH: Hormônio liberador de tireotrofina

TSH: Hormônio estimulante da tiróide

UCP1: Proteína desacopladora do tipo 1

UCP2: Proteína desacopladora do tipo 2

UCP3: Proteína desacopladora do tipo 3

VMH: Núcleo hipotalâmico ventromedial

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 25 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 3.1. Animais..... | 28 |
| 3.2. Protocolos experimentais..... | 28 |
| 3.3. Procedimentos cirúrgicos..... | 30 |
| 3.4. Coleta de sangue..... | 32 |
| 3.5. Coleta de tecido cerebral..... | 32 |
| 3.6. Métodos laboratoriais..... | 32 |
| 3.7. Análise estatística..... | 35 |
| 4. RESULTADOS | 36 |
| 4.1. Avaliação da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal após ovariectomia com e sem reposição de estradiol..... | 37 |
| 4.2. Avaliação da concentração plasmática de leptina dos animais submetidos à ovariectomia com e sem reposição de estradiol..... | 38 |
| 4.3. Avaliação da expressão relativa de RNAm dos mediadores hipotalâmicos envolvidos no controle da homeostase energética dos animais submetidos à ovariectomia com e sem reposição de estradiol..... | 39 |
| 4.4. Avaliação do efeito da ovariectomia e da reposição de estradiol na ingestão alimentar e na variação de peso corporal após administração intracerebroventricular de leptina..... | 45 |
| 5. DISCUSSÃO | 47 |
| 6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES | 55 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 57 |
| 8. ANEXOS | 79 |

Nos últimos anos vários estudos têm sido realizados com o intuito de investigar os mecanismos de regulação e as vias neuroendócrinas envolvidos no controle do balanço energético. A compreensão dos processos que regulam a ingestão alimentar e o peso corporal tem contribuído não somente para o conhecimento melhor dos mecanismos fisiológicos envolvidos nestes processos, mas também na elucidação de fatores envolvidos em algumas condições fisiopatológicas como a obesidade e a caquexia.

Atualmente, sabe-se que a ingestão e o peso corporal são controlados por importantes fatores neurais, endócrinos, adipocitários e intestinais, cuja integração contribui para a homeostase energética (Schwartz e cols, 2000). Para manutenção do balanço energético e do peso corporal é necessário um equilíbrio entre a ingestão de macronutrientes e o gasto energético. Assim, um balanço energético positivo resulta em ganho de peso, ao passo que um balanço energético negativo resulta em perda de peso.

O sistema nervoso central (SNC), juntamente com uma série de sinais periféricos indicadores do estado nutricional exerce uma função fundamental na manutenção da homeostase energética. O hipotálamo foi a primeira região descrita neste processo homeostático há mais de cinquenta anos (Stellar, 1954). Na década de quarenta, lesões e estímulos elétricos de núcleos hipotalâmicos, inicialmente, sugeriram que o núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) representava o “centro da saciedade” e a área hipotalâmica lateral (LHA) o “centro da fome” (Hetherington & Ranson, 1940; Anand & Brobeck, 1951; Stellar, 1954). Lesões bilaterais no VMH resultavam em hiperfagia e obesidade. Por outro lado, lesões na LHA induziam anorexia e acentuada perda de peso (Hetherington & Ranson, 1940; Anand & Brobeck, 1951; Stellar, 1954). Entretanto, com o avanço dos estudos relacionados ao comportamento alimentar, atualmente, a visão de “centros” funcionais tem sido substituída por populações neuronais, as quais expressam neuropeptídeos que medeiam efeitos específicos na ingestão e/ou gasto energético (Schwartz e cols, 2000).

Atualmente sabe-se que o hipotálamo contém vários núcleos, além da LHA e do VMH, envolvidos no controle da ingestão alimentar. Dentre eles incluem-se o núcleo arqueado (ARC), o núcleo paraventricular (PVN) e o núcleo hipotalâmico dorsomedial (DMH) (Stellar, 1954; Bray, Fisher & York, 1990; Elmquist e cols; 1999). O ARC apresenta dois grupos distintos de neurônios que controlam o balanço

energético: um grupo é representado pelos neurônios que expressam os neuropeptídeos orexígenos, proteína relacionada ao agouti (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY) que estão co-localizados em neurônios do ARC (Hahn e cols, 1998; Broberger, 1998); o outro grupo é representado pelos neurônios que expressam os neuropeptídeos anorexígenos, pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), também co-localizados em neurônios do ARC (Elmquist e cols, 1998, 1999).

Os neurônios NPY/AgRP são inibidos pela leptina, e ativados em condições de concentrações plasmáticas baixas deste hormônio (Stephens e cols, 1995; Schwartz e cols, 1996; Hahn e cols, 1998; Elias e cols 1999). Contrariamente, a leptina ativa os neurônios POMC/CART (Schwartz e cols, 1997; Thornton e cols, 1997; Kristensen e cols, 1998; Cowley e cols, 2001). Estudos relatam que neurônios POMC/CART podem ser diretamente inibidos pelo NPY e também pelo neurotransmissor ácido γ -aminobutírico (GABA) (Cowley e cols, 1999; Guan e cols, 1998; Meister, 2007).

Estudos revelam que a administração de NPY por via intracerebroventricular (icv) ou diretamente no PVN aumenta a ingestão alimentar e diminui o gasto energético (Stanley e cols, 1986; Billington e cols, 1991). Desta forma, a administração central deste neuropeptídeo leva ao estado de balanço energético positivo e ao aumento do estoque de tecido adiposo. Outros estudos também observam que a expressão hipotalâmica de RNAm de NPY e a liberação deste neuropeptídeo elevam-se durante o jejum, condição de concentração plasmática baixa de leptina e insulina. Porém, após realimentação ocorre a sua diminuição (Sanacora e cols, 1990; Kalra e cols 1991; Swart e cols, 2002).

A participação de um circuito de sinais anorexígenos na modulação da ingestão e do gasto energético está bem estabelecida. O sistema da melanocortina central (Lu e cols, 1994, Fan e cols, 1997), o CART (Kristensen e cols, 1998) e o fator liberador de corticotrofina (CRF) (Arase e cols, 1988) integram este circuito. Melanocortinas são peptídeos derivados da clivagem da molécula precursora POMC, a qual é sintetizada na hipófise anterior, no ARC, no NTS e em vários tecidos periféricos (Emeson & Eipper, 1986; Smith & Funder, 1988). A clivagem da POMC no hipotálamo dá origem aos hormônios adrenocorticotrófico (ACTH) e β -lipotrofina (β -LPH). O ACTH, por sua vez, é clivado em hormônio estimulador do α -

melanócito (α -MSH) e no peptídeo intermediário semelhante à corticotrofina/ACTH (CLIP). Por outro lado, o hormônio β -LPH pode ser clivado em γ -LPH e β -endorfina. O γ -LPH dá origem ao β -MSH. A porção N-terminal da POMC contém as seqüências γ_1 MSH, γ_2 MSH e γ_3 MSH (Smith & Funder, 1988).

Os efeitos fisiológicos dos peptídeos derivados da POMC são exercidos pela sua interação com receptores específicos. Foram descritos cinco receptores da família de receptores da melanocortina: MC1-R, MC2-R, MC3-R, MC4-R e MC5-R (Mountjoy e cols, 1992). Dentre eles, o MC3-R e MC4-R expressos, principalmente, no cérebro (Mountjoy e cols, 1994), são fundamentais na regulação da homeostase energética. Camundongos com ausência de expressão do MC3-R ou do MC4-R tornam-se obesos (Huszar e cols, 1997; Butler e cols, 2000), e camundongos com perda de ambos os receptores apresentam uma obesidade de gravidade maior (Chen e cols, 2000). A proteína AgRP é expressa no ARC e é um antagonista endógeno do MC3-R e MC4-R (Ollmann e cols, 1997). A expressão de RNAm deste peptídeo no ARC aumenta durante o jejum (Swart e cols, 2002) e sua administração icv, além de aumentar a ingestão alimentar, causa supressão na expressão do hormônio liberador de tireotrofina (TRH), reduz o consumo de oxigênio e diminui o gasto energético (Small e cols, 2001, 2003).

O principal ligante endógeno dos receptores MC3-R e MC4-R é o α -MSH. A administração icv deste neuropeptídeo suprime a ingestão alimentar (Kask e cols, 2000). Além de seus efeitos no consumo alimentar, o α -MSH também aumenta a concentração plasmática de hormônio estimulante da tireóide (TSH) em ratos jejuados (Kim e cols, 2000) e aumenta o gasto energético (Pierroz e cols, 2002), avaliado pelo consumo de oxigênio (Pierroz e cols, 2002) e pela atividade do sistema nervoso simpático, e a termogênese (Yasuda e cols, 2004).

Um outro neuropeptídeo que inibe a ingestão alimentar é o CART. Este peptídeo é encontrado em vários núcleos hipotalâmicos como ARC, PVN, DMH, LHA; e em outras áreas entre as quais eminência mediana, hipófise anterior, pâncreas e medula adrenal (Gautvik e cols, 1996; Couceyro, Koylu & Kuhar, 1997; Kuhar & Dall Vechia, 1999, Wierup & Sundler, 2006). Este neuropeptídeo está co-localizado com a POMC no ARC, com o hormônio concentrador de melanina (MCH) na LHA e com TRH, galanina, vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) no PVN (Elias e cols, 1998; Kristensen e cols, 1998; Kuhar & Dall Vechia, 1999). A administração icv

crônica de CART diminui a ingestão alimentar e o peso corporal tanto em ratos obesos *fa/fa* como em ratos controles (Larsen e cols, 2000). Adicionalmente, ratos Wistar com privação alimentar por 24 ou 48 horas bem como camundongos *ob/ob* (deficientes em leptina) possuem redução de RNAm de CART no ARC (Kristensen e cols, 1998).

Em relação aos neuropeptídeos de segunda ordem inclui-se o CRF. Além da sua clássica função na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o CRF tem sido descrito como potente anorexígeno (Rohner Jeanrenaud, Walker & GrecoPerotto, 1989; Heinrichs, Lapsansky & Behan, 1996). Alguns autores relatam que a administração icv de CRF está associada com a redução da ingestão alimentar e do peso corporal (Morley & Levine, 1982; Morley, 1987; Morley & Blundell, 1988; Arase e cols, 1988). Além de alterar o balanço energético por meio de seus efeitos na ingestão, o CRF também interfere no gasto energético, uma vez que é capaz de agir no SNC e regular a atividade do sistema nervoso autônomo (SNA), aumentando a atividade simpática e diminuindo a atividade parassimpática (Brown e cols, 1982, Brown & Fisher, 1985). Além disso, foi observado que a síntese de CRF é influenciada pela leptina, pois após a administração deste hormônio em camundongos *ob/ob* ocorre aumento da ativação dos neurônios CRF no PVN (Huang e cols, 1998).

Como dito anteriormente, a LHA integra o circuito neuronal envolvido no controle da homeostase energética. Descrita inicialmente como “centro da fome”, a LHA é atualmente conhecida por suas subpopulações neuronais difusas que expressam orexinas (A e B) e MCH que recebem projeções de vários núcleos, como PVN, ARC, NTS e DMV (Delecea e cols, 1998; Peyron e cols; 1998). Esta área não somente recebe, mas também envia projeções para outras áreas envolvidas na modulação do comportamento alimentar, sono e regulação autonômica, como ARC, NTS e área ventral tegmental (Date e cols, 1999). Desde a sua descoberta na década de 90, vários estudos têm relatado a participação das orexinas no balanço energético. A orexina atua induzindo aumento da ingestão alimentar (Sakurai e cols, 1998; Haynes e cols, 1999) e hipotermia (Jaszberenyi e cols 2002). O efeito orexigênico da orexina A é mais potente quando comparado com a orexina B (Sakuray e cols, 1998). A expressão de RNAm de orexinas está aumentada durante o jejum e no estado de hipoglicemia; o que sugere sua ação fisiológica no controle da ingestão alimentar (Cai e cols, 1999). Além disso, estudos observam a presença

de receptor de leptina em neurônios que expressam orexina A/B, e o aumento do conteúdo de RNAm de pré-pró-orexina após injeção icv de leptina (Horvath, Diano & Van den Pol, 1999; Lopez e cols, 2000). O efeito orexígeno não é exercido somente pelas orexinas na LHA, mas também pelo MCH. A administração icv deste hormônio induz hiperfagia (Qu e cols, 1996; Saito e cols, 1999) e diminui o gasto energético (Ludwig e cols, 2001). Sua expressão eleva-se após o jejum (Qu e cols, 1996) e é inibida pela leptina (Tritos e cols, 1998).

A leptina é um hormônio protéico, codificado pelo gene *ob* em camundongos, e produzido, predominantemente, pelos adipócitos (Zhang e cols, 1994), mas pode ser produzida por outros tipos celulares localizados em outros tecidos como placenta (Masuzaki e cols, 1997), epitélio gástrico (Bado e cols, 1998), músculo esquelético (Wang e cols, 1998), células do folículo capilar (Iguchi e cols, 2001) e osteoblastos (Reseland e cols, 2001). Sua liberação na circulação sangüínea ocorre em proporção à quantidade de tecido adiposo. Indivíduos obesos, por exemplo, possuem maior concentração plasmática de leptina quando comparados com indivíduos eutróficos (Maffei e cols, 1995; Frederich e cols, 1995; Considine e cols, 1996).

A síntese e a liberação da leptina pelo tecido adiposo são influenciadas pelo estado alimentar, ou seja, em condições de jejum há uma redução acentuada na expressão de RNAm de leptina no tecido adiposo branco e na sua concentração plasmática (Becker e cols, 1995; Trayhurn e cols, 1995; Hardie e cols, 1996). Contudo, essas mudanças são revertidas com a realimentação (Becker e cols, 1995; Trayhurn e cols, 1995; Hardie e cols, 1996). A administração exógena de leptina resulta em redução do consumo alimentar e da adiposidade, perda de peso e aumento do gasto energético em camundongos *ob/ob* (Campfield e cols, 1995; Pellemounter e cols, 1995; Haynes e cols, 1997). Portanto, a concentração plasmática de leptina representa um sinal de retroalimentação na regulação do peso corporal e do balanço energético. Os mecanismos envolvidos no controle da síntese de leptina não estão estabelecidos, porém, sabe-se que glicocorticóides, insulina e noradrenalina influenciam a síntese deste hormônio (Robaczyk, Smiarowska & Krzyzanowska-Swiniarska, 1997).

A ação da leptina ocorre por meio de sua ligação ao seu receptor específico, o qual é membro da família dos receptores de citocina (White & Tartaglia, 1996). Existem seis formas variantes do receptor de leptina (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd,

ObRe, ObRf) (Lee e cols, 1996; Chua e cols, 1997; Tartaglia e cols, 1997). O receptor de forma longa (ObRb) é expresso, abundantemente, no hipotálamo; particularmente nas regiões envolvidas na regulação da homeostase energética, como: ARC, DMH e LHA (Cheung e cols, 1997; Fei e cols, 1997; Elmquist e cols, 1998). Mutações no gene codificador do receptor de leptina (*db* para camundongos e *fa* para ratos) induz o aparecimento de hiperfagia, obesidade, hiperlipidemia e resistência ao tratamento com leptina exógena (Chen e cols, 1996; Lee e cols, 1996), confirmando a participação essencial da leptina no controle da ingestão alimentar.

Como descrito anteriormente, a leptina é capaz de inibir e estimular populações neuronais distintas do ARC envolvidas no controle da homeostase energética (Elmquist, Elias & Saper, 1999; Saper e cols, 2002). Os axônios destas populações neuronais, por sua vez, projetam-se para neurônios de segunda ordem localizados no PVN, VMH, DMH e LHA (Sawchenko, 1998; Schwartz e col, 2000). Estes neurônios de segunda ordem, que também expressam receptor de leptina (Hakanson e cols, 1998; Fei e cols, 1997; Elmquist e cols, 1998), por sua vez projetam-se para o núcleo do trato solitário (NTS) e para o núcleo dorsal motor do vago (DMV), no tronco encefálico; integrando assim um circuito neuronal responsável pela regulação do apetite.

Além desses fatores fisiológicos neuronais e adipocitários, os hormônios gonadais também participam na regulação da ingestão alimentar, do peso e da composição corporal de várias espécies de mamíferos. A deficiência dos hormônios ovarianos pela ovariectomia, por exemplo, leva ao ganho de peso (Wade & Zucker, 1970; Mook e cols, 1972; Landau & Zucker, 1976) e ao aumento do conteúdo de lipídios da carcaça de ratas (Leshner e cols, 1973; Gray e cols, 1981). Esta fase de ganho de peso é acompanhada por uma elevação na ingestão alimentar (Wade, 1970; Mook e cols, 1972; Tartelin, 1973; Landau e cols, 1976) e diminuição no exercício voluntário (Mook e cols, 1972; Wade, 1975).

Observa-se na maioria das fêmeas de mamíferos como ratas, camundongos, porcas, primatas não-humanos e mulheres, que a ingestão alimentar diminui durante a fase peri-ovulatória e aumenta na fase pós-ovulatória (Wade, 1972; Blaustein & Wade, 1976; Kemnitz e cols, 1989; Dye & Blundell, 1997; Eckel, Houpt e Geary, 2000). Alguns estudos sugerem que esta diminuição no consumo alimentar está relacionada à ação anorexígena do estradiol. Desde a década de 70, Wade e

Zucker já relatavam que a administração de benzoato de estradiol em ratas ovariectomizadas promovia redução na ingestão alimentar. Posteriormente, com a descoberta dos receptores de estrógeno ER α e ER β (Green e cols, 1985; Kuiper e cols, 1996), vários pesquisadores concluíram que o efeito anorexígeno do estradiol é mediado pela ativação destes receptores presentes nas áreas envolvidas no controle da homeostase energética, como PVN, VMH, NTS (Butera e cols, 1996; Diano e cols, 1998; Eckel & Geary, 2001; Eckel, Houpt & Geary, 2002).

