KARINA THIEME

**O TRATAMENTO COM LEPTINA POR 7 E 28 DIAS
ALTERA A FUNÇÃO E A MORFOLOGIA RENAL
DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

KARINA THIEME

**O TRATAMENTO COM LEPTINA POR 7 E 28 DIAS
ALTERA A FUNÇÃO E A MORFOLOGIA RENAL
DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Thieme, Karina.

O tratamento com leptina por 7 e 28 dias altera a função e a morfologia renal de ratos / Karina Thieme. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Maria Oliveira de Souza.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Efeitos da leptina sobre a função e a morfologia renal de ratos.

Versão do título para o inglês: Leptin treatment for 7 and 28 days changes renal function and morphology in rats.

1. Função renal 2. Morfologia renal 3. Leptina 4. Sistema renina-Angiotensina. I. Souza, Profa. Dra. Maria Oliveira de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB059/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karina Thieme.

Título da Tese: O tratamento com leptina por 7 e 28 dias altera a função e a morfologia renal de ratos.

Orientador(a): Prof. Dra. Maria Oliveira de Souza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **150** nas fls. **78** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Oliveira de Souza, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito da leptina sobre a função renal e a expressão de proteínas renais em ratos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Karina Thieme**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **17.11.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 18 de novembro de 2009.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.092 .12

WTL/mcgn

São Paulo, 05 de novembro de 2012.

REF.: Protocolo nº 150/09.

"Efeito da leptina sobre a função renal e a expressão de proteínas renais em ratos"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 17.11.2015.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

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

Ilma.Sra.

Profa Dra. Maria Oliveira de Souza

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico este trabalho aos meus pais, Ursula e Gopala, e ao meu marido, Cesar, que estiveram ao meu lado, que são meu alicerce e meu porto seguro. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Seria impossível trilhar um longo caminho como o do doutorado, sem ter ao lado pessoas que te querem bem e desejam o seu sucesso. Seria impossível chegar até aqui sem a amizade e a cumplicidade de várias pessoas. E é por isso que agradeço...

Aos meus pais, que sempre deram o melhor de si para me assegurar uma boa educação e formação, que sempre me apoiaram, entenderam minha ausência em alguns momentos e me deram seu amor incondicional. Obrigada por aceitarem a minha escolha profissional nada convencional, por acreditarem na minha capacidade e se orgulharem disso! Obrigada por me incentivarem a seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis!

Ao meu querido marido, por toda a compreensão, paciência, amor, carinho, força e respeito. Obrigada por sempre estar ao meu lado, me ajudar a superar os obstáculos, vibrar com meu sucesso e me fazer tão feliz todos os dias!

À toda a minha família pelo incentivo e torcida. Um especial agradecimento aos meus afilhados, Gustavo e André, que me trazem muita alegria.

À minha orientadora, Profa. Maria, por ter me aceitado no laboratório desde o início da Graduação, por ter acreditado em mim, pelos seus ensinamentos e pela oportunidade de crescer cientificamente. Você foi a responsável pelo meu amadurecimento científico. Meu muito obrigada por tudo!

À Profa. Margarida de Mello Aires, por ter me guiado até o laboratório da Profa. Maria e por ser sempre tão carinhosa.

À Profa. Luciana Rossoni, sempre presente e dando ótimos conselhos.

Ao Rildo A. Volpini, pelo aprendizado da técnica de histoquímica.

Às minhas grandes amigas "cientistas fundamentais", Bia e Isadora, pela amizade de tantos anos, pela companhia em congressos, por terem escutado os desabafos e as angústias, me dado conselhos e dividido as alegrias e as tristezas científicas e não-científicas. Obrigada por fazerem parte de tudo isso! Um agradecimento especial à Bia, minha companheira em Boston e agora também colaboradora!

Às minhas do ICB, Bárbara e Izabela, por serem tão especiais para mim, pela parceria, pelas dicas, pelos encontros divertidos, pelos cafés, por dividirem as angústias e os sucessos. Sem vocês teria sido muito mais difícil!

Às minhas amigas Rosa e Camila, que apesar de distantes, moram no meu coração.

Aos meus colegas de laboratório, Juliana e Fernando, por toda a ajuda e parceria e pela excelente convivência.

Aos demais colegas do ICB, pelas experiências e conhecimentos divididos nas disciplinas.

À todos que participaram dos Cursos de Verão, onde tive a incrível oportunidade da docência.

Aos professores, com os quais aprendi muito e enriqueci os meus conhecimentos teóricos e práticos.

À todos os funcionários do ICB, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos animais, pois sem eles nada disso seria possível!

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

"O futuro pertence àqueles que acreditam
na beleza dos seus sonhos."

Eleanor Roosevelt

"O conhecimento é como um jardim: se
não for cultivado, não pode ser colhido."

Provérbio africano

RESUMO

THIEME, K. **O tratamento com leptina por 7 e 28 dias altera a função e a morfologia renal de ratos.** 2014. 101 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Diversos estudos apontam para uma importante participação da leptina no processo de hipertensão arterial relacionada à obesidade. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da hiperleptinemia induzida sobre a função e a morfologia renal de ratos e a participação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA). Ratos machos Wistar foram submetidos à implantação de mini-bombas osmóticas contendo leptina para infusão por 7 ou 28 dias. O grupo controle foi submetido à cirurgia fictícia e o grupo Losartan recebeu a droga por injeção subcutânea ou mini-bomba osmótica. A pressão arterial (PA) foi avaliada por pletismografia de cauda e a função renal por meio do clearance renal (fluxo plasmático renal = FPR pelo clearance de ácido para-amino-hipúrico e ritmo de filtração glomerular = RFG através do clearance de inulina). As concentrações plasmáticas e urinárias de Na^+ e K^+ foram avaliadas por fotometria de chama. Foram analisados também a morfologia renal, a expressão de desmina e ED-1 por imuno-histoquímica e a expressão de componentes do SRA por PCR em tempo real. *In vitro*, células mesangiais (CM), foram tratadas com leptina (10, 100 e 250 ng/ml), por 24 e 72 horas, para ensaio de apoptose. Os resultados do grupo de animais tratados por 7 dias demonstram que o grupo Leptina apresentou redução no ganho de peso ($p<0.05$), aumento de 11,5% na PA, queda de 23% no FPR, aumento de 11,5% no RFG, aumento na fração de filtração ($p<0.05$), aumento no fluxo urinário ($p<0.05$), na carga excretada de Na^+ ($p<0.05$) e na fração de excreção do Na^+ ($p<0.05$), sendo todos estes parâmetros normalizados no grupo tratado com Leptina + Losartan (LL). O tratamento não alterou parâmetros de filtração e excreção de K^+ . A análise morfológica demonstrou que o tratamento induziu hipertrofia glomerular ($p<0.05$), aumento da expressão de desmina e albuminúria ($p<0.05$), que foram corrigidos no grupo LL. Os resultados dos animais tratados por 28 dias demonstram que o tratamento não alterou a ingestão alimentar e o ganho de peso dos animais. Porém, o tratamento induziu aumento progressivo na PA ($p<0.05$), normalizado no grupo LL; queda no FPR ($p<0.05$), que foi parcialmente normalizado no grupo tratado com LL; nenhuma alteração no RFG e aumento na fração de filtração ($p<0.05$), que não foi normalizado no grupo LL. O fluxo urinário e o manejo de Na^+ e K^+ não sofreram alterações. O tratamento com leptina induziu hipertrofia glomerular ($p<0.05$), aumento da expressão de desmina e ED-1 ($p<0.05$) e albuminúria ($p<0.05$), parâmetros normalizados nos animais tratados com LL. Não foi observada ativação do SRA intrarenal. Os estudos de apoptose em CM demonstraram que a leptina (100 e 250 ng/ml) induziu apoptose no tratamento por 72 horas. Em conclusão, nossos dados demonstram que o tratamento com leptina por 7 e 28 dias levou a um progressivo aumento da PA e alterou a função e a morfologia renal. As alterações são, em grande parte, normalizadas com o Losartan, evidenciando uma interação entre a leptina e a Ang II na injúria renal, neste modelo experimental. Além disso, a leptina exerce efeito apoptótico sobre as CM.

Palavras-chave: Função renal. Morfologia renal. Leptina. Sistema renina-angiotensina.