Por conseguinte, este trabalho visa esclarecer a influência do estradiol nos mecanismos fisiológicos implicados no controle da homeostase energética.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da ovariectomia, com e sem reposição de estradiol, na ingestão alimentar e na expressão gênica de mediadores hipotalâmicos envolvidos no controle da homeostase energética.

2.2. Objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da ovariectomia e da reposição de estradiol na ingestão alimentar e no ganho de peso corporal;
2. Avaliar a concentração plasmática de leptina dos animais submetidos à ovariectomia com e sem reposição hormonal.
3. Avaliar a expressão de RNAm de NPY, AgRP, CART, POMC e ObRb no ARC; CRF, CART, MC4-R e ObRb no PVN; Pró-MCH, Orexina A, CART, MC4-R e ObRb na LHA de animais submetidos à ovariectomia com e sem reposição hormonal.
4. Avaliar o efeito da ovariectomia e da reposição de estradiol na ingestão alimentar e na variação de peso corporal após administração intracerebroventricular de leptina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas ratas adultas, da linhagem Wistar, pesando entre 200-230 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram ambientalizados, individualmente, em gaiolas metabólicas no biotério do Departamento de Fisiologia em temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12/12 horas (período de luz: 06h às 18h). Os animais tiveram livre acesso à água e ração, exceto nos experimentos em que houve a retirada da dieta. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, protocolo nº 004/2006.

3.2. Protocolos experimentais

3.2.1. Avaliação da ingestão alimentar, do peso corporal, da concentração plasmática de leptina e da expressão gênica dos mediadores hipotalâmicos.

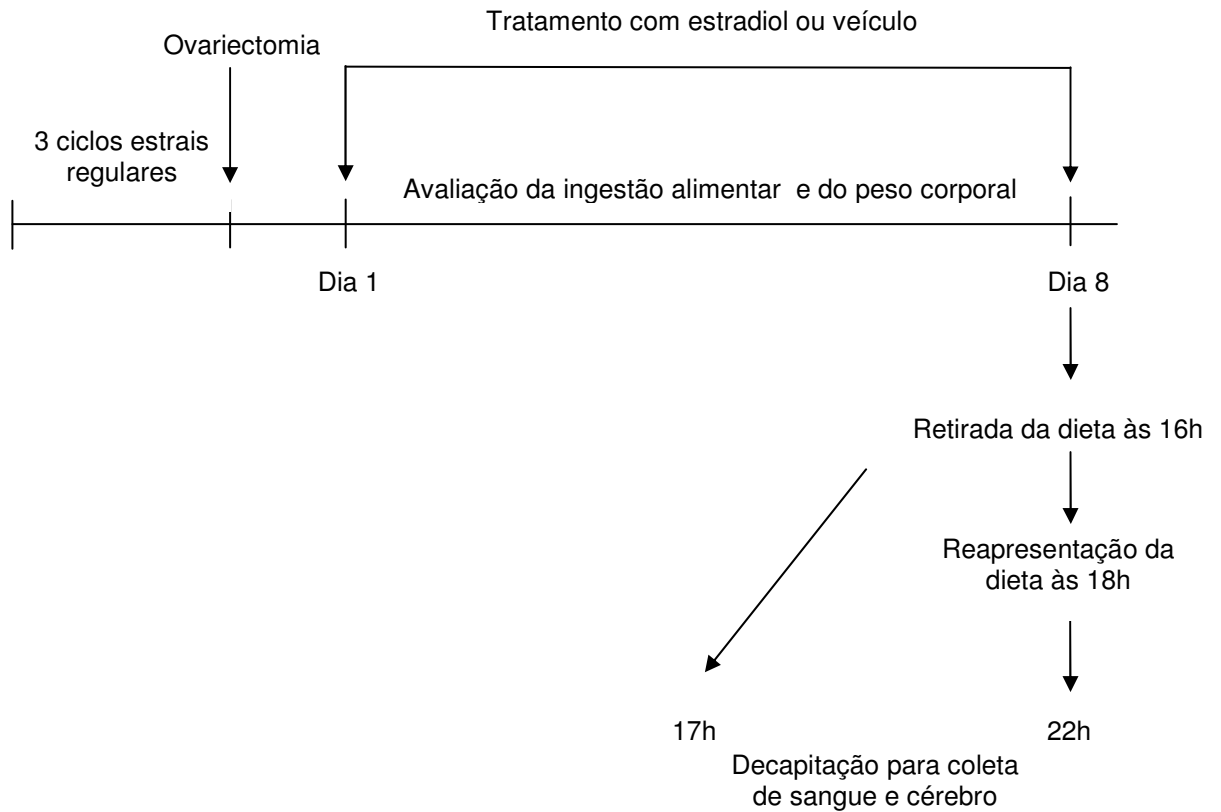
Após três ciclos estrais regulares, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral e divididas em dois grupos:

- ratas ovariectomizadas (OVX);
- ratas ovariectomizadas com reposição de estradiol (OVX+E).

No dia seguinte à cirurgia, estes animais receberam injeção subcutânea de cipionato de estradiol (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ peso corporal, Grupo OVX+E) ou veículo (óleo de milho: 0,1 mL/rata, Grupo OVX) entre 9h e 10h, por oito dias consecutivos. Durante este período, foram verificados, diariamente, entre 9h e 10h, a ingestão alimentar de 24 horas e o peso corporal. Em todo o período do experimento, as ratas tiveram livre acesso à água e ração disponibilizadas individualmente em gaiolas metabólicas, exceto como especificado abaixo.

No oitavo dia, a dieta foi retirada às 16h, e grupos de ratas OVX e OVX+E foram decapitados às 17h para coleta de sangue e do cérebro em condições livre de RNase (Esquema 1). Ao restante dos animais, a dieta foi reapresentada às 18h, ou seja, no momento em que a luz do biotério apagou-se, sendo estes animais dos grupos OVX e OVX+E decapitados às 22h para coleta de sangue e cérebro.

O sangue coletado do tronco foi utilizado para dosagem hormonal e o cérebro para extração de RNA total e quantificação dos mediadores hipotalâmicos pelo método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), como descritos posteriormente.



Esquema 1: Procedimentos experimentais para coleta de sangue e tecido cerebral. Ver texto para detalhes.

3.2.2. Avaliação da ingestão alimentar e do peso corporal após administração intracerebroventricular de leptina.

Após três ciclos estrais regulares, as ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral e à implantação de cânula no ventrículo lateral direito, e logo em seguida divididas em quatro grupos:

- ratas ovariectomizadas (OVX) + salina;
- ratas ovariectomizadas (OVX) + leptina;
- ratas ovariectomizadas com reposição de estradiol (OVX+ E) + salina;
- ratas ovariectomizadas com reposição de estradiol (OVX+E) + leptina.

No dia seguinte, estes animais receberam injeção subcutânea de cipionato de estradiol (10 µg/Kg peso corporal, OVX+E) ou veículo (óleo de milho: 0,1 mL/rata, OVX) entre 9h e 10h, por oito dias consecutivos. Em todo o período do experimento, as ratas tiveram livre acesso à água e ração disponibilizadas individualmente em gaiolas metabólicas, exceto como especificado abaixo.

No oitavo dia, a dieta desses animais foi retirada às 16h. Às 17h, iniciou-se a injeção central de leptina (*Leptin, Mouse, Recombinant, E.coli; Calbiochem*[®]) na dose de 10 µg/5µL ou veículo (salina estéril: 5µL/rata). Posteriormente, a dieta foi reapresentada às 18h, ou seja, no momento em que a luz do biotério apagou-se. A avaliação da ingestão alimentar foi realizada 2, 4, 14 e 24 horas após a reapresentação da dieta e o peso corporal foi avaliado 14 e 24 horas após. Posteriormente, estes animais foram decapitados para descarte.

3.3. Procedimentos cirúrgicos

3.3.1. Ovariectomia bilateral

Neste estudo foram incluídas apenas ratas que apresentaram três ciclos estrais regulares e consecutivos de quatro dias. A verificação do ciclo estral foi realizada, coletando-se o esfregaço vaginal diariamente com um conta-gotas contendo previamente solução de NaCl 0,9%. O líquido vaginal coletado foi analisado a fresco no microscópio óptico. Após três ciclos estrais regulares, as ratas foram ovariectomizadas, sob anestesia com 2,2,2-tribromoetanol (TBE 2,5%, 1 ml/100 g peso corporal, via intraperitoneal). Estes animais foram submetidos à

incisão bilateral longitudinal (1,5 cm de comprimento) da pele e do tecido subcutâneo entre a última costela e a coxa. Com o auxílio de uma pinça, o tecido muscular foi divulsionado para visualização dos ovários, os quais foram retirados. Após a retirada, foi realizada sutura com fio de algodão.

3.3.2. Canulação do ventrículo lateral

Logo após a ovariectomia, as ratas foram submetidas à implantação de uma cânula intracerebroventricular por meio de cirurgia estereotáxica. Durante esta cirurgia, os animais receberam um implante no ventrículo lateral direito de uma cânula guia de aço inoxidável de 0,7 mm de diâmetro externo, 0,4 mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento. O animal teve sua cabeça fixada num aparelho estereotáxico e uma incisão na parte superior da mesma foi realizada, expondo-se o bregma e o lâmbda. Um ajuste foi realizado para que estes pontos ficassem no mesmo plano horizontal. Após o implante, a cânula foi fixada por uma resina de acrílico autopolimerizável (Simplex[®]) sobre a calota craniana, com auxílio de parafusos de aço inoxidável fixados no crânio para assegurar uma maior adesão do polímero ao osso.

A cânula no ventrículo lateral direito foi posicionada utilizando-se as seguintes coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1997): ântero-posterior: -0,6 mm (posterior ao bregma); látero-lateral: -1,5 mm (direita ao bregma); vertical: -3,6 mm (a partir da superfície da calota craniana). Dentro de cada cânula foi inserido um mandril de aço para evitar a obstrução.

No final da cirurgia, os animais receberam uma injeção de antibiótico (Pentabiótico) na dose de: 0,1 mL/100 g peso corporal, por via intramuscular.

A posição da cânula foi verificada por meio da injeção central de angiotensina na dose de 25 ng/5 µL após o término do experimento. Neste estudo foram incluídas apenas ratas que ingeriram um volume de água maior que 1 mL, 10 minutos após a administração da angiotensina.

3.4. Coleta de sangue

O sangue do tronco foi coletado por decapitação em tubos contendo heparina, sob gelo. O plasma foi obtido após centrifugação por 20 minutos, 3000 rotações/min, a 4°C e posteriormente estocado a -20°C, até o momento da dosagem de leptina plasmática.

3.5. Coleta de tecido cerebral

Após a decapitação, o cérebro foi removido a partir da abertura da calota craniana, utilizando-se materiais cirúrgicos esterilizados e em ambiente livre de RNase, e congelado imediatamente em gelo seco. Logo em seguida, o cérebro foi estocado no freezer -80°C até a etapa de microdissecção dos núcleos hipotalâmicos estudados, como descrita abaixo.

3.6. Métodos laboratoriais

3.6.1. Dosagem de leptina plasmática

A dosagem da leptina plasmática foi realizada por radioimunoensaio utilizando-se kit comercial Murine Leptin (Linco®). A dose mínima detectável e o coeficiente de variação intra-ensaio foram, respectivamente, 0,5 ng/mL e 1,6%.

3.6.2. Análise quantitativa de expressão gênica por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real.

3.6.2.1. Microdissecção

Amostras de tecidos do PVN, ARC e LHA foram obtidas por microdissecção de secções coronais de 600 µm (para o PVN) e 1500 µm (para o ARC e LHA), segundo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (1997): -1,7 mm até -2,3 mm (PVN) e -2,3 mm até -3,8 mm (ARC e LHA), em relação ao bregma. As secções coronais específicas foram obtidas em criostato sob -20°C e coletadas diretamente em lâminas. As amostras das regiões hipotalâmicas foram coletadas por meio de

uma agulha estéril de 1,5 mm de diâmetro, transferidas para um tubo estéril contendo previamente uma solução estabilizadora de RNA (RNA/later, Ambion®) e armazenadas a 4°C até a extração de RNA. Em cada tubo foi colocado um núcleo hipotalâmico de apenas um animal. Todos os procedimentos foram realizados em condições livres de RNase.

3.6.2.2. Extração de RNA total e realização de PCR em tempo real

O RNA total dessas amostras foi extraído utilizando-se TRIzol Reagent (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação desse RNA total foi realizada em espectrofotômetro com absorvância de 260 nm (Biofotometer Eppendorf). A integridade e a qualidade do RNA total extraído foram avaliadas pelo método de eletroforese em gel de agarose 1,2%. As amostras de RNA total foram consideradas aceitáveis para uso posterior, somente quando as bandas 18S e 28S do RNA ribossômico foram visualizadas no gel.

Após esta etapa, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir de 250 ng de RNA, por kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®). Neste protocolo, utilizaram-se os seguintes reagentes: 1,25 µl de 10X RT Buffer, 0,50 µl de 25X dNTP Mix (100mM), 1,25 µl de 10X RT Random Primers, 0,75 µl de MultiScribe Reverse Transcriptase e 18,75 µl de água DEPC (dietilpirocarbonato). A transcrição reversa foi realizada em termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems®) nas seguintes condições: 10 min a 25°C e 120 min a 37°C. O cDNA obtido foi diluído em água DEPC na proporção 1:5 e armazenado no freezer – 20°C até ser utilizado para as reações de PCR em tempo real.

Para realização da PCR em tempo real em triplicata, foram utilizados 4 µl de cDNA e 8 µl de uma mistura contendo 6,25 µl de solução Taqman® 2X Master Mix (Applied Biosystems®), 0,65 µl de sonda específica e 1,60 µl de água DEPC.

As sondas utilizadas foram adquiridas da Applied Biosystems® e estão descritas abaixo.

Tabela 1: Ensaios de expressão gênica para PCR em tempo real

| Sonda | Taqman® Gene Expression Assay ID |
|---|----------------------------------|
| AgRP | Rn 01431703_g1 |
| β-actina | 4352340E |
| CART | Rn 00567382_m1 |
| CRF | Rn 01462137 |
| Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) | 4352338E |
| MC4-R | Rn 01491866_s1 |
| NPY | Rn 01410145_m1 |
| ObRb | Rn 00561465_m1 |
| Orexina A | Rn 00565995_m1 |
| POMC | Rn 00595020_m1 |
| Pró-MCH | Rn 00561766_g1 |
| RNA ribossômico 18S | 4333760T |

A PCR foi realizada em um equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®), após a desnaturação inicial de 10 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 s de desnaturação a 95°C e 1 min de anelamento e extensão a 60°C. Três genes de referência (*housekeeping gene*) foram utilizados como controles endógenos: β-actina, GAPDH e RNA ribossômico 18S para normalizar as reações. A expressão relativa do gene alvo foi calculada baseando-se no *threshold cycle* (Ct). Os resultados foram analisados de acordo com o método $\Delta\Delta Ct$. A média geométrica do Ct dos genes de referência (β-actina, GAPDH e RNA ribossômico 18S) foi subtraída do Ct do gene de interesse para determinar o ΔCt de cada amostra ($\Delta Ct = Ct_{\text{Desconhecido}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$). O ΔCt do calibrador (grupo controle) foi subtraído do ΔCt de cada amostra para determinar o $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Desconhecido}} - \Delta Ct_{\text{Calibrador}}$). Este valor foi aplicado na equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, cujo resultado representa a expressão relativa de RNAm expressa em unidades arbitrárias.

3.7. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A significância estatística da diferença entre as médias dos grupos estudados foi determinada pela aplicação dos seguintes testes: test-t não pareado e análise de variância. Análise de variância *two-way* ANOVA para medidas repetidas, seguida de teste de Student-Newman-Keuls foi aplicada para comparação dos resultados de ingestão alimentar e peso corporal diários. Para comparação da média de ingestão alimentar diária e ganho total de peso corporal, foi utilizado o test-t não pareado. Para os resultados de concentração plasmática de leptina, expressão relativa de RNAm, ingestão alimentar e variação do peso corporal após administração icv de leptina aplicou-se a análise de variância *two-way* ANOVA, seguido do pós-teste Student-Newman-Keuls. O nível de significância adotado foi de 5%. A análise estatística foi realizada utilizando-se o Programa SigmaStat, versão 3.1, *Software* SYSTAT.

4.1. Avaliação da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal após ovariectomia com e sem reposição de estradiol.

A figura 1 apresenta o resultado da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal dos animais submetidos à ovariectomia com e sem reposição hormonal por oito dias consecutivos após a cirurgia. Observa-se que a reposição de estradiol promoveu uma diminuição ($p < 0,01$) no consumo alimentar diário ($9,7 \pm 0,2$ g/100g peso corporal) ao se comparar com o grupo OVX ($10,8 \pm 0,3$ g/100g peso corporal). Pode-se observar também que o grupo OVX+E induziu uma redução ($p < 0,01$) no ganho total de peso corporal ($28,3 \pm 2,7$ g) em relação ao grupo OVX ($42,2 \pm 2,9$ g).