ABSTRACT

THIEME, K. **Leptin treatment for 7 and 28 days changes renal function and morphology in rats.** 2014. 101 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Many studies suggest an important participation of leptin in obesity-related hypertension. The aim of this study was to evaluate the effects of induced hyperleptinemia on renal function and morphology in rats and the role of Renin-Angiotensin System (RAS). Male Wistar rats were submitted to osmotic minipumps insertion filled with leptin, for infusion for 7 or 28 days. The control group was submitted to fictitious surgery and the Losartan group received the drug by subcutaneous injection or osmotic minipump. The systolic blood pressure (SBP) was evaluated by tail cuff method and renal function through renal clearance (renal plasma flow = RPF by sodium *para*-aminohippuric acid clearance and glomerular filtration rate = GFR by inulin clearance). The plasma and urine concentrations of Na⁺ and K⁺ were analyzed by flame photometry. The renal morphology, the expression of desmin and ED-1 by immunohistochemistry and the expression of RAS components by real-time PCR were also analyzed. *In vitro*, mesangial cells (MC) were treated with leptin (10, 100 e 250 ng/ml) for 24 e 72 hours for apoptosis assay. The results of the animals treated for 7 days showed that Leptin group exhibited a reduction in body weight gain (p<0.05), enhancement of 11,5% in SBP, decrease of 23% in RPF, enhancement of 11,5% in GFR, enhancement of filtration fraction (p<0.05), enhancement of urinary flow (p<0.05), excretion of Na⁺ (p<0.05) and fractionary excretion of Na⁺ (p<0.05). All these parameters were normalized in Leptin + Losartan (LL) group. The treatment did not affect the K⁺ filtration and excretion. The morphologic analysis demonstrated that the treatment with leptin induced glomerular hypertrophy (p<0.05), enhanced desmin staining and induced proteinuria (p<0.05), which were also normalized in LL group. The results of the animals treated for 28 days showed that the treatment did not affect food ingestion and body weight gain. However, induced a progressive enhancement in SBP (p<0.05), normalized in LL group; a decrease in RPF (p<0.05), which was partly normalized in LL group; no changes in GFR and enhancement in filtration fraction (p<0.05), which was not normalized in LL group. The urinary flow and Na⁺ and K⁺ handling were not affected by leptin treatment. The leptin treatment induced glomerular hypertrophy (p<0.05), enhanced desmin staining, enhanced ED-1 positive cells staining (p<0.05) and induced proteinuria (p<0.05), which were normalized in the animals of LL group. There was no activation of intrarenal RAS. The apoptosis assay in MC demonstrated that leptin (100 and 250 ng/ml) induced apoptosis in cells treated for 72 hours. In conclusion, the data demonstrated that leptin treatment for 7 and 28 days progressively enhanced SBP and induced changes in renal function and morphology. These alterations were mostly normalized with Losartan co-treatment, evidencing an interaction between leptin and Ang II in renal injury, in this experimental model. Besides, leptin has an apoptotic effect on MC.

Keywords: Renal function. Renal morphology. Leptin. Renin-angiotensin system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sinalização intracelular do receptor de leptina (Ob-Rb).....	25
Figura 2 - Ação central da leptina.....	28
Figura 3 - Efeitos que a leptina exerce sobre os rins.....	31
Figura 4 - Concentração plasmática de leptina em animais tratados por 7 dias.....	50
Figura 5 - Fluxo plasmático renal de animais tratados por 7 dias.....	51
Figura 6 - Ritmo de filtração glomerular de animais tratados por 7 dias.....	52
Figura 7 - Fração de filtração de animais tratados por 7 dias.....	53
Figura 8 - Fluxo urinário de animais tratados por 7 dias.....	54
Figura 9 - Fração de excreção de Na^+ e K^+ de animais tratados por 7 dias.....	55
Figura 10 - Morfologia renal de animais tratados por 7 dias.....	57
Figura 11 - Expressão glomerular de desmina em animais tratados por 7 dias.....	58
Figura 12 - Albuminúria de animais tratados por 7 dias.....	59
Figura 13 - Ingestão alimentar de animais tratados por 28 dias.....	60
Figura 14 - Evolução da pressão arterial em animais tratados por 28 dias.....	62
Figura 15 - Concentração plasmática de leptina em animais tratados por 28 dias.....	63
Figura 16 - Fluxo plasmático renal de animais tratados por 28 dias.....	64
Figura 17 - Ritmo de filtração glomerular de animais tratados por 28 dias.....	65
Figura 18 - Fração de filtração de animais tratados por 28 dias.....	66
Figura 19 - Fluxo urinário de animais tratados por 28 dias.....	67
Figura 20 - Morfologia renal de animais tratados por 28 dias.....	70

Figura 21 - Expressão glomerular de desmina em animais tratados por 28 dias.....	71
Figura 22 - Expressão de ED-1 no tecido renal de animais tratados por 28 dias.....	72 - 73
Figura 23 - Albuminúria de animais tratados por 28 dias.....	74
Figura 24 - Expressão do RNAm de componentes do SRA no tecido renal de animais tratados por 28 dias.....	75
Figura 25 - Apoptose de células mesangiais tratadas com leptina.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingestão alimentar e ganho de peso de animais tratados por 7 dias.....	48
Tabela 2 - Pressão arterial de animais tratados por 7 dias.....	49
Tabela 3 - Hemodinâmica renal de animais tratados por 7 dias.....	53
Tabela 4 - Função tubular de animais tratados por 7 dias.....	55
Tabela 5 - Parâmetros do equilíbrio ácido-base e osmolalidade de animais tratados por 7 dias.....	56
Tabela 6 - Ingestão alimentar de animais tratados por 28 dias.....	61
Tabela 7 - Ganho de peso de animais tratados por 28 dias.....	61
Tabela 8 - Pressão arterial sistólica semanal de animais tratados por 28 dias.....	63
Tabela 9 - Hemodinâmica renal de animais tratados por 28 dias.....	66
Tabela 10 - Função tubular de animais tratados por 28 dias.....	68
Tabela 11 - Parâmetros do equilíbrio ácido-base e osmolalidade de animais tratados por 28 dias.....	69
Tabela 12 - Apoptose de células mesangiais tratadas com leptina.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MSH	Hormônio estimulante de melanócito
AgRP	<i>Agouti related peptide</i>
Akt	Proteína quinase B
Ang-(1-7)	Angiotensina 1-7
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ANP	Peptídio atrial natriurético
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
AT ₁	Receptor de Ang II tipo 1
AT ₂	Receptor de Ang II tipo 2
BHE	Barreira hemato-encefálica
BSA	Albumina de soro bovino
CE	Carga excretada
CEUA	Comissão de ética no uso de animais em experimentação
CF	Carga filtrada
CM	Células mesangiais
DMH	Núcleo hipotalâmico dorsomedial
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
ET-1	Endotelina-1
FE	Fração de excreção
FF	Fração de filtração
FPR	Fluxo plasmático renal
FF	Fração de filtração
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
IL-6	Interleucina-6
JAK	<i>Janus kinase</i>
LH	Núcleo hipotalâmico lateral
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC3/4R	Receptor para melanocortina 3/4
mTor	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do trato solitário
ObR	Receptor para leptina
PA	Pressão arterial
PAH	Ácido para-amino-hipúrico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
POMC	Pró-opiomelanocortina
(P)RR	Receptor para pró-renina
PTP1B	<i>Protein-tyrosine phosphatase 1B</i>
PTPN2	<i>Protein-tyrosine phosphatase non-receptor type 2</i>
RFG	Ritmo de filtração glomerular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SFO	Órgão subfornicial
SOCS3	<i>Supressor of cytokine signaling-3</i>
SNS	Sistema nervoso simpático
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TβRII	Receptor para TGF-β
TGF-β	<i>Tumor growth factor β</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
Tyr	Tirosina
V	Fluxo urinário
VMH	Núcleo hipotalâmico ventromedial

LISTA DE FÓRMULAS

- (1) **Ganho de peso**..... $\text{Ganho de peso} = (\text{peso inicial} - \text{peso final}) / (\text{peso inicial})$
- (2) **Fluxo urinário**..... $V = (\text{volume} / \text{tempo} / \text{peso})$
- (3) **Carga filtrada**..... $CF_x = P_x \cdot RFG$
- (4) **Carga excretada**..... $CE_x = U_x \cdot V$
- (5) **Fração de excreção**..... $FE_x = CF_x / CE_x$
- (6) **Clearance**..... $C_x = (U_x \cdot V) / P_x$
- (7) **Fração de filtração**..... $FF = RFG / FPR$

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Leptina e seus receptores.....	23
1.2 Clearance de leptina.....	26
1.3 Resistência à leptina.....	26
1.4 Ação central da leptina.....	27
1.5 Efeitos da leptina sobre o sistema cardiovascular.....	28
1.6 Efeitos da leptina sobre os rins.....	29
1.7 Sistema renina-angiotensina.....	31
1.8 Interações entre leptina e SRA.....	33
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 Justificativa.....	35
2.2 Objetivo geral.....	35
2.3 Objetivos específicos.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Animais experimentais.....	38
3.2 Grupos experimentais.....	38
3.3 Obtenção dos modelos experimentais.....	38
3.3.1 <i>Indução de hiperleptinemia.....</i>	38
3.3.2 <i>Tratamento com Losartan.....</i>	39
3.4 Avaliação da ingestão alimentar e do ganho de peso.....	39