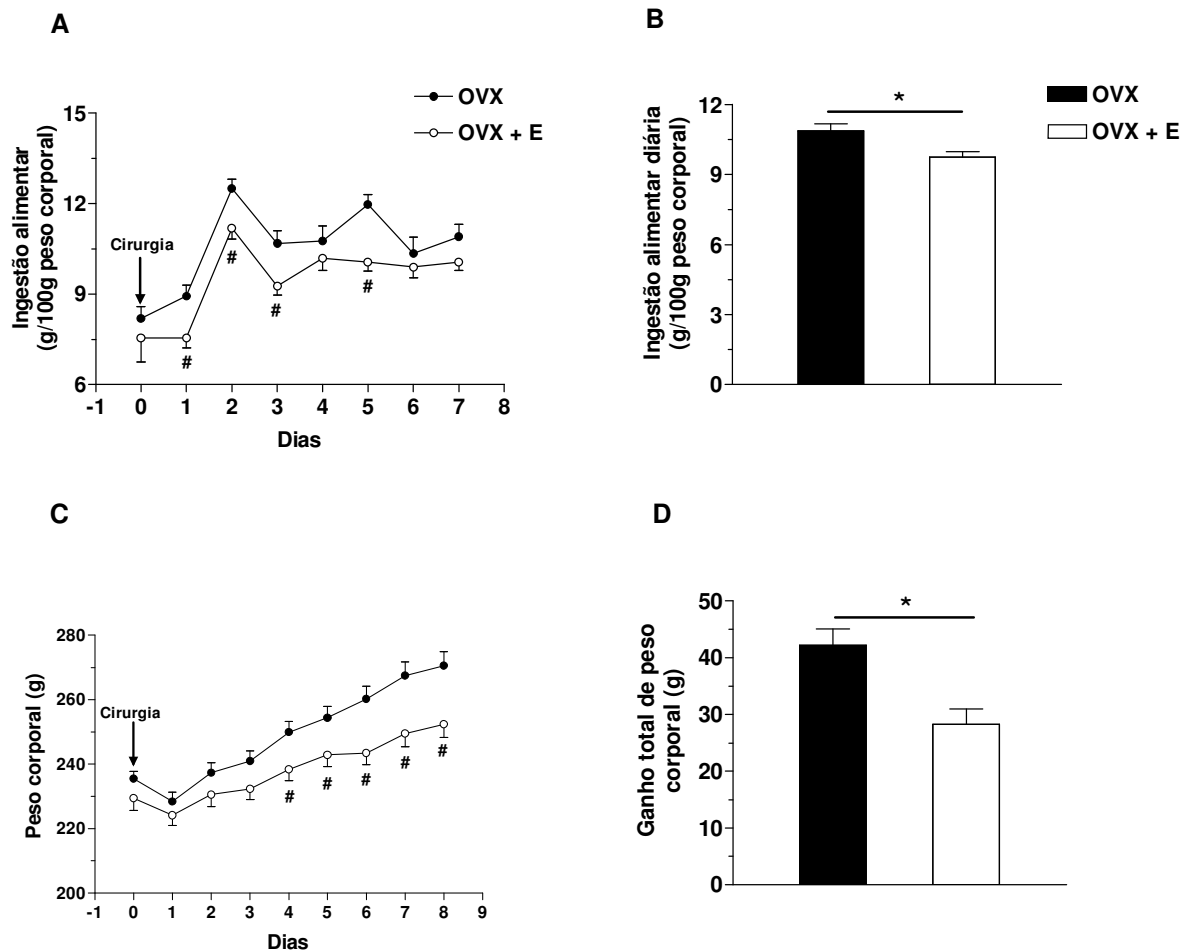


Figura 1. Valores diários (A e C) (Média±EPM) e média (B e D) da ingestão alimentar (g/100 g peso corporal) e do peso corporal (g), respectivamente, de ratas ovariectomizadas com (OVX+E, n=15) e sem reposição (OVX, n=13) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal. * $p < 0,01$; # $p < 0,05$ OVX versus OVX+E.

4.2. Avaliação da concentração plasmática de leptina dos animais submetidos à ovariectomia com e sem reposição de estradiol.

A figura 2 representa a concentração plasmática de leptina de ratas ovariectomizadas com e sem reposição de estradiol, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h). Verifica-se que a reposição de estradiol induziu, nos dois períodos estudados, maior concentração plasmática de leptina ($p < 0,05$), em relação ao grupo OVX (17h: $2,4 \pm 0,3$ ng/mL versus $1,6 \pm 0,3$ ng/mL e 20h: $3,7 \pm 0,3$ ng/mL versus $2,5 \pm 0,3$ ng/mL). As concentrações plasmáticas de leptina às 22h foram significativamente maiores quando comparadas às concentrações das 17h, tanto no grupo OVX como OVX+E.

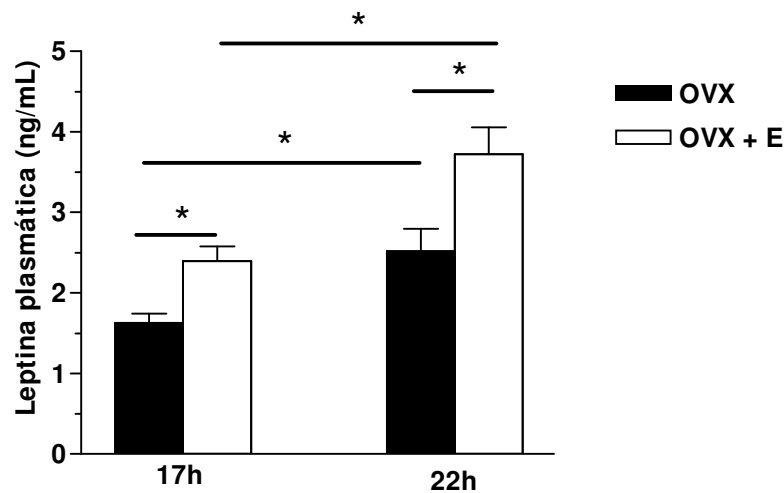


Figura 2. Concentração plasmática de leptina (ng/mL) (Média±EPM), no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E, n= 7-8) e sem reposição (OVX, n= 7-8) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal. * $p < 0,05$.

4.3. Avaliação da expressão relativa de RNAm dos mediadores hipotalâmicos envolvidos no controle da homeostase energética dos animais submetidos à ovariectomia com e sem reposição de estradiol.

Na figura 3 estão apresentadas em unidades arbitrárias as expressões relativas de RNAm dos genes alvos investigados no ARC de ratas ovariectomizadas com e sem reposição de estradiol, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h).

Pode-se observar que para o RNAm de ObRb e POMC, não houve diferença na expressão dos mesmos entre os animais OVX e OVX+E, nos dois períodos estudados. Por outro lado, a presença do estradiol induziu uma redução ($p < 0,05$) da expressão relativa de RNAm de NPY e AgRP no período das 17h. Para o RNAm de CART, tanto no período pré- como pós-alimentação, houve uma redução ($p < 0,05$) da sua expressão relativa nos animais que receberam estradiol.

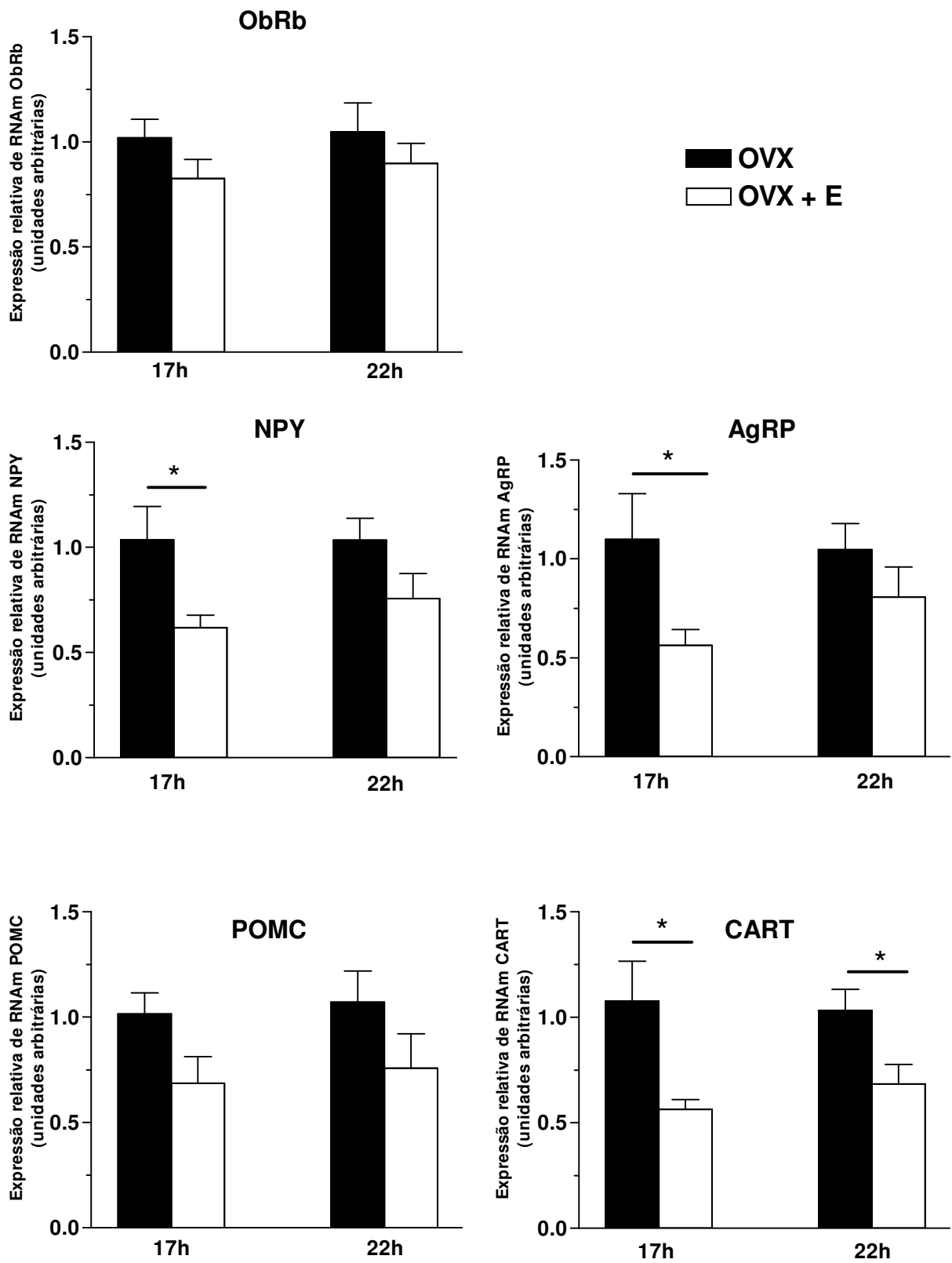


Figura 3. Expressão relativa de RNAm (Média±EPM) de ObRb, NPY, AgRP, POMC e CART no ARC, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem reposição (OVX) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal. * $p < 0,05$, $n = 4-7$.

Na figura 4 estão apresentadas em unidades arbitrárias as expressões relativas de RNAm dos genes alvos investigados no PVN de ratas ovariectomizadas com e sem reposição com estradiol, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h).

Verifica-se às 17h que a expressão de RNAm de ObRb, MC4-R, CRF e CART no PVN foi maior no grupo OVX+E comparada ao grupo OVX, não havendo diferença entre os dois grupos às 22h. O grupo OVX não apresentou diferença na expressão de RNAm desses genes entre os dois períodos avaliados. No entanto, no grupo OVX+E, a expressão dos referidos genes foi maior às 17h.

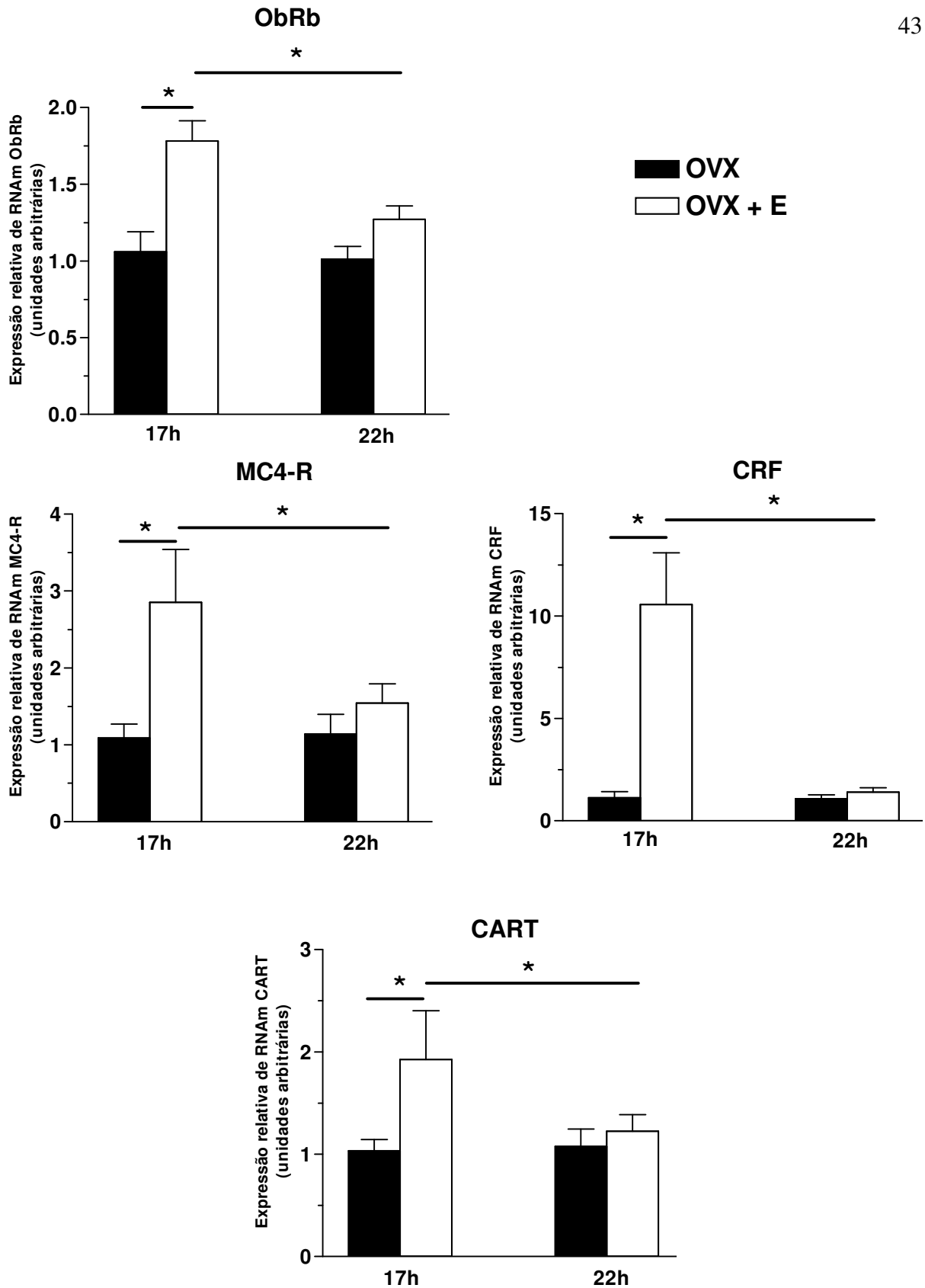


Figura 4. Expressão relativa de RNAm (Média±EPM) de ObRb, MC4-R, CRF e CART no PVN, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem reposição (OVX) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal. * p<0,05, n=4-8.

A figura 5 apresenta em unidades arbitrárias as expressões relativas de RNAm dos genes alvos investigados na LHA de ratas ovariectomizadas com e sem reposição de estradiol, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h).

Pode-se observar que para o RNAm de MC4-R e Pró-MCH na LHA, não houve diferença na expressão dos mesmos entre os animais OVX e OVX+E, nos dois períodos estudados. Foi observado também que às 22h, a expressão de RNAm de ObRb e CART foi maior no grupo de ratas OVX+E quando comparada com o grupo OVX, porém não houve diferença entre os dois grupos no período das 17h. O grupo OVX não apresentou diferença na expressão de RNAm desses dois genes entre os dois períodos. Entretanto, no grupo OVX+E, a expressão dos genes ObRb e CART foi maior às 22h.

Para a orexina A, observamos, às 17h, que a expressão de RNAm deste neuropeptídeo foi menor no grupo OVX+E em relação ao grupo de ratas OVX, não havendo diferença às 22h. Além disso, o grupo OVX não apresentou diferença na expressão de RNAm da orexina ao se comparar o valor das 17h com o valor das 22h. Contudo, no grupo OVX+E, a expressão de RNAm para orexina A foi maior às 22h.