3.5 Medidas de pressão arterial por pletismografia de cauda.....	40
3.6 Ensaio enzimático para determinação da concentração plasmática de leptina.....	40
3.7 Clearance renal.....	40
3.8 Perfusão renal.....	41
3.9 Parâmetros renais e plasmáticos.....	42
3.10 Avaliação da função renal.....	42
3.11 Histoquímica.....	43
3.12 Imuno-histoquímica.....	43
3.13 Marcação de prata para análise de proteinúria.....	44
3.14 Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	45
3.14.1 <i>Extração do RNA total.....</i>	45
3.14.2 <i>Síntese do cDNA a partir do RNAm.....</i>	45
3.14.3 <i>Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real.....</i>	45
3.15 Cultura celular de células mesangiais de camundongos.....	46
3.16 Ensaio de apoptose (<i>in vitro</i>).....	46
3.17 Análise estatística.....	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 Animais tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias.....	48
4.1.1 <i>Ingestão alimentar e ganho de peso.....</i>	48
4.1.2 <i>Pressão arterial.....</i>	49

4.1.3 Concentração plasmática de leptina.....	50
4.1.4 Hemodinâmica renal.....	51
4.1.5 Função tubular.....	54
4.1.6 Parâmetros do equilíbrio ácido-base e osmolalidade.....	56
4.1.7 Morfologia renal.....	56
4.1.8 Expressão de desmina.....	58
4.1.9 Albuminúria.....	59
4.2 Animais tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias.....	60
4.2.1 Ingestão alimentar e ganho de peso.....	60
4.2.2 Pressão arterial.....	62
4.2.3 Concentração plasmática de leptina.....	63
4.2.4 Hemodinâmica renal.....	64
4.2.5 Função tubular.....	67
4.2.6 Parâmetros do equilíbrio ácido-base e osmolalidade	69
4.2.7 Morfologia renal.....	69
4.2.8 Expressão de desmina.....	71
4.2.9 Expressão de ED-I.....	72
4.2.10 Albuminúria.....	74
4.2.11 Expressão de componentes do SRA no tecido renal.....	75
4.3 Estudos <i>in vitro</i>.....	76
4.3.1 Apoptose de células mesangiais.....	76

5 DISCUSSÃO.....	77
6 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS.....	98

1 INTRODUÇÃO

A obesidade e o sobrepeso são definidos como um anormal ou excessivo acúmulo de gordura corporal. A classificação adotada pela Organização Mundial para Saúde define como com sobrepeso indivíduos que apresentam Índice de Massa Corporal (IMC) acima de 25 e obesos aqueles com IMC acima de 30. A obesidade é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas, como: hipertensão arterial, doença coronariana, diabetes e dislipidemia. Estima-se que, em países industrializados, aproximadamente 70% dos casos de hipertensão arterial podem ser diretamente atribuídos ao excesso de peso ¹.

A patogênese da hipertensão arterial associada à obesidade é multifatorial, no entanto, em outras formas de hipertensão, a vasoconstrição e a retenção de Na⁺ excessivas tem importante papel ². Essas anormalidades resultam de um distúrbio no balanço entre o sistema nervoso simpático (SNS), o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o peptídeo atrial natriurético (ANP), o óxido nítrico (NO) e outros ³.

Inicialmente acreditava-se que o tecido adiposo era inerte e responsável apenas pelo armazenamento de energia, porém, estudos realizados durante as últimas décadas sugerem um importante papel do tecido adiposo em produzir hormônios, também chamados adipocinas, que poderiam estar envolvidos com as doenças relacionadas à obesidade. Dentre eles podemos citar: adiponectina, apolipoproteína E, lipase lipoprotéica, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6) e a leptina ⁴. A leptina tem despertado grande interesse entre os pesquisadores, pelo seu importante papel no metabolismo e controle alimentar, mas também por seus diversos efeitos sistêmicos, sobre o sistema cardiovascular e renal, sistema reprodutor e sistema imune.