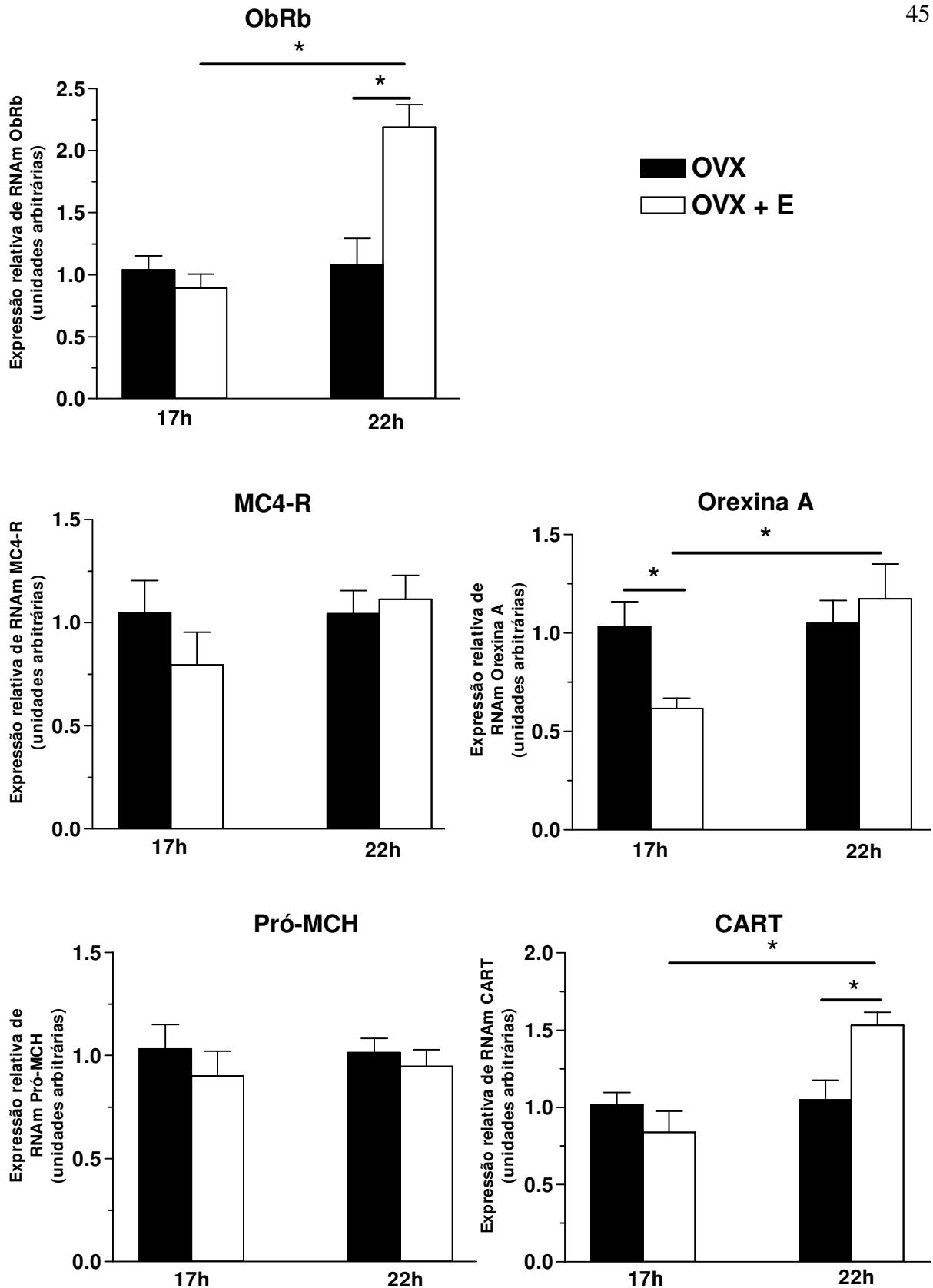


Figura 5. Expressão relativa de RNAm (Média±EPM) de ObRb, MC4-R, orexina A, Pró-MCH e CART da LHA, no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem reposição (OVX) de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal. * p<0,05, n=5-8.

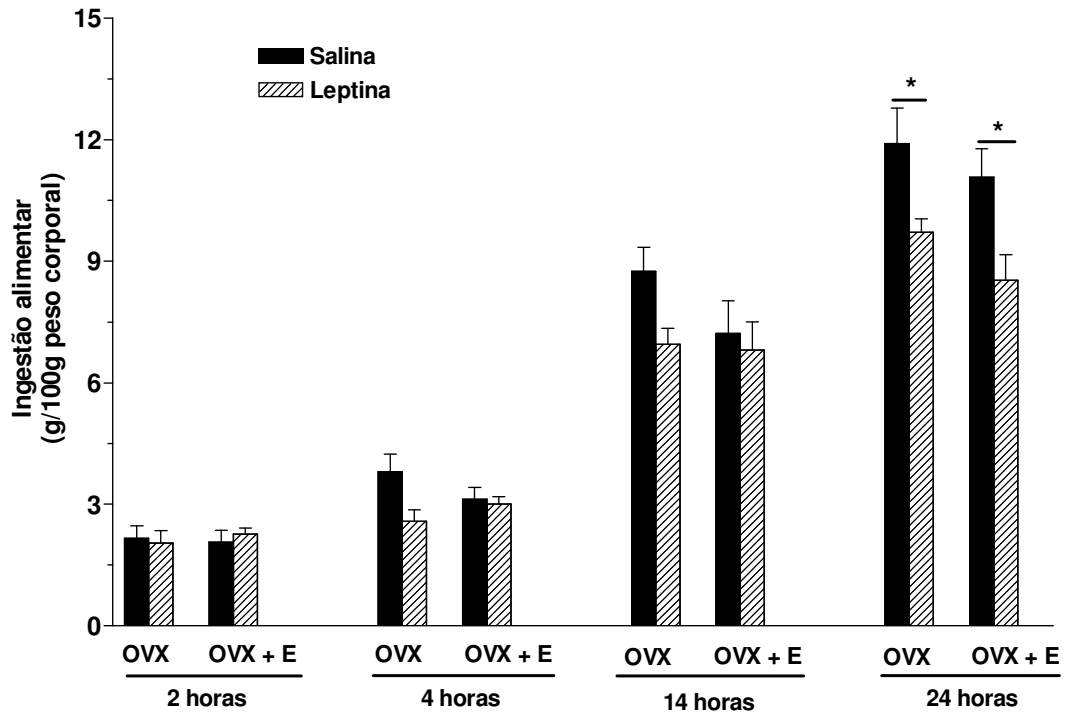
4.4. Avaliação do efeito da ovariectomia e da reposição de estradiol na ingestão alimentar e na variação de peso corporal após administração intracerebroventricular de leptina.

A figura 6 mostra os valores de ingestão alimentar (fig. 6A) de 2, 4, 14 e 24 horas após reapresentação da dieta e a variação do peso corporal (fig. 6B) 14 e 24 horas após, em ratas ovariectomizadas com e sem reposição de estradiol e submetidas à administração icv de salina ou leptina.

Pode-se verificar que no período das 24 horas após reapresentação da dieta, a leptina reduziu ($p < 0,05$) o consumo alimentar no grupo OVX ($9,7 \pm 0,6$ g/100g peso corporal vs $11,9 \pm 0,6$ g/100g peso corporal) e OVX+E ($8,5 \pm 0,7$ g/100g peso corporal vs $11,0 \pm 0,6$ g/100g peso corporal), quando comparado à injeção de salina. A ingestão alimentar após injeção de leptina do grupo OVX não foi diferente quando comparada ao grupo OVX+E.

Em relação à variação do peso corporal, observa-se que 14 horas após reapresentação da dieta, a administração de leptina icv induziu uma redução ($p < 0,05$) do peso corporal das ratas OVX ($-0,3 \pm 1,5$ g) e OVX+E ($-5,4 \pm 1,8$ g), quando comparada à injeção de salina (OVX: $5,8 \pm 1,5$ g; OVX+E: $2,1 \pm 1,5$ g). Esta redução do peso, após a administração de leptina, persistiu 24 horas após reapresentação da dieta em ambos os grupos (OVX: $-3,3 \pm 1,4$ g; OVX + E: $-7,8 \pm 1,6$ g). Comparando-se a variação do peso corporal dos dois grupos, após injeção de leptina, observou-se que o grupo OVX+E apresentou uma maior perda de peso corporal, tanto 14 horas como 24 horas após a reapresentação da dieta.

A



B

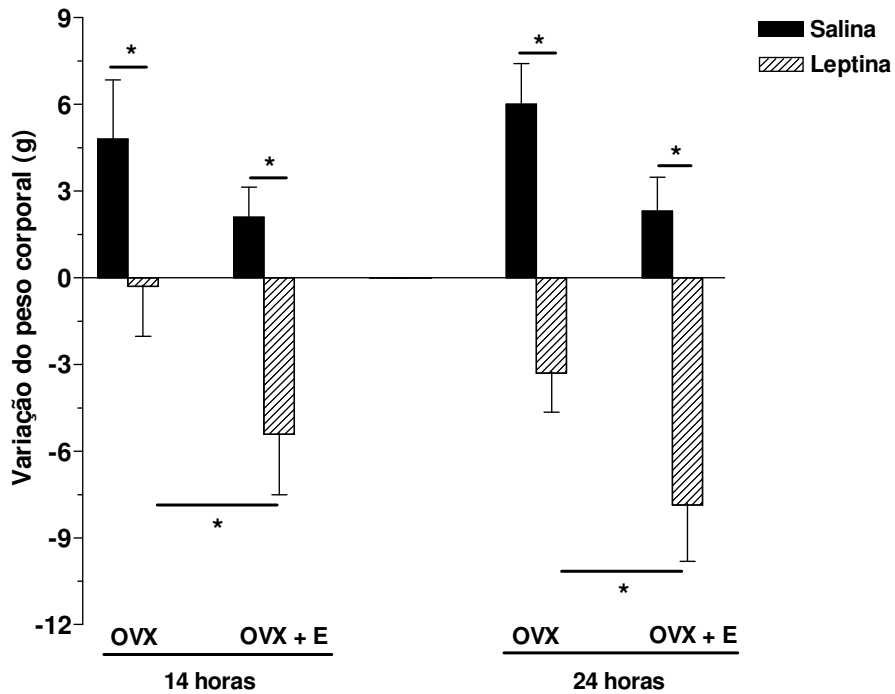


Figura 6. Valores (Média±EPM) de ingestão alimentar (g/100g peso corporal) (A) e variação do peso corporal (g) (B) de ratas ovariectomizadas com (OVX+E, n= 7-10) e sem reposição (OVX, n= 10) de estradiol, e submetidas à administração icv de salina ou leptina no oitavo dia pós-cirúrgico. * p<0,05.

O controle neuroendócrino da ingestão alimentar e do peso corporal é influenciado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada como verificado em várias espécies, inclusive a humana. Desde a década de 40, já se observava variação na ingestão e no peso corporal de ratas adultas, de acordo com o ciclo estral. Durante o estro foi verificada redução da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal (Brobeck, Wheatland & Strominger, 1947). No entanto, este padrão foi revertido na fase de diestro, quando a concentração plasmática dos esteróides sexuais encontra-se baixa.

Em nosso estudo, a avaliação do efeito do estradiol na ingestão alimentar e no peso corporal demonstrou que a deficiência desse esteróide sexual, induzida pela ovariectomia, promoveu um aumento significativo no consumo alimentar diário e no ganho total de peso corporal; quando comparado ao grupo com reposição de estradiol. Esses resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que vários estudos realizados desde 1970 até os dias atuais têm demonstrado dados semelhantes (Wade & Zucker, 1969; Wade & Zucker, 1970; Wade, 1975; Geary & Asarian, 1999, Chu e cols, 1999; Eckel & Geary, 2001; Kimura e cols, 2002). Este efeito do estradiol na ingestão alimentar e no peso corporal parece ser mediado pela sua ligação ao receptor $ER\alpha$, como demonstrado em ratas Sprague-Dawley OVX tratadas com injeções diárias subcutâneas de agonista seletivo para o receptor $ER\alpha$ por 14 dias, em que se observou a redução da ingestão alimentar e do ganho total de peso corporal (Roesh, 2006). Estes mesmos efeitos não foram verificados após injeções do agonista seletivo para o receptor $ER\beta$ (Roesh, 2006). Atualmente, sabe-se que as duas isoformas do receptor de estradiol estão presentes em vários locais envolvidos no controle da homeostase energética, como nos núcleos hipotalâmicos (Shughrue, Lane & Merchenthaler, 1997; Osterlund e cols, 1998; Diano e cols, 1998; Eckel & Geary, 2001; Eckel e cols, 2002) e, também, no tecido adiposo (Wade & Gray, 1978; Gray e cols 1981; Pedersen e cols, 1991). Contudo, os mecanismos que medeiam os efeitos do estradiol na modulação do controle da homeostase energética ainda não estão totalmente esclarecidos. Para compreender melhor esses mecanismos, investigamos, primeiramente, se o efeito anorexígeno do estradiol poderia estar relacionado com o aumento na síntese e liberação da leptina, hormônio adipocitário que inibe o apetite.

Nossos experimentos com animais OVX e OVX+E demonstraram que a ovariectomia induziu uma diminuição da concentração plasmática de leptina no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h). Esses dados confirmam os dados prévios da literatura de que o estradiol influencia a síntese e liberação de leptina (Shimizu e cols, 1997; Machinal e cols, 1999; Brann e cols, 1999; Elbers e cols, 1999; Hadji e cols, 2000), e estão de acordo com a descrição da presença de receptores estrogênicos nos adipócitos relatados por Wade & Gray (1978). Utilizando estudo *in vitro*, Machinal e cols (1999) observaram que a exposição ao estradiol por 24 horas em cultura de adipócito de tecidos subcutâneos, perirenal e parametrial de ratas OVX aumentava a expressão do gene *ob* e a liberação da proteína leptina. Neste mesmo estudo, foi observado, também, que este efeito foi abolido pelo uso de um anti-estrógeno. Estudos, *in vivo*, demonstraram que a injeção de estradiol aumentou significativamente a expressão de RNAm de *ob* no tecido adiposo branco subcutâneo (Shimizu e cols, 1997) e peritoneal (Brann e cols, 1999) e a concentração plasmática de leptina de ratas OVX (Shimizu e cols, 1997; Brann e cols, 1999). Estes efeitos do estradiol foram relatados também em mulheres na pós-menopausa, em que se observou elevação da leptina plasmática após o tratamento com estradiol (Elbers e cols, 1999; Hadji e cols, 2000).

A leptina, sintetizada principalmente pelos adipócitos, atua como importante fator circulante que conduz informação ao cérebro sobre o estoque energético disponível na forma de tecido adiposo. No jejum, ocorre acentuada diminuição da leptina plasmática e da expressão do gene *ob* nos adipócitos. No entanto, após o período de realimentação essas alterações são revertidas (Trayhurn e cols, 1995; Hardie e cols, 1996). A leptina, juntamente com a insulina, promove sua ação inibitória na ingestão alimentar por meio da inibição de neurônios NPY/AgRP e da estimulação de neurônios POMC/CART do ARC (Schwartz e cols, 1996 e 1997). Além disso, a leptina pode atuar diretamente no PVN e na LHA e induzir, respectivamente, o aumento de CRF (Huang, Rivest & Richard e cols, 1998) e diminuição de orexina A e MCH (Qu e cols, 1996; Beck & Richy, 1999).

No presente estudo observamos um aumento da concentração plasmática de leptina no período pós-alimentação (22h), quando comparada à concentração pré-alimentação (17h), tanto no grupo OVX como no grupo OVX+E. Estudos anteriores relataram que a concentração plasmática de leptina aumenta após a refeição (Barr e cols, 1997). Esse aumento é mediado, em parte, pela insulina, a qual é capaz de

estimular diretamente a síntese e liberação de leptina pelos adipócitos (Barr e cols, 1997). Estes dados confirmam que a leptina plasmática e sua expressão gênica no tecido adiposo branco podem ser reguladas por estímulos agudos (Elmqvist, Elias & Saper, 1999). Alguns trabalhos sugerem que a leptina participa dos mecanismos de saciedade, modulando assim o tamanho da refeição (Saladin e cols, 1995; Peters e cols, 2005). Portanto, além dos efeitos da leptina no controle a longo prazo na homeostase energética, esses dados corroboram a participação da leptina nos mecanismos de controle agudo da ingestão alimentar.

As maiores concentrações de leptina plasmática no período pós-alimentação do grupo OVX+E sugerem que a diminuição do consumo alimentar e do ganho de peso corporal destes animais pode ser uma consequência do aumento do sinal de saciedade promovido pela leptina durante a refeição.

Ainda tentando esclarecer os mecanismos fisiológicos exercidos pelo estradiol, capazes de modular o controle da homeostase energética, investigamos se o estradiol modificava ou não, a expressão de RNAm dos mediadores envolvidos no balanço energético no ARC, PVN e LHA, no período pré- e pós-alimentação. Os resultados deste experimento demonstraram, pelo método de PCR em tempo real, que o tratamento com estradiol reduziu a expressão relativa de RNAm de NPY, AgRP e CART no ARC; e RNAm de orexina A na LHA. Por outro lado, o tratamento com estradiol aumentou a expressão relativa de RNAm de ObRb, MC4-R, CART e CRF no PVN; e RNAm de ObRb e CART na LHA. Estes resultados sugerem que o efeito anorexígeno do estradiol pode ser mediado pela síntese menor de NPY em neurônios do ARC, e por conseguinte, menor sinalização destas projeções neuronais para o PVN. Os dados obtidos estão de acordo com a demonstração de menor liberação de NPY no PVN, sob tratamento com estradiol em estudo *in vitro* (Bonavera e cols, 1994). Outros pesquisadores demonstraram redução do conteúdo de NPY no ARC, após administração de estradiol em ratas OVX (Crowley e cols, 1985) e redução da expressão de RNAm deste neuropeptídeo em ratas OVX+E submetidas ao jejum de 48 horas (Baskin e cols, 1995). Recentemente, foi demonstrado pelo método de hibridização *in situ* que a administração de estradiol em camundongos fêmeas OVX causou redução na expressão de RNAm de NPY no ARC (Pelletier, Luu-The & Labrie, 2007). Além disto, foi demonstrado, também, que durante a lactação, estado fisiológico em que há redução da concentração plasmática de estradiol e aumento da ingestão alimentar, há um aumento da

expressão de RNAm de NPY (Pape & Tramu, 1996). A presença de receptores estrogênicos em neurônios NPY do ARC (Sar, Sahu e cols 1990) sugere a ação direta do estradiol na expressão de NPY.

A anorexia induzida pelo estradiol também pode estar relacionada com a síntese menor de AgRP em neurônios do ARC. Chen e cols (1999) demonstraram, pelo método de hibridização *in situ*, um aumento na expressão de RNAm de AgRP durante a lactação. O AgRP tem sido implicado na regulação do sistema da melanocortina central, pelo seu efeito orexigênico atuando como antagonista endógeno da sinalização dos receptores MC3-R e MC4-R no hipotálamo (Ollmann e cols., 1997; Rossi e cols., 1998). No entanto, Santollo & Eckel, 2007 não verificaram diminuição do consumo alimentar após administração icv de AgRP em ratas OVX, submetidas ao tratamento com estradiol. Logo, a anorexia mediada pelo estradiol não depende somente da inibição do AgRP, e sim de outros sistemas neuronais envolvidos no controle da homeostase energética.

No presente estudo, o efeito hipofágico do estradiol esteve associado à redução da expressão de orexina A na LHA, considerada um potente orexígeno (Mazza e cols, 2005). Na literatura, os dados de conteúdo de orexina A no hipotálamo durante o ciclo estral são controversos, com relato de aumento (Porkka-Heiskanen e cols, 2004) ou de redução (Russell e cols, 2001) no proestro, quando comparado ao diestro. Portanto, a participação da orexina A nos mecanismos dos efeitos hipofágicos do estradiol necessitam de mais estudos para o seu esclarecimento. Deve ser mencionado que além da sua ação no comportamento alimentar, a orexina A interfere no eixo gonadal diminuindo a frequência dos pulsos de LH em ratas OVX (Tamura, 1999) e estimulando a liberação de GnRH, como relatado em estudo *in vitro* utilizando tecido hipotalâmico de ratas no proestro (Russell e cols, 2001). Assim, tem sido sugerido que a orexina pode participar nos mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Russell e cols, 2001).

Considerando-se ainda os efeitos do estradiol na ingestão e no peso corporal, podemos dizer que o aumento da expressão relativa de RNAm de ObRb, MC4-R, CART e CRF no PVN; e RNAm de ObRb e CART na LHA contribui também para os efeitos do estradiol como importante modulador fisiológico da homeostase energética.

O aumento da expressão relativa de RNAm de ObRb no PVN e na LHA observados nos animais OVX+E é concordante com um dado interessante publicado por Rocha e cols (2004). Neste estudo os autores demonstraram um aumento da expressão gênica de ObRb hipotalâmico em ratas OVX submetidas ao tratamento com estradiol por 48 horas. Podemos sugerir então, que o aumento da expressão relativa de RNAm de ObRb em ratas OVX+E, verificado em nosso estudo, poderia contribuir para uma possível elevação na sensibilidade à leptina, e assim induzir uma hipofagia mediada pela ativação das vias neuronais anorexígenas e inibição das vias orexígenas responsivas à leptina. Dados recentes da literatura mostraram que os efeitos do estradiol diminuindo a ingestão alimentar e o ganho de peso são observados também em camundongos *ob/ob* e *db/db*, indicando que estes efeitos do estradiol envolvem outros fatores além da ação da leptina (Gao e cols, 2007). Foi demonstrado que estes efeitos do estradiol no peso corporal são dependentes de Stat 3 (*Signal transducer and activator of transcription-3*), pois o tratamento com estradiol não afeta o peso corporal de camundongos com ausência do gene Stat 3 (Gao e cols, 2007). Desde que a via de sinalização da leptina também envolve a fosforilação de Stat 3 (Sahu, 2003), é possível que haja uma interação da via de sinalização deste hormônio com a via de sinalização do estradiol, o que facilitaria ou amplificaria os seus efeitos fisiológicos.

Observamos que a expressão de MC4-R no PVN esteve aumentada no grupo OVX+E às 17h, sugerindo que mesmo na presença de expressão inalterada de POMC no ARC, a via de sinalização do α -MSH, peptídeo derivado da POMC que se liga ao MC4-R no PVN, poderia estar aumentada. Assim, esta via contribuiria também para o efeito hipofágico do estradiol.

No PVN, observamos também aumento da expressão de CART com a reposição estrogênica, que poderia estar implicado nos efeitos do estradiol. Reforçando a participação do CART na homeostase energética, foi demonstrado que a administração deste neuropeptídeo no PVN diminui a ingestão alimentar induzida pelo NPY e aumenta a expressão gênica das proteínas desacopladoras UCP1, UCP2 e UCP3 no tecido adiposo marrom, branco e tecido muscular, respectivamente (Wang e cols, 2000). Observamos que a expressão de CART esteve diminuída no ARC do grupo OVX+E. Neurônios CART do ARC projetam-se para neurônios GnRH, e o neuropeptídeo CART aumenta a pulsatilidade da liberação do GnRH (Rondini e cols, 2004). Portanto, o aumento da expressão

relativa de RNAm de CART no ARC em ratas OVX, verificado em nosso estudo, poderia contribuir para aumento da síntese de GnRH após ovariectomia.

Um dado interessante do nosso trabalho foi o aumento acentuado de RNAm de CRF no PVN, na presença do estradiol. Dados da literatura têm demonstrado que a administração central de CRF promove hipofagia e aumento do gasto energético (Arase e cols 1988), o qual representa um outro fator determinante no balanço energético. O aumento do gasto energético induzido pelo CRF é uma consequência do aumento da atividade simpática no tecido adiposo marrom, o qual está envolvido na termogênese (LeFeuvre, Rothwell e Stock, 1987; Arase e cols 1988, Egawa, Yoshimatsu e Bray, 1990).

A expressão de RNAm de CRF é elevada em resposta à administração icv de leptina (Morimoto e cols., 2000). Portanto, no modelo utilizado, o aumento da concentração plasmática de leptina, observado no grupo OVX+E, poderia contribuir para a expressão maior de CRF no PVN. Alguns pesquisadores relataram que o efeito hipofágico do estradiol foi abolido pela administração central de antagonista de CRF (Dagnault, Ouerghi e Richard, 1993). Além disso, Pelletier, Luu-The & Labrie (2007) encontraram expressão de RNAm de CRF aumentada no PVN de camundongos fêmeas OVX com reposição de estradiol. Assim, nossos resultados de quantificação de RNAm de CRF no PVN são concordantes com a literatura, e reforçam a participação do CRF na regulação da homeostase energética com a reposição estrogênica.

É importante destacar que a influência do estradiol em neurônios CRF pode ser direta, uma vez que 40% destes neurônios localizados na porção parvocelular do PVN de humanos expressam o receptor $ER\alpha$ (Bao e cols, 2005). Além disso, a presença de elementos responsivos ao estrógeno na região promotora do gene do CRF (Torpy, Papanicolaou e Chrousos, 1997) reforça o conceito de que o estradiol modula a transcrição deste gene. A demonstração de que lesão bilateral do PVN, região de grande expressão de CRF, não impede a capacidade do estradiol induzir anorexia (Dagnault & Richard, 1994), evidencia que outras áreas estão envolvidas na modulação do apetite pelo estradiol.

Com objetivo de elucidar se as mudanças no consumo alimentar e no peso corporal, observados com a deficiência do estradiol, poderiam ser decorrentes de alteração da resposta ao estímulo com leptina, realizamos um experimento para avaliar o efeito da ovariectomia e da reposição de estradiol na resposta à

administração icv de leptina. Neste experimento verificamos que a injeção de leptina reduziu, significativamente, a ingestão alimentar semelhantemente nos dois grupos estudados (OVX e OVX+E). Porém, verificamos que a administração de leptina induziu uma perda de peso muito mais acentuada nas ratas OVX+E. Além da sua ação inibitória no apetite, a leptina contribui para a regulação da termogênese por meio da ativação do sistema nervoso simpático (Gómez-Ambrosi, Frühbeck & Martinez e cols, 1999). Assim, diante da maior perda de peso na presença de estradiol, pode-se inferir que a reposição estrogênica induz aumento dos efeitos da leptina no gasto energético. Foi demonstrado que o efeito da leptina no gasto energético está associado ao aumento da atividade simpática (Scarpace & Matheny, 1998). A administração icv de leptina aumenta a expressão de RNAm de UCP1 no tecido adiposo marrom, marcador de gasto energético, sendo este efeito bloqueado pelo uso prévio de antagonista de CRF (Masaki e cols., 2003). Portanto, o aumento do gasto energético com a reposição estrogênica poderia ser atribuído à maior expressão de CRF no PVN, como observado no grupo OVX+E. Deve ser considerado também, que o maior gasto energético com a reposição de estradiol possa ser decorrente de seus efeitos diretos no tecido adiposo marrom e branco, aumentando a expressão de UCP1 e UCP2 (Pedersen e cols, 2001), desde que foi demonstrada a presença de receptor de estrógeno alfa e beta neste tecido (Pedersen e cols, 1991; Crandal e cols, 1998, Pedersen e cols, 2001). Esses dados sugerem que, ao estímulo com leptina, o estradiol não modifica a resposta anorexigênica, porém aumenta a perda de peso por meio do aumento do gasto energético.

O conjunto dos dados obtidos indica que a reposição de estradiol em ratas ovariectomizadas induz menor ingestão alimentar, menor ganho de peso corporal e maior gasto energético, sendo esses efeitos associados à expressão diferenciada de peptídeos envolvidos na homeostase energética.

6. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Os dados do presente trabalho demonstram que a reposição de estradiol em ratas ovariectomizadas induz:

- 1- Diminuição da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal.
- 2- Aumento das concentrações plasmáticas de leptina no estado pré-alimentar, bem como em resposta à alimentação.
- 3- Redução da expressão de RNAm de NPY, AgRP e CART no ARC; e RNAm de orexina A na LHA.
- 4- Aumento da expressão de RNAm de ObRb, MC4-R, CART e principalmente de CRF no PVN; e RNAm de ObRb e CART na LHA.
- 5- Manutenção da resposta anorexigênica ao estímulo central com leptina.
- 6- Aumento da perda de peso corporal ao estímulo central com leptina.

A diminuição da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal, estaria associada à redução da expressão gênica de fatores orexigênicos (NPY, AgRP e orexina A) e ao aumento da expressão de fatores anorexigênicos (MC4-R, ObRb e CRF) no hipotálamo. Assim, os efeitos do estradiol na homeostase energética são observados tanto na ingestão alimentar como no gasto energético. Esses efeitos são mediados por fatores periféricos, como a liberação de leptina pelo tecido adiposo; e por fatores centrais, como a expressão diferenciada de neuropeptídeos hipotalâmicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAND, B.K.; BROBECK, J.R. Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat., **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.77, p.323-324, 1951.

ARASE, K.; YORK, D.A.; SHIMIZU, H.; SHARGILL, N.; BRAY, G.A. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. **The American Journal of Physiology**, v. 255, p. E255-E259, 1988.

BADO, A.; LEVASSEUR, S.; ATTOUB, S.; KERMORGANT, S.; LAIGNEAU, J.P.; BORTOLLUZZI, M.N.; MOIZO, L.; LEHY, T.; GUERRE-MILLO, M.; MARCHAND-BRUSTEL, Y.; LEWIN, M.J. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v. 394, p. 790-793, 1998.

BAO, A.M.; HESTIANTORO, A.; VAN SOMEREN, E.J.; SWAAB, D.F.; ZHOU, J.N. Colocalization of corticotrophin-releasing hormone and oestrogen receptor-alpha in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in mood disorders. **Brain**, v.128, p.1301-1313, 2005.

BARR, V.A.; MALIDE, D.; ZARNOWSKI, M.J.; TAYLOR, S.I.; CUSHMAN, S.W. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. **Endocrinology**, v.138, p.4463-4472, 1997.

BASKIN, D.G.; NORWOOD, B.J.; SCHWARTZ, M.W.; KOERKER, D.J. Estradiol inhibits the increase of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression induced by weight loss in ovariectomized rats. **Endocrinology**, v.136, p. 5547-5554, 1995.

BECK, B. RICHY, S. Hypothalamic hypocretin/orexin and neuropeptide Y: divergent interaction with energy depletion and leptin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.258, p.119-122, 1999.

BECKER, D.J.; ONGEMBA, L.N.; BRICHARD, V.; HENQUIN, J.C.; BRICHARD, S.M. Diet-induced and diabetes-induced changes of ob gene-expression in rat adipose-tissue. **FEBS Lett**, v.371, p.324-328, 1995.

BILLINGTON, C.J.; BRINGGS, J.E.; GRACE, M.; LEVINE, A.S. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. **The American Journal of Physiology**, v.260, p.R321-R327, 1991.

BLAUSTEIN, J.D.; WADE, G.N. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. **Physiology & Behavior**, v.17, p.201-208, 1976.

BONAVERA, J.J.; DUBE, M.G.; KALRA, P.S.; KALRA, S.P. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v.134, p.2367-2370, 1994.

BRANN, D.W.; SEVILLA, L.; ZAMORANO, P.L.; MAHESH, V.B. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. **Steroids**, v.64, p.659-663, 1999.

BRAY, G.A.; FISLER, J.; YORK, D.A. Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.11, p.128-181, 1990.

BROBECK, J.R.; WHEATLAND, M.; STROMINGER, J.L. Variations in regulation of energy exchange associated with estrus, diestrus and pseudopregnancy in rats. **Endocrinology**, v.40, p.65-72, 1947.

BROBERGER, C.; JOHANSEN, J.; JOHASSON, C.; SCHALLING, M.; HOKFELT, T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal anorectic and monosodium glutamate-treated mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.95, p.15043-15048, 1998.

BROWN, M.R.; FISHER, L.A. Corticotropin-releasing factor: effects on the autonomic nervous system and visceral systems. **Federation Proceedings**, v.44, p.243-248, 1985.

BROWN, M.R.; FISHER, L.A.; RIVIER, J.; SPIESS, J.; RIVIER, C.; VALE, W. Corticotropin-releasing factor: effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. **Life Sciences**, v. 30 (2), p.207-210, 1982.

BUTERA, P.C.; XIONG, M.; DAVIS, R.J.; PLATANIA, S.P. Central implants of dilute estradiol enhance the satiety effect of CCK-8. **Behavioral Neuroscience**, v.110, p.823-830, 1996.

BUTLER, A.A.; KESTERSON, R.A.; KHONG, K.; CULLEN, M.J.; PELLEYMOUNTER, M.A.; DEKONING, J.; BAETSCHER, M.; CONE, R.D. A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. **Endocrinology**, v.141, p.3518-3521, 2000.

CAI, X.J.; WIDDOWSON, P.S.; HARROLD, J.; WILSON, S.; BUCKINGHAM, R.E.; ARCH, J.R.S. Hypothalamic orexin expression-modulation by blood glucose and feeding. **Diabetes**, v.14, p.2132-2137, 1999.

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

CHEN, A.S.; MARSH, D.J.; TRUMBAUER, M.E., FRAZIER, E.G.; GUAN, X.M.; YU, H.; ROSENBLUM, C.I.; VONGS, A., FENG, Y.; CAO, L. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. **Nature Genetics**, v.26, p.97-102, 2000.

CHEN, H.; CHARLAT, O.; TARTAGLIA, L.A.; WOOLF, E.A.; WENG, X.; ELLIS, S.J. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. **Cell**, v.84, p.491-495, 1996.

CHEN, P.; LI, C.; HASKELL-LUEVANO, C.; CONE, R.D.; SMITH, M.S. Altered expression of agouti-related protein and its colocalization with neuropeptide Y in the arcuate nucleus of the hypothalamus during lactation. **Endocrinology**, v.140, p.2645-2650, 1999.

CHEUNG, C.C.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. **Endocrinology**, v.138, p.4489-4492, 1997.

CHU, S.; CHOU, Y.; LIU, J.; CHEN, C.; SHYU, J.; CHOU, F. Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. **Life Sciences**, v.64 (24), p.2299-2306, 1999.

CHUA, S.C.; KOUTRAS, I.K.; HAN, L.; LIU, S.M.; KAY, J.; YOYNG, S.J.; CHUNG, W.K.; LEIBEL, R.L. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is require to form two alternatively spliced transcripts. **Genomics**, v.45, p.264-270, 1997.

CONSIDINE, R.V.; SINHA, M.K.; HEIMAN, M.L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T.W.; NYCE, M.R. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **The New England Journal of Medicine**, v.334, p.292-295, 1996.

COUCEYRO, P.R.; KOYLU, E.O.; KUHAR, M.J. Further studies on the anatomical distribution of CART by *in situ* hybridization. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v.12, p.229-241, 1997.

COWLEY, M.A.; PRONCHUK, N.; FAN, W.; DINULESCU, D.M.; COLMERS, W.F.; CONE, R.D. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. **Neuron**, v.24, p.155-163, 1999.

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

CRANDALL, D.L.; BUSLER, D.E.; NOVAK, T.J.; WEBER, R.V.; KRAL, J.G. Identification of estrogen receptor beta RNA in human breast and abdominal subcutaneous adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 248, p.523-526, 1998.

CROWLEY, W.R.; TESSEL, R.E.; O`DORIOHNE, T.L.; ADLER, B.A.; KALRA, S.P. Effects of ovarian hormones on the concentrations of immunoreactive neuropeptide Y in discrete brain regions of the female rat: correlation with serum luteinizing hormone (LH) and median eminence LH-releasing hormone. **Endocrinology**, v.117, p.1151, 1985.

DAGNAULT, A.; OUERGHI, D.; RICHARD, D. Treatment with alpha-helical-CRF (9-41) prevents the anorectic effect of 17-beta estradiol. **Brain Research Bulletin**, v.32, p.689, 1993.

DAGNAULT, A.; RICHARD, D. Lesions of hypothalamic paraventricular nuclei do not prevent the effect of estradiol on energy and fat balance. **The American Journal of Physiology**, v. 267(1 Pt 1), p.E32-E38, 1994.

DATE, Y.; UETA, Y.; YAMASHITA, H.; YAMAGUCHI, H.; MATSUKURA, S.; KANGAWA, K. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.96, p.748-753, 1999.

DELECEA, L.; KILDUFF, T.S.; PEYRON, C.; GAO, X.B.; FOYE, P.E.; DANIELSON, P.E.; FUKUHARA, C. The hypocretins-hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.95, p.322-327, 1998.

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

DYE, L.; BLUNDELL, J.E. Menstrual cycle and appetite control: implications for weight regulation. **Human Reproduction**, v.12, p.1142-1151, 1997.

ECKEL, L.A.; GEARY, N. Estradiol treatment increases feeding-induced c-fos expression in the brains of ovariectomized rats. **The American Journal of Physiology**, v.281, p.R738-R746, 2001.

ECKEL, L.A.; HOUPPT, T.A.; GEARY, N. Estradiol replacement increases CCK-induced c-fos expression in the brains of ovariectomized rats. **The American Journal of Physiology**, v.283, p.R1378-R1385, 2002.

ECKEL, L.A.; HOUPPT, T.A.; GEARY, N. Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. **Physiology & Behavior**, v.70, p.397-405, 2000.

EGAWA, M.; YOSHIMATSU, H.; BRAY, G.A. Preoptic area injection of corticotropin-releasing hormone stimulates sympathetic activity. **The American Journal of Physiology**, v. 259(4 Pt 2), p.R799-R806, 1990.

ELBERS, J.M.H.; ROO, G. W. V.; POPP-SNIJDERS, C.; NICOLAAS-MERKUS, A.; WESTERVEEN, E.; JOENJE, B.W.; NETELENBOS, J.C. Effects of administration of 17 β -oestradiol on serum leptin levels in healthy postmenopausal women. **Clinical Endocrinology**, v.51, p.449-454, 1999.

ELIAS, C.F.; SAPER, C.B.; MARATOS-FLIER, E.; TRITOS, N.A.; LEE, C.; KELLY, J.; TATRO, J.B.; HOFFMAN, G.E., OLLMANN, M.M., BARSH, G.S.; SAKURAI, T., YANAGISAWA, M. ELMQUIST, J. K. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. **Comparative Journal of Neurology**, v. 402, p.442-459, 1998.

ELMQUIST, J.; BJORBAEK,C.; AHIMA, R.S.; FLIER, J.S.; SAPER, C.B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **Comparative Journal of Neurology**, v. 395, p.535-547, 1998.

ELMQUIST, J.; ELIAS, C.F.; SAPER, C.B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. **Neuron**, v.22, p.221-232, 1999.

EMESON, R.B.; EIPER, B.A. Characterization of pro-ACTH/endorphin-derived peptides in rat hypothalamus. **The Journal of Neuroscience**, v.6, p.837-849, 1986.

FAN, W.; BOSTON, B.; KESTERSON, R.; HRUBY, V.; CONE, R. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. **Nature**, v.385, p.165-168, 1997.

FEI, H.; OKANO, H.J.; LI, C.; LEE, G.H.; ZHAO, C.; DARNELL, R.; FRIEDMAN, J.M. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.94, p.7001-7005, 1997.

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

GAO Q.; MEZEI, G.; NIE, Y.; RAO, Y.; CHOI, C. S.; BECHMANN, I.; LERANTH; C.; TORAN-ALLERAND, D.; PRIEST, C.A; ROBERTS, J.L.; GAO, X.B.; MOBBS, C.; SHULMAN, G.I.; DIANO, S.; HORVATH, T.L. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. **Nature Medicine**, v.13, p.89-94, 2007.

GAUTVIK, K.M.; LECEA, L.; GAUTVIK, V.T.; DANIELSON, P.E.; TRANQUE, P.; DOPAZO, A. Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as indentified by directional tag PCR subtraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.93, p.8733-8738, 1996.

GEARY, N.; ASARIAN, L. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. **Physiology & Behavior**, v.67, p.141-147, 1999.

GOMEZ-AMBROSI, J.; FRUHBECK, G.; MARTINEZ, J.A. Leptin, but not a beta 3-adrenergic agonist, upregulates muscle uncoupling protein-3 messenger RNA expression: short-term thermogenic interactions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p.992–997, 1999.

GRAY, J.M.; DUDLEY, S.D, WADE, G.N. *In vivo* cell nuclear binding of 17β -[3H]-estradiol in rat adipose tissues. **The American Journal of Physiology**, v.240, p.E43-E46, 1981.

GRAY, J.M.; WADE, G.N. Food intake, body weight and adiposity in female rats: actions and interactions of progestins and antiestrogens. **The American Journal of Physiology**, v.240, E474-E481, 1981.

GREEN, W.P.; GREENE, G.; KRUST, A.; BORNERT, J.M.; JELTSCH, J.M.; STAUB, A. Cloning of the human estrogen gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.82, p.7889-7893, 1985.

GUAN, X.M.; YU, H.; VAN DER PLOEG, L.H. Evidence of altered hypothalamic pro-opiomelanocortin/neuropeptide Y mRNA expression in tubby mice. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v.59, p. 273–279, 1998.

HADJI, P.; GORKE, K.; HARS, O.; BAUER, T.; EMONS, G.; SCHULZ, K. The influence of hormone replacement therapy (HRT) on serum leptin concentration in postmenopausal women. **Maturitas**, v.37, p.105-111, 2000.

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

HAKANSON, M.L.; BROWN, H.; GHILARDI, N.; SKODA, R.C.; MEISTER, B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. **The Journal of Neuroscience**, v.18, p.559-572, 1998.

HARDIE, L.J.; RAYNER, D.V.; HOLMES, S.; TRAYHURN, P. Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (*fa/fa*) rats as measured by ELISA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.223, p.660-665, 1996.

HAYNES, A.; JACKSON, B.; OVEREND, P.; BUCKINGHAM, R.; WILSON, S.; TADAYYON, M.; ARCH, J.S. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. **Peptides**, v.20, p.1099-1105, 1999.

HAYNES, W.G.; MORGAN, D.A.; WALSH, S.A.; MARK, A.L.; SIVITZ, W.I. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. **Journal of Clinical Investigation**, v.100, p.270-278, 1997.

HETHERINGTON, A.W.; RANSON, S.W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **The Anatomical Record**, v.78, p.149-172, 1940.

HORVATH, T.; DIANO, S.; VAN DEN POL, A. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. **The Journal of Neuroscience**, v.19, p.1072-1087, 1999.

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**, v.139, p.1524-1532, 1998.

HUSZAR, D. LYNCH, C.A.; FAIRCHILD-HUNTRESS, V.; DUMMORE, J.H.; FANG, Q.; BERKEMEIER, L.R.; GU, W.; KESTERON, R.A.; BOSTON, B.A.; CONE, R.D. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. **Cell**, v.88, p.131-141, 1997.

IGUCHI, M.; AIBA, S.; YOSHINO, Y.; TAGAMI, H. Human follicular papilla cells carry out nonadipose tissue production of leptin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.117, p.1349-1356, 2001.

JASZBERENYI, M.; BUJDOSO, E.; KISS, E.; PATAKI, I.; TELEGDY, G. The role of NPY in the mediation of orexin-induced hypothermia. **Regulatory Peptides**, v. 104, p.55-59, 2002.

KALRA, S.P.; DUBE, M.G.; SAHU, A.; PHELPS, C.P.; KALRA, P.S. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** v.88, p.10931-10935, 1991.

KASK, A.; RAGO, L.; WIKBERG, J.E.; SCHIOTH, H.B. Differential effects of melanocortin peptides on ingestive behavior in rats: evidence against the involvement of MC (3) receptor in the regulation of food intake. **Neuroscience Letters**, v.283, p.1-4, 2000.

KEMNITZ, J.W.; GIBBER, J.R.; LINDSAY, K.A.; EISELE, S.G. Effects of ovarian hormones on eating behaviors, body weight, and glucoregulation in rhesus monkeys. **Hormones and Behavior**, v.23, p.235-250, 1989.

KIM, M.S.; SMALL, C.J.; STANLEY, S.A.; MORGAN, D.G.; SEAL, L.J.; KONG, W.M.; EDWARDS, C.M.; ABUSNANA, S.; SUNTER, D.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. **Journal of Clinical Investigation**, v.105, p.1005-1011, 2000.

KIMURA, M.; IRAHARA, M.; YASUI, T.; SAITO, S.; TEZUKA, M.; YAMANO, S.; KAMADA, M.; AONO, T. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.290, p.1349-1353, 2002.

KRISTENSEN, P.; JUDGE, M.; THIM, L; RIEBEL, U.; CHRISTJANSEN, K.N.; WULLF, B.B.; CLAUSEN, J.T.; JENSEN, P.B.; MADSEN, O.D.; VRANG, N.; LARSEN, P.J.; HASTRUP, S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, v. 393, p. 72-76, 1998.

KUHAR, M.J.; DALL VECHIA, S.E. CART peptides: novel addiction- and feeding-related neuropeptides. **Trends in Neurosciences**, v.22, p.316-322, 1999.

KUIPER, G.G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.93, p.5925-5930, 1996.

LANDAU, T.; ZUCKER, I. Estrogenic regulation of body weight in the female rat. **Hormones and Behavior**, v.7, p.29-39, 1976.

LARSEN, P.J.; VRANG, N.; PETERSEN, P.C.; KRISTENSEN, P. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART (42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. **Obesity Research**, v.8, p.590-596, 2000.

LEE, G.H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J.M.; CARROLL, K.M.; DARVISHZADEH, J.G.; LEE, J.J. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v.37, p.632-635, 1996.

LEFEUVRE, R.A.; ROTHWELL, N.J.; STOCK, M.J. Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotrophin-releasing hormone in the rat. **Neuropharmacology**, v.26, p.1217-1221, 1987.

LESHNER, A.I.; COLLIER, G. The effects of gonadectomy on the sex differences in dietary self-selection patterns and carcass composition of rats. **Physiology & Behavior**, v.11, p.671-676, 1973.

LOPEZ, M.; SEOANE, L.; GARCIA, M.C.; LAGO, F.; CASANUEVA, F.F.; SENARIS, R.; DIEGUEZ, C. Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.269, p.41-45, 2000.

LU, D.; WILLARD, D.; PATEL, I.R.; KADWELL, S.; OVERTON, L.; KOST, T.; LUTHER, M.; CHEN, W.; WOYCHIK, R.P.; WILKISON, W.O.; CONE, R.D. Agouti protein is an antagonist of the melanocortin-stimulating-hormone receptor. **Nature**, v. 371, p. 799-802, 1994.

LUDWIG, D.S.; TRITOS, N.A.; MASTAITIS, J.W.; KULKARNI, R.; KOKKOTOU, E.; ELMQUIST, J. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.107, 379-386, 2001.

MACHINAL, F.; DIEUDONNE, M.; LENEVEU, M.; PECQUERY, R.; GIUDICELLI, Y. *In vivo* and *in vitro* ob gene expression and leptin secretion in rat adipocytes: evidence for a regional specific regulation by sex steroid hormones. **Endocrinology**, v.140, p.1567-1574, 1999.

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

MASAKI, T.; YOSHIMICHI, G.; CHIBA, S.; YASUDA, T.; OGUCHI, H.; KAKUMA, T.; SAKATA, T.; YOSHIMATSU, H. Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. **Endocrinology**, v.144 (8), p.3547-3554, 2003.

MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; SAGAWA, N.; HOSODA K.; MATSUMOTO, T.; MISE, H.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y.; TANAKA, I.; MORI, T.; NAKAO, K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. **Nature Medicine**, v. 3, p.1029-1033, 1997.

MAZZA, M.; MARCA, G.; PACIELLO, N.; MENNUNI, G.; BRIA, P.; MAZZA, S. Orexin, sleep and appetite regulation: a review. **La Clinica Terapeutica**, v.156, p.93-96, 2005.

MEISTER, B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. **Physiology & Behavior**, v.92, p.263-271, 2007.

MOOK, D.G.; KENNEY, N.J.; ROBERTS, S.; NUSSBAUM, A.I.; RODIER W.I. Ovarian-adrenal interactions in regulation of body weight by female rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.81, p.198-211, 1972.

MORIMOTO, I.; YAMAMOTO, S.; KAI, K.; FUJIHIRA, T.; MORITA, E.; ETO, S. Centrally administered murine-leptin stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenal axis through arginine-vasopressin. **Neuroendocrinology**, v.71, p.366-374, 2000.

MORLEY, J.E. Neuropeptide regulation of appetite and weight. **Endocrine Reviews**, v.8, p.256-287, 1987.

MORLEY, J.E.; BLUNDELL, J.E. The neurobiological basis of eating disorders: some formulations. **Biological Psychiatry**, v.23, p.53-78, 1988.

MORLEY, J.E.; LEVINE, A.S. Corticotropin-releasing factor, grooming and ingestive behavior. **Life Science**, v.31, p.1459-1464, 1982.

MOUNTJOY, K.; MORTRUD, M.; LOW, M.; SIMERLY, R.; CONE, R. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. **Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)**, v.8, p.1298-1308, 1994.

MOUNTJOY, K.G.; ROBBINS, L.S.; MORTRUD, M.T.; CONE, R.D. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. **Science**, v.257, p.1248-1251, 1992.

OLLMANN, M.M.; WILSON, B.D.; YANG, Y.K.; KERNS, J.A.; CHEN, Y.; GANTZ, I.; BARSH, G.S. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. **Science**, v.278, p.135-138, 1997.

OSTERLUND, M.; KUIPER, G.G.; GUSTAFSSON, J.A.; HURD, Y.L. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. **Brain research. Molecular Brain Research**, v.54, p.175-180, 1998.

PAPE, J.R.; TRAMU, G. Suckling-induced changes in neuropeptide Y and proopiomelanocortin gene expression in the arcuate nucleus of the rat: evaluation of a putative intervention of prolactin. **Neuroendocrinology**, v.63, p.540-549, 1996.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. Academic Press, San Diego, 1997.

PEDERSEN, S.B.; BØRGLUM, J.D.; ERIKSEN, E.F.; RICHELSEN, B. Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1, p.80-86, 1991.

PEDERSEN, S.B.; BRUUN, J.M.; HUBE, F.; KRISTENSEN, K.; HAUNER, H.; RICHELSEN, B. Demonstration of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human adipose tissue: influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.182, p.27-37, 2001.

PEDERSEN, S.B.; BRUUN, J.M.; KRISTENSEN, K.; RICHELSEN, B. Regulation of UCP1, UCP2 and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue and skeletal muscle in rats by estrogen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.288, p.191-197, 2001.

PEDERSEN, S.B.; BORGLUM, J.D.; ERIKSEN, E.F.; RICHELSEN, B. Nuclear estradiol binding in rat adipocytes. Regional variations and regulatory influences of hormones. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1093, p.80-86, 1991.

PELLETIER, G.; LI, S.; LUU-THE, V.; LABRIE, F. Oestrogenic regulation of proopiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotrophin-releasing hormone mRNAs in mouse hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v.19, p.426-431, 2007.

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

PETERS, J.H.; MCKAY, B.M.; SIMASKO, S.M.; RITTER, R.C. Leptin-induced satiation mediated by abdominal vagal afferents. **The American Journal of Physiology**, v.288, p.R879-R884, 2005.

PEYRON, C.; TIGHE, D.K.; VANDENPOL, A.N.; DELECEA, L.; HELLER, H.C.; SUTELIFFE, J.G.; KILDUFF, T.S. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. **The Journal of Neuroscience**, v.18, p.9996-10015, 1998.

PIERROZ, D.D.; ZIOTOPOULOU, M.; UUNGSUNAN, L.; MOSCHOS, S.; FLIER, J.S.; MANTZOROS, C.S. Effects of acute and chronic administration of the melanocortin agonist MTII in mice with diet-induced obesity. **Diabetes**, v.51, p.1337-1345, 2002.

PORKKA-HEISKANEN, T.; KALINCHUK, A.; ALANKO, L.; HUHTANIEMI, I.; STENBERG, D. Orexin A and B levels in the hypothalamus of female rats: the effects of the estrous cycle and age. **European Journal of Endocrinology**, v.150, p.737-742, 2004.

QU, D.; LUDWIG, D.S.; GAMMELTOFT, S.; PIPER, M.; PELLEYMOUNTER, M.A.; CULLEN, M.J. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior. **Nature**, v.380, p.243-247, 1996.

RESELAND, J.E.; SYVERSEN, U.; BAKKE, I.; QVIGSTAD, G.; EIDE, L.G.; HJERTNER, O.; GORDELADZE, J.O.; DREVON, C.A. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.16, p.1426-1433, 2001.

ROBACZYK, M.; SMIAROWSKA, M.; KRZYŻANOWSKA-SWINIARSKA, B. The ob gene product (leptin)-a new hormone of adipose tissue. **Przegląd Lekarski**, v.54, p.348-352, 1997.

ROCHA, M.; BING, C.; WILLIAMS, G.; PUERTA, M. Physiologic estradiol levels enhance hypothalamic expression of long form of the leptin receptor in intact rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.15, p.328-334, 2004.

ROESH, D.M. Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. **Physiology & Behavior**, v.87, p.39-44, 2006.

ROHNER-JEANRENAUD, F.; WALKER, C.D.; GRECO-PEROTTO, R.; JEANRENAUD, B. Central corticotropin-releasing factor administration prevents the excessive body weight gain of genetically obese (fa/fa) rats. **Endocrinology**, v.124, p.733-739, 1989.

RONDINI, T.A.; BADDINI, S.P.; SOUSA, L.F.; BITTENCOURT, J.C.; ELIAS, C.F. Hypothalamic cocaine-and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. **Neuroscience**, v.125, p.735-748, 2004.

ROSSI, M.; KIM, M.S.; MORGAN, D.G.; SMALL, C.J.; EDWARDS, C.M.; SUNTER, D.; ABUSNANA S.; GOLDSTONE, A.P.; RUSSELL, S.H.; STANLEY S.A.; SMITH, D.M.; YAGALOFF, K.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R. A C-terminal fragment of agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of α -melanocyte stimulating hormone *in vivo*. **Endocrinology**, v.139, p.4428–4431, 1998.

RUSSELL, S.H.; SMALL, C.J.; KENNEDY, A.R.; STANLEY, S.A.; SETH, A.; MURPHY, K.G.; TAHERI, S.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R. Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. **Endocrinology**, v.142, p.5294-302, 2001.

SAHU A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.24, p.225-253, 2003.

SAITO, Y.; NOTHACKER, H.P.; WANG, Z.; LIN, S.H.; LESLIE, F.; CIVELLI, O. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. **Nature**, v.400, p.265-269, 1999.

SAKURAI, T.; AMEMIYA, T.; ISHII, M.; MATSUKAI, I.; CHEMELLI, R.M.; TANAKA, H. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. **Cell**, v.92, p.573-585, 1998.

SALADIN, R.; DE VOS, P.; GUERRE-MILLO, M.; LETURQUE, A.; GIRARD, J.; STAELS, B.; AUWERX, J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. **Nature**, v. 377, p.527-529, 1995

SANACORA, G.; KERSHAW, M.; FINKELSTEIN, J.A.; WHITE, J.D. Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. **Endocrinology**, v.127, p.730-737, 1990.

SANTOLLO, J.; ECKEL, L.A. Estradiol decreases the orexigenic effect of NPY, but not AgRP, in ovariectomized rats. **Appetite**, v.49, p.327, 2007.

SAPER, C.B.; CHOU, T.C.; ELMQUIST, J.K. The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. **Neuron**, v.36, p.199-211, 2002.

SAR, M.; SAHU, A.; CROWLEY, W.R.; KALRA, S.P. Localization of neuropeptide Y immunoreactivity in estradiol-concentrating cells in the hypothalamus. **Endocrinology**, v.127, p.2752-2756, 1990.

SAWCHENKO, P.E. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 402, p.435-441, 1998.

SCARPACE, P.J.; MATHENY, M. Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. **The American Journal Physiology**, v. 275, p.E259-64, 1998.

SCHWARTZ, M.W.; SEELEY, R.J.; WOODS, S.C.; WEIGLE, D.S.; CAMPFIELD, L.A.; BURN, P.; BASKIN, D.G. Leptin increase hypothalamic pro-opiomelanocortin (POMC) mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. **Diabetes**, v.46, p.2119-2123, 1997.

SCHWARTZ, M.W.; BASKIN, D.G.; BUKOWSKI, T.R.; KUIJPER, J.L.; FOSTER, D.; LASSER, G.; PRUNKARD, D.E.; PORTE, D. JR.; WOODS, S.C.; SEELEY, R.J.; WEIGLE, D.S. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes**, v.45, p.531-535, 1996.

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

SHIMIZU, H.; SHIMOMURA, Y.; NAKANISHI, Y.; FUTAWATARI, T.; OHTANI, K.; SATO, N.; MORI, M. Estrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. **The Journal of Endocrinology**, v.154, p.285-292, 1997.

SHUGHURE, P.J.; LANE, M.V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 388, p.507-525, 1997.

SMALL, C.J.; KIM, M.S.; STANLEY, S.A.; MITCHELL, J.R.; MURPHY, K.; MORGAN, D.G.; GHATEI, M.A.; BLOOM, S.R. Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. **Diabetes**, v.50, p.248-254, 2001.

SMALL, C.J.; LIU, Y.L., STANLEY, S.A; CONNOLEY, I.P.; KENNEDY, A.; STOCK, M.J.; BLOOM, S.R. Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp)

reduces energy expenditure. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, v.27, p.530-533, 2003.

SMITH, A.I.; FUNDER, J.W. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. **Endocrine Reviews**, v. 9, p.159-179, 1988.

STANLEY, B.G.; KYRKOULI, S.E.; LAMPERT, S.; LEIBOWITZ, S.F. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. **Peptides**, v.7, p.1189-1192, 1986.

STELLAR, E. The physiology of motivation. **Psychological Review**, v.101, p.301-311, 1954.

STEPHENS, T.W.; BASINSKI, M.; BRISTOW, P.K.; BUE-VALLESKEY, J.M.; BURGETT, S.G.; CRAFT, L.; HALE, J.; HOFFMANN, J.; HSIUNG, H.M.; KRIAUCIUNAS, A. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. **Nature**, v.377 p.530-532, 1995.

SWART, I.; JAHNG, J.W.; OVERTON, J.M.; HOUP, T.A. Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. **The American Journal of Physiology**, v.283, p.R1020-1026, 2002.

TAMURA, T.; IRAHARA, M.; TEZUKA, M.; KIYOKAWA, M.; AONO, T. Orexins, orexigenic hypothalamic neuropeptides, suppress the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.264, p.759-762, 1999.

TARTAGLIA, L.A. The leptin receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.6093-6096, 1997.

TARTTELIN, M.F.; GORSKI, R.A. The effects of the ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. **Acta Endocrinologica**, v.72, p.551-568, 1973.

THORNTON, J.; CHENG, C.; CLIFTON, D.; STEINER, R. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in *ob/ob* mice. **Endocrinology**, v.138, p.5063-5066, 1997.

TRAYHURN, P.; THOMAS, M.E.A.; DUNCAN, J.S.; RAYNER, D.V. Effects of fasting and refeeding on *ob* gene-expression in white adipose-tissue of lean and obese (*ob/ob*) mice. **FEBS Letters**, v.368, p.488-490, 1995.

TRITOS, N.A.; VICENT, D.; GILLETTE, J.; LUDWIG, D.S.; FLIER, E.S.; MARATOS-FLIER, E. Functional interactions between melanin-concentrating hormone, neuropeptide Y, and anorectic neuropeptides in the rat hypothalamus. **Diabetes**, v.47, p.1687-1692, 1998.

WADE, G.N. Gonadal hormones and behavioral regulation of body weight. **Physiology & Behavior**, v.8, p.523-534, 1972.

WADE, G.N. Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. **Journal of Comparative Physiology**, v.88, p.183-193, 1975.

WADE, G.N.; GRAY, J.M. Cytoplasmic 17β -[^3H] estradiol binding in rat adipose tissues. **Endocrinology**, v.103, p.1693-1701, 1978.

WADE, G.N.; ZUCKER, I. Development of hormonal control over food intake and body weight in female rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.70, p.213-220, 1970.

WADE, G.N.; ZUCKER, I. Modulation of food intake and locomotor activity in female rats by diencephalic hormone implants. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.72, p.328-336, 1970.

WADE, G.N.; ZUCKER, I. Taste preferences of female rats: modification by neonatal hormones, food deprivation and prior experience. **Physiology & Behavior**, v.4, p.935-943, 1969.

WANG, C.F.; BILLINGTON, C.J.; LEVINE, A.S. Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. **Neuroreport**, v.11, p.3251-3255, 2000.

WANG, J.; LIU, R.; HAWKINS, M.; BARZILAI, N.; ROSSETTI, L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. **Nature**, v.393, p.684-688, 1998.

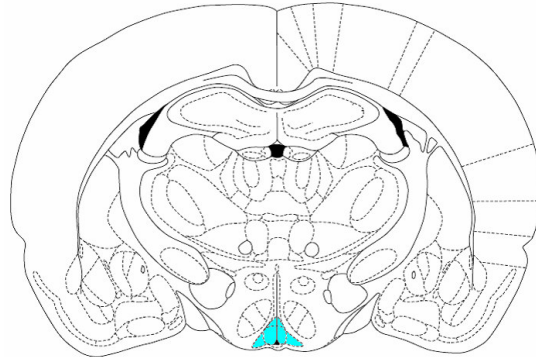
WHITE, D.W.; TARTAGLIA, L.A. Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.7, p.303-309, 1996.

WIERUP, N.; SUNDLER, F. CART is a novel islet regulatory peptide. **Peptides**, v. 27, p.2031-2036, 2006.

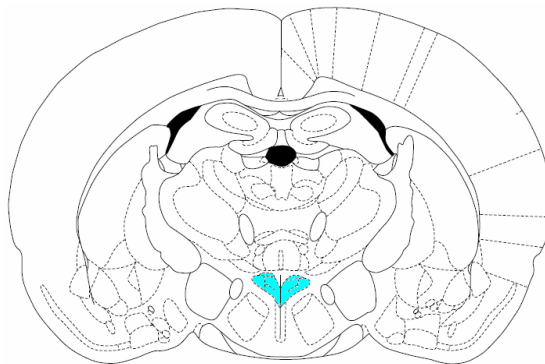
YASUDA, T.; MASAKI, T.; KAKUMA, T.; YOSHIMATSU, H. Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v.229 p.235-239, 2004.

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

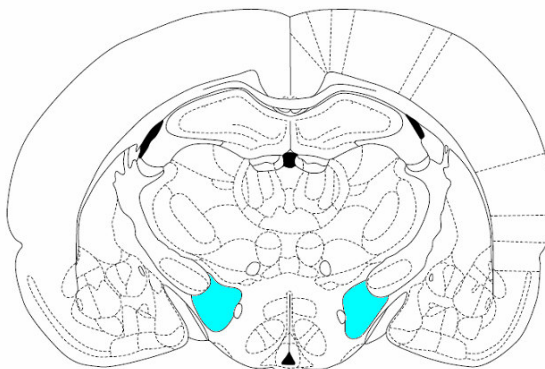
Anexo A - Figura representativa do corte coronal mostrando, em azul, o núcleo arqueado (ARC). Coordenada -2,12 mm em relação ao bregma. Modificado de Paxinos e Watson (1997).



Anexo B - Figura representativa do corte coronal mostrando, em azul, o núcleo paraventricular (PVN). Coordenada -1,80 mm em relação ao bregma. Modificado de Paxinos e Watson (1997).



Anexo C - Figura representativa do corte coronal mostrando, em azul, a área hipotalâmica lateral (LHA). Coordenada -2,56 mm em relação ao bregma. Modificado de Paxinos e Watson (1997).



Anexo D - Valores individuais, média e EPM da ingestão alimentar (g/100 g peso corporal) ao longo dos 8 dias de tratamento de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal.

| | DIA 0 | DIA 0 | DIA 1 | DIA 1 | DIA 2 | DIA 2 | DIA 3 | DIA 3 | DIA 4 | DIA 4 | DIA 5 | DIA 5 | DIA 6 | DIA 6 | DIA 7 | DIA 7 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E |
| 1 | 6,7 | 5,0 | 8,6 | 10,6 | 13,9 | 13,7 | 11,8 | 11,9 | 12,4 | 11,9 | 13,8 | 13,0 | 12,0 | 11,7 | 12,2 | 10,9 |
| 2 | 9,8 | 6,1 | 9,1 | 7,9 | 13,2 | 12,4 | 11,5 | 10,9 | 10,5 | 13,9 | 11,9 | 9,0 | 8,0 | 9,3 | 10,5 | 12,4 |
| 3 | 9,0 | 6,9 | 9,5 | 7,8 | 11,1 | 11,5 | 9,4 | 9,7 | 10,7 | 9,9 | 10,6 | 10,1 | 8,9 | 9,6 | 10,8 | 9,7 |
| 4 | 10,4 | 6,8 | 10,0 | 7,8 | 14,4 | 12,0 | 13,4 | 10,0 | 12,1 | 10,6 | 13,0 | 11,5 | 14,2 | 10,0 | 11,5 | 10,1 |
| 5 | 9,4 | 6,2 | 10,1 | 6,2 | 11,7 | 9,7 | 10,9 | 7,9 | 11,2 | 9,5 | 10,6 | 9,3 | 12,0 | 8,9 | 9,2 | 10,8 |
| 6 | 7,7 | 7,0 | 10,9 | 8,0 | 13,6 | 10,8 | 12,0 | 8,9 | 12,9 | 10,8 | 12,4 | 9,9 | 12,2 | 10,9 | 11,7 | 9,5 |
| 7 | 9,5 | 7,3 | 8,4 | 7,5 | 11,4 | 10,8 | 9,9 | 8,8 | 11,3 | 9,8 | 11,7 | 10,0 | 9,9 | 8,5 | 10,4 | 9,1 |
| 8 | 6,7 | 8,0 | 9,2 | 6,8 | 11,1 | 11,1 | 8,0 | 9,6 | 8,8 | 8,9 | 10,1 | 8,8 | 7,3 | 12,6 | 10,0 | 9,3 |
| 9 | 7,3 | 8,9 | 7,7 | 7,8 | 12,5 | 11,3 | 8,5 | 9,9 | 10,0 | 9,7 | 11,2 | 10,8 | 8,1 | 9,7 | 8,4 | 9,1 |
| 10 | 6,3 | 3,5 | 5,3 | 6,5 | 12,6 | 8,6 | 9,9 | 7,6 | 10,8 | 8,3 | 11,3 | 8,3 | 9,9 | 8,6 | 10,4 | 8,4 |
| 11 | 6,3 | 7,9 | 9,0 | 7,2 | 12,1 | 11,0 | 11,2 | 9,2 | 11,4 | 9,4 | 13,2 | 10,2 | 10,5 | 7,5 | 11,1 | 9,4 |
| 12 | 8,5 | 17,3 | 9,0 | 6,9 | 11,5 | 9,5 | 11,0 | 8,5 | 5,8 | 10,5 | 12,3 | 10,0 | 10,1 | 10,0 | 11,3 | 10,1 |
| 13 | 8,8 | 9,0 | 8,9 | 6,4 | 13,5 | 13,6 | 11,4 | 9,7 | 11,9 | 12,3 | 13,5 | 9,7 | 11,4 | 11,5 | 14,3 | 10,7 |
| 14 | | 5,4 | | 5,6 | | 11,5 | | 8,3 | | 8,0 | | 10,4 | | 10,2 | | 9,7 |
| 15 | | 7,7 | | 9,5 | | 10,2 | | 8,1 | | 9,2 | | 10,0 | | 9,3 | | 11,6 |
| Média | 8,2 | 7,5 | 8,9 | 7,5 | 12,5 | 11,2 | 10,7 | 9,3 | 10,8 | 10,2 | 12,0 | 10,1 | 10,3 | 9,9 | 10,9 | 10,1 |
| EPM | 0,4 | 0,8 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 0,4 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 0,3 | 0,4 | 0,3 |

Anexo E - Valores individuais, média e EPM da ingestão alimentar diária (g/100 g peso corporal) de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal, por 8 dias consecutivos após cirurgia.

| | OVX | OVX+E |
|--------------|------------|--------------|
| 1 | 12,1 | 12,0 |
| 2 | 10,7 | 10,9 |
| 3 | 10,2 | 9,8 |
| 4 | 12,6 | 10,3 |
| 5 | 10,8 | 8,9 |
| 6 | 12,2 | 9,8 |
| 7 | 10,4 | 9,2 |
| 8 | 9,2 | 9,6 |
| 9 | 9,5 | 9,8 |
| 10 | 10,0 | 8,0 |
| 11 | 11,2 | 9,1 |
| 12 | 10,1 | 9,4 |
| 13 | 12,1 | 10,6 |
| 14 | | 9,1 |
| 15 | | 9,7 |
| Média | 10,8 | 9,7 |
| EPM | 0,3 | 0,2 |

Anexo F - Valores individuais, média e EPM do peso corporal (g) ao longo dos 8 dias de tratamento de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal.

| | DIA 0 | DIA 0 | DIA 1 | DIA 1 | DIA 2 | DIA 2 | DIA 3 | DIA 3 | DIA 4 | DIA 4 | DIA 5 | DIA 5 | DIA 6 | DIA 6 | DIA 7 | DIA 7 | DIA 8 | DIA 8 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E | OVX | OVX+E |
| 1 | 237.0 | 241.0 | 220.0 | 226.0 | 223.0 | 241.0 | 228.0 | 243.0 | 242.0 | 253.0 | 246.0 | 261.0 | 251.0 | 264.0 | 262.0 | 275.0 | 263.0 | 277.0 |
| 2 | 235.0 | 246.0 | 230.0 | 238.0 | 243.0 | 241.0 | 244.0 | 239.0 | 256.0 | 244.0 | 260.0 | 256.0 | 263.0 | 246.0 | 268.0 | 242.0 | 264.0 | 252.0 |
| 3 | 232.0 | 233.0 | 232.0 | 228.0 | 234.0 | 235.0 | 234.0 | 237.0 | 242.0 | 243.0 | 245.0 | 248.0 | 246.0 | 250.0 | 250.0 | 259.0 | 254.0 | 261.0 |
| 4 | 221.0 | 206.0 | 210.0 | 204.0 | 216.0 | 208.0 | 217.0 | 210.0 | 231.0 | 217.0 | 238.0 | 218.0 | 240.0 | 221.0 | 252.0 | 227.0 | 252.0 | 227.0 |
| 5 | 244.0 | 226.0 | 246.0 | 224.0 | 256.0 | 227.0 | 256.0 | 228.0 | 268.0 | 232.0 | 274.0 | 237.0 | 276.0 | 237.0 | 295.0 | 240.0 | 291.0 | 243.0 |
| 6 | 234.0 | 214.0 | 220.0 | 212.0 | 236.0 | 223.0 | 241.0 | 225.0 | 248.0 | 231.0 | 258.0 | 242.0 | 262.0 | 239.0 | 274.0 | 252.0 | 279.0 | 253.0 |
| 7 | 222.0 | 247.0 | 226.0 | 240.0 | 228.0 | 249.0 | 232.0 | 250.0 | 239.0 | 255.0 | 247.0 | 261.0 | 253.0 | 259.0 | 260.0 | 265.0 | 261.0 | 266.0 |
| 8 | 239.0 | 223.0 | 217.0 | 219.0 | 235.0 | 226.0 | 238.0 | 228.0 | 240.0 | 235.0 | 238.0 | 239.0 | 248.0 | 239.0 | 251.0 | 246.0 | 254.0 | 247.0 |
| 9 | 232.0 | 235.0 | 232.0 | 228.0 | 240.0 | 239.0 | 248.0 | 243.0 | 250.0 | 247.0 | 251.0 | 250.0 | 258.0 | 257.0 | 262.0 | 263.0 | 264.0 | 263.0 |
| 10 | 238.0 | 229.0 | 225.0 | 215.0 | 238.0 | 222.0 | 243.0 | 223.0 | 250.0 | 228.0 | 257.0 | 230.0 | 262.0 | 232.0 | 268.0 | 237.0 | 269.0 | 237.0 |
| 11 | 253.0 | 227.0 | 244.0 | 222.0 | 256.0 | 227.0 | 259.0 | 228.0 | 273.0 | 234.0 | 281.0 | 235.0 | 294.0 | 239.0 | 298.0 | 234.0 | 303.0 | 239.0 |
| 12 | 236.0 | 243.0 | 232.0 | 245.0 | 243.0 | 252.0 | 246.0 | 248.0 | 257.0 | 256.0 | 253.0 | 259.0 | 267.0 | 259.0 | 275.0 | 268.0 | 281.0 | 274.0 |
| 13 | 238.0 | 198.0 | 235.0 | 201.0 | 237.0 | 199.0 | 246.0 | 206.0 | 253.0 | 212.0 | 259.0 | 216.0 | 264.0 | 217.0 | 272.0 | 224.0 | 282.0 | 229.0 |
| 14 | | 241.0 | | 230.0 | | 234.0 | | 242.0 | | 249.0 | | 251.0 | | 255.0 | | 268.0 | | 271.0 |
| 15 | | 232.0 | | 230.0 | | 235.0 | | 235.0 | | 239.0 | | 240.0 | | 237.0 | | 242.0 | | 247.0 |
| Médias | 235,5 | 229,4 | 228,4 | 224,1 | 237,3 | 230,5 | 240,9 | 232,3 | 249,9 | 238,3 | 254,4 | 242,9 | 260,3 | 243,4 | 267,5 | 249,5 | 270,5 | 252,4 |
| EPM | 2,3 | 3,7 | 2,8 | 3,2 | 3,1 | 3,6 | 3,1 | 3,3 | 3,2 | 3,4 | 3,5 | 3,6 | 3,8 | 3,6 | 4,2 | 4,1 | 4,3 | 4,1 |

Anexo G - Valores individuais, média e EPM do ganho total de peso corporal (g) de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal.

| | OVX | OVX+E |
|--------------|------------|--------------|
| 1 | 43,0 | 51,0 |
| 2 | 34,0 | 14,0 |
| 3 | 22,0 | 33,0 |
| 4 | 42,0 | 23,0 |
| 5 | 45,0 | 19,0 |
| 6 | 59,0 | 41,0 |
| 7 | 35,0 | 26,0 |
| 8 | 37,0 | 28,0 |
| 9 | 32,0 | 35,0 |
| 10 | 44,0 | 22,0 |
| 11 | 59,0 | 17,0 |
| 12 | 49,0 | 29,0 |
| 13 | 47,0 | 28,0 |
| 14 | | 41,0 |
| 15 | | 17,0 |
| Média | 42,2 | 28,3 |
| EPM | 2,9 | 2,7 |

Anexo H - Valores individuais, média e EPM da concentração plasmática de leptina (ng/mL), no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal, por 8 dias consecutivos após cirurgia.

| | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|--------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1,3 | 2,1 | 2,4 | 3,4 |
| 2 | 1,4 | 2,8 | 2,9 | 2,7 |
| 3 | 1,3 | 2,6 | 4,0 | 4,8 |
| 4 | 1,9 | 1,8 | 3,1 | 3,9 |
| 5 | 2,1 | 3,1 | 2,4 | 4,4 |
| 6 | 1,7 | 2,3 | 1,4 | 5,0 |
| 7 | 1,7 | 1,9 | 2,0 | 3,0 |
| 8 | | | 2,1 | 2,6 |
| Média | 1,6 | 2,4 | 2,5 | 3,7 |
| EPM | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |

Anexo I - Valores individuais, média e EPM da expressão relativa de RNAm (unidades arbitrárias) de ObRb, NPY, AgRP, POMC e CART no ARC no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal, por 8 dias consecutivos após cirurgia.

| RNAm ObRb | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 0,8 | 1,1 | 0,7 | 0,7 |
| 2 | 0,8 | 0,6 | 0,7 | 0,9 |
| 3 | 0,8 | 0,7 | 0,9 | 0,7 |
| 4 | 1,3 | 0,7 | 0,8 | 0,9 |
| 5 | 1,1 | 1,0 | 1,1 | 1,3 |
| 6 | 1,2 | | 1,6 | |
| 7 | | | 1,5 | |
| Média | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 0,9 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

| RNAm NPY | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|-----------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 0,8 | 0,5 | 0,6 | 1,2 |
| 2 | 1,1 | 0,6 | 1,4 | 0,9 |
| 3 | 1,4 | 0,7 | 0,9 | 0,7 |
| 4 | 0,8 | 0,8 | 1,3 | 1,1 |
| 5 | | 0,5 | 1,0 | 0,5 |
| 6 | | | 1,3 | 0,5 |
| 7 | | | 0,9 | |
| Média | 1,0 | 0,6 | 1,0 | 0,8 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

| RNAm AgRP | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1,8 | 0,5 | 0,8 | 0,9 |
| 2 | 0,8 | 0,4 | 1,3 | 0,5 |
| 3 | 1,4 | 0,4 | 0,9 | 0,4 |
| 4 | 0,9 | 0,4 | 1,2 | 1,4 |
| 5 | 0,5 | 0,7 | 0,7 | 0,9 |
| 6 | | 0,9 | 1,7 | 0,4 |
| 7 | | | 0,8 | 1,2 |
| Média | 1,0 | 0,5 | 1,0 | 0,8 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

| RNAm POMC | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1,3 | 0,4 | 0,6 | 0,5 |
| 2 | 1,0 | 0,6 | 1,4 | 0,9 |
| 3 | 0,9 | 0,6 | 0,6 | 0,5 |
| 4 | 0,8 | 0,7 | 1,2 | 1,2 |
| 5 | | 1,1 | 0,8 | 0,3 |
| 6 | | | 1,5 | 1,3 |
| 7 | | | 1,3 | |
| Média | 1,0 | 0,7 | 1,0 | 0,8 |
| EPM | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 |

| RNAm CART | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 0,9 | 0,5 | 0,7 | 0,5 |
| 2 | 0,5 | 0,4 | 1,0 | 0,6 |
| 3 | 1,4 | 0,5 | 1,2 | 0,6 |
| 4 | 1,5 | 0,7 | 1,3 | 1,1 |
| 5 | 1,1 | 0,7 | 1,3 | 0,6 |
| 6 | | 0,5 | 1,0 | 0,5 |
| 7 | | | 0,7 | |
| Média | 1,0 | 0,5 | 1,0 | 0,6 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

Anexo J - Valores individuais, média e EPM da expressão relativa de RNAm (unidades arbitrárias) de ObRb, MC4-R, CRF e CART no PVN no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal, por 8 dias consecutivos após cirurgia.

| RNAm ObRb | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 0,6 | 1,9 | 0,8 | 1,6 |
| 2 | 1,3 | 2,2 | 1,0 | 1,3 |
| 3 | 1,1 | 2,1 | 1,3 | 1,0 |
| 4 | 0,6 | 1,6 | 1,0 | 1,3 |
| 5 | 1,3 | 1,5 | 0,9 | 1,2 |
| 6 | 1,3 | 1,5 | | 1,3 |
| 7 | 1,3 | | | |
| Média | 1,0 | 1,8 | 1,0 | 1,3 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

| RNAm MC4-R | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|-------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1,4 | 2,5 | 0,6 | 1,1 |
| 2 | 0,6 | 2,2 | 0,5 | 0,6 |
| 3 | 1,9 | 5,4 | 1,3 | 1,3 |
| 4 | 1,1 | 2,8 | 0,9 | 2,8 |
| 5 | 1,0 | 1,3 | 1,5 | 2,4 |
| 6 | 0,6 | | 2,2 | 1,5 |
| 7 | 0,9 | | | 1,2 |
| 8 | | | | 1,4 |
| Média | 1,0 | 2,8 | 1,0 | 1,5 |
| EPM | 0,3 | 0,4 | 0,3 | 0,3 |

| RNAm CRF | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|-----------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 2,2 | 12,0 | 0,4 | 1,0 |
| 2 | 1,1 | 17,0 | 1,2 | 1,7 |
| 3 | 0,6 | 5,8 | 1,2 | 2,3 |
| 4 | 1,1 | 7,5 | 1,0 | 1,4 |
| 5 | 0,6 | | 1,6 | 0,9 |
| 6 | | | | 1,8 |
| 7 | | | | 0,8 |
| Média | 1,1 | 10,6 | 1,0 | 1,4 |
| EPM | 0,9 | 1,0 | 0,9 | 0,8 |

| RNAm CART | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1,2 | 1,2 | 1,8 | 1,0 |
| 2 | 0,8 | 2,6 | 1,6 | 1,3 |
| 3 | 1,0 | 3,5 | 0,7 | 1,8 |
| 4 | 1,1 | 1,2 | 0,6 | 1,6 |
| 5 | 0,9 | 1,1 | 1,0 | 0,8 |
| 6 | 0,6 | | 1,1 | 0,6 |
| 7 | 1,5 | | 0,7 | 1,8 |
| 8 | | | | 0,9 |
| Média | 1,0 | 1,9 | 1,0 | 1,2 |
| EPM | 0,2 | 0,3 | 0,2 | 0,2 |

Anexo K - Valores individuais, média e EPM da expressão relativa de RNAm (unidades arbitrárias) de ObRb, MC4-R, orexina A, Pró-MCH e CART da LHA no período pré- (17h) e pós-alimentação (22h), de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol na dose de 10 µg/Kg peso corporal, por 8 dias consecutivos após cirurgia.

| RNAm ObRb | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1,1 | 1,1 | 1,0 | 1,7 |
| 2 | 1,4 | 0,7 | 0,7 | 2,1 |
| 3 | 1,4 | 0,8 | 1,3 | 2,3 |
| 4 | 1,0 | 1,4 | 2,0 | 2,1 |
| 5 | 1,0 | 1,1 | 0,6 | 3,0 |
| 6 | 0,6 | 0,7 | 0,9 | 2,5 |
| 7 | 0,7 | 0,5 | | 1,7 |
| Média | 1,0 | 0,9 | 1,0 | 2,2 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

| RNAm MC4-R | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|-------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 0,7 | 0,5 | 1,0 | 1,4 |
| 2 | 1,3 | 0,6 | 0,6 | 1,1 |
| 3 | 1,0 | 0,7 | 1,4 | 1,4 |
| 4 | 1,5 | 0,7 | 0,8 | 0,7 |
| 5 | 0,7 | 0,7 | 1,5 | 0,8 |
| 6 | | 1,6 | 1,4 | 1,4 |
| 7 | | | 1,0 | 1,0 |
| 8 | | | 0,9 | |
| Média | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 1,1 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

| RNA_m Orexina A | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|----------------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1,0 | 0,8 | 1,5 | 0,8 |
| 2 | 0,9 | 0,6 | 0,8 | 1,2 |
| 3 | 0,7 | 0,4 | 0,9 | 1,8 |
| 4 | 1,6 | 0,6 | 1,0 | 0,9 |
| 5 | 0,9 | 0,7 | 1,1 | 0,8 |
| 6 | 1,1 | 0,6 | 0,5 | 1,5 |
| 7 | | | 1,5 | |
| 8 | | | 1,1 | |
| Média | 1,0 | 0,6 | 1,0 | 1,2 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

| RNA_m Pró-MCH | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|--------------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1,2 |
| 2 | 1,4 | 0,6 | 1,1 | 1,0 |
| 3 | 0,9 | 1,3 | 1,1 | 1,0 |
| 4 | 1,4 | 0,8 | 1,3 | 1,0 |
| 5 | 0,9 | 1,0 | 1,0 | 0,7 |
| 6 | 0,9 | | 0,9 | |
| 7 | | | 0,8 | |
| Média | 1,0 | 0,9 | 1,0 | 0,9 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

| RNA_m CART | OVX 17h | OVX+E 17h | OVX 22h | OVX+E 22h |
|-----------------------------|----------------|------------------|----------------|------------------|
| 1 | 1,3 | 0,9 | 1,2 | 1,3 |
| 2 | 1,1 | 0,5 | 0,8 | 1,6 |
| 3 | 0,9 | 0,6 | 1,1 | 1,5 |
| 4 | 1,1 | 1,4 | 1,0 | 1,8 |
| 5 | 0,9 | 0,9 | 1,2 | 1,5 |
| 6 | 0,7 | 0,6 | 0,8 | |
| 7 | | | 1,8 | |
| 8 | | | 0,6 | |
| Média | 1,0 | 0,8 | 1,0 | 1,5 |
| EPM | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

Anexo L - Valores individuais, média e EPM da ingestão alimentar (g/100 g peso corporal) de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol, e submetidas à administração icv de salina ou leptina no oitavo dia pós-cirúrgico.

| | OVX Salina 2 horas | OVX Leptina 2 horas | OVX+E2 Salina 2 horas | OVX+E2 Leptina 2 horas |
|--------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1 | 2,1 | 0,6 | 2,5 | 3,1 |
| 2 | 3,8 | 2,3 | 1,9 | 1,9 |
| 3 | 1,5 | 2,7 | 3,0 | 2,1 |
| 4 | 1,5 | 3,0 | 2,6 | 2,4 |
| 5 | 2,2 | 3,3 | 1,1 | 2,2 |
| 6 | 1,5 | 1,0 | 0,0 | 2,0 |
| 7 | 1,0 | 2,2 | 2,3 | 2,1 |
| 8 | 2,3 | 1,1 | 3,0 | |
| 9 | 1,7 | 2,8 | 2,2 | |
| 10 | 3,9 | 1,4 | 2,1 | |
| Média | 2,1 | 2,0 | 2,1 | 2,3 |
| EPM | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,3 |

| | OVX Salina 4 horas | OVX Leptina 4 horas | OVX+E2 Salina 4 horas | OVX+E2 Leptina 4 horas |
|--------------|-----------------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 1 | 3,8 | 1,9 | 3,6 | 3,1 |
| 2 | 5,9 | 2,0 | 3,4 | 3,2 |
| 3 | 3,7 | 2,7 | 3,7 | 3,4 |
| 4 | 2,6 | 3,0 | 3,6 | 2,4 |
| 5 | 6,2 | 3,9 | 2,5 | 3,0 |
| 6 | 2,8 | 1,0 | 1,1 | 2,4 |
| 7 | 3,4 | 2,9 | 2,6 | 3,5 |
| 8 | 4,0 | 3,7 | 4,3 | |
| 9 | 1,7 | 2,8 | 2,9 | |
| 10 | 3,9 | 1,8 | 3,6 | |
| Média | 3,8 | 2,6 | 3,1 | 3,0 |
| EPM | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 |

| | OVX Salina 14 horas | OVX Leptina 14 horas | OVX+E2 Salina 14 horas | OVX+E2 Leptina 14 horas |
|--------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1 | 9,4 | 7,3 | 10,4 | 9,3 |
| 2 | 10,0 | 5,6 | 8,6 | 7,8 |
| 3 | 9,2 | 6,4 | 8,2 | 6,9 |
| 4 | 5,6 | 7,1 | 5,2 | 3,6 |
| 5 | 10,9 | 7,5 | 7,5 | 7,9 |
| 6 | 8,9 | 4,1 | 5,8 | 5,6 |
| 7 | 10,7 | 8,4 | 7,2 | 6,6 |
| 8 | 9,3 | 8,2 | 11,4 | |
| 9 | 5,5 | 7,4 | 4,0 | |
| 10 | 7,9 | 7,4 | 3,9 | |
| Média | 8,7 | 6,9 | 7,2 | 6,8 |
| EPM | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,7 |

| | OVX Salina 24 horas | OVX Leptina 24 horas | OVX+E2 Salina 24 horas | OVX+E2 Leptina 24 horas |
|--------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1 | 9,4 | 10,2 | 14,0 | 10,9 |
| 2 | 14,5 | 8,9 | 12,4 | 9,7 |
| 3 | 12,2 | 9,1 | 12,6 | 8,6 |
| 4 | 7,1 | 9,5 | 8,5 | 5,6 |
| 5 | 14,9 | 9,8 | 10,0 | 7,9 |
| 6 | 11,7 | 7,6 | 10,1 | 7,9 |
| 7 | 14,1 | 11,4 | 11,4 | 9,1 |
| 8 | 14,7 | 9,7 | 14,4 | |
| 9 | 8,7 | 10,6 | 8,7 | |
| 10 | 11,8 | 10,5 | 8,5 | |
| Média | 11,9 | 9,7 | 11,0 | 8,5 |
| EPM | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,7 |

Anexo M - Valores individuais, média e EPM da variação do peso corporal (g) de ratas ovariectomizadas com (OVX+E) e sem (OVX) reposição de estradiol, e submetidas à administração icv de salina ou leptina no oitavo dia pós-cirúrgico.

| | OVX Salina 14 horas | OVX Leptina 14 horas | OVX+E2 Salina 14 horas | OVX+E2 Leptina 14 horas |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 7,0 | 3,0 | 2,0 | -1,0 |
| 2 | 8,0 | -3,0 | 5,0 | -1,0 |
| 3 | 1,0 | -2,0 | 0,0 | -6,0 |
| 4 | 2,0 | -7,0 | 0,0 | -15,0 |
| 5 | 6,0 | 8,0 | 1,0 | 0,0 |
| 6 | 5,0 | -10,0 | 0,0 | -5,0 |
| 7 | 14,0 | 1,0 | 0,0 | -10,0 |
| 8 | 13,0 | 5,0 | 10,0 | |
| 9 | 0,0 | -1,0 | 0,0 | |
| 10 | 2,0 | 3,0 | 3,0 | |
| Média | 5,8 | -0,3 | 2,1 | -5,4 |
| EPM | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,8 |

| | OVX Salina 24 horas | OVX Leptina 24 horas | OVX+E2 Salina 24 horas | OVX+E2 Leptina 24 horas |
|--------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 8,0 | -6,0 | -1,0 | -12,0 |
| 2 | 8,0 | 2,0 | 6,0 | -13,0 |
| 3 | 2,0 | -4,0 | 2,0 | -13,0 |
| 4 | 2,0 | -5,0 | -1,0 | -5,0 |
| 5 | 8,0 | -3,0 | 1,0 | -1,0 |
| 6 | 7,0 | -5,0 | 2,0 | -2,0 |
| 7 | 13,0 | 6,0 | -1,0 | -9,0 |
| 8 | 11,0 | -8,0 | 11,0 | |
| 9 | 1,0 | -3,0 | 1,0 | |
| 10 | 0,0 | -7,0 | 3,0 | |
| Média | 6,0 | -3,3 | 2,3 | -7,8 |
| EPM | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,6 |

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)