1.1 Leptina e seus receptores

Gordon Kennedy em 1953 ⁵ foi o primeiro a propor a existência de fatores circulantes, que eram liberados pelo tecido adiposo, em proporção a este, e que agiam no hipotálamo para controlar o metabolismo, o gasto energético e a ingestão de alimentos. No entanto, em 1973, Coleman DL ⁶, utilizando um modelo de parabiose, demonstrou que a obesidade em camundongos *ob/ob* estava associada à ausência de um fator de saciedade, enquanto que os camundongos *db/db* produziam este fator porém não eram capazes de responder a ele. No entanto, somente em 1994, Zhang et al. clonaram o gene *ob*, cujo produto é a leptina (do grego *leptos*), uma proteína de 16 kDa, que age diretamente no hipotálamo para modular

negativamente a ingestão energética. A alta homologia do gene *ob* entre os vertebrados sugere que a sua função seja bastante conservada ⁷.

Os camundongos *ob/ob* são obesos devido à ausência de leptina. Em contraste, animais com obesidade induzida por dieta, assim como a maioria dos humanos obesos, apresentam um quadro de hiperleptinemia. Existem outros dois modelos animais relacionados à leptina: 1) camundongos *db/db*, que não possuem receptores Ob-Rb porém possuem todas as outras isoformas funcionais de receptores para leptina e 2) ratos Zucker *fa/fa*, que possuem mutação no domínio extracelular do receptor para leptina, reduzindo a afinidade da interação hormônio-receptor. Todos esses animais apresentam hiperfagia, são obesos, hiperleptinêmicos e resistentes à leptina e à insulina ⁸.

A leptina é produzida principalmente em adipócitos do tecido adiposo branco, porém estudos evidenciam a possibilidade de síntese na placenta, músculo esquelético e coração ⁹. Os receptores de leptina são produtos do gene *lepr* (do inglês, *leptin receptor*), sendo as múltiplas formas resultantes de splicing alternativo do RNAm e posteriores clivagens proteolíticas ¹⁰. Já foram identificadas 6 isoformas do receptor para leptina (Ob-Ra-f), que pertencem à classe I dos receptores de citocinas e por isso apresentam características em comum com o receptor de interleucina-6 (IL-6) ¹¹. A isoforma longa (Ob-Rb) é encontrada principalmente no hipotálamo, porém demonstrou-se também a presença de Ob-Rb na parede de vasos ¹² e nos rins (principalmente na região da medula renal) ¹³. A interação hormônio-receptor leva a uma mudança conformacional do receptor, que promove a sua fosforilação através da ativação da proteína JAK2 (do inglês, *janus kinase 2*). A ativação de JAK2 fosforila as tirosinas Tyr⁹⁸⁵, Tyr¹⁰⁷⁷ e Tyr¹¹³⁸ no domínio citoplasmático do receptor, que atuam como sítio de ligação para outras moléculas, como as STATs (do inglês, *signal transducer and activator of transcription*). Cada resíduo de tirosina participa da ativação de mecanismos de sinalização distintos ¹⁴. A Tyr¹¹³⁸ promove o recrutamento e fosforilação da STAT3, enquanto que a Tyr¹⁰⁷⁷ liga-se e fosforila a STAT5 ¹⁵. As STATs ativadas translocam para o núcleo e modulam a transcrição de genes com implicações na regulação fisiológica do comportamento alimentar ^{16; 17}. A ativação de STAT3, STAT5 e STAT6, mas não para STAT1, STAT2 ou STAT4 foi descrita para o receptor Ob-Rb ¹⁸. A proteína SOCS3 (do inglês, *suppressor of cytokine signaling 3*) é um regulador negativo da sinalização do receptor Ob-Rb e a transcrição de seu gene é aumentada pela ligação da STAT3 fosforilada na sua região promotora, caracterizando então uma regulação por *feedback* negativo. Em adição, a proteína fosfatase PTP1B (do inglês, *protein-tyrosine phosphatase 1B*) e a proteína fosfatase PTPN2 (do inglês, *protein-tyrosine phosphatase non receptor type 2*) são inibidores diretos de

JAK2 e STAT3, respectivamente ¹⁹. A Tyr⁹⁸⁵ leva ao recrutamento e ligação do domínio SH2 (do inglês, *Src homology 2*) da tirosina fosfatase SHP2 (do inglês, *cytoplasmic SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase*), levando à ativação da via de sinalização da ERK (do inglês, *extracellular signal-relates kinase*) ^{14 20 21}. A Tyr⁹⁸⁵ também se liga à SOCS3, inibindo a sinalização de STAT3 ²².

A estimulação do receptor Ob-Rb também leva a ativação da via de sinalização da PI3K (do inglês, *phosphatidylinositol-3 kinase*). Esta via de sinalização está envolvida nos efeitos metabólicos e cardiovasculares da leptina, bem como na ativação do sistema nervoso simpático para os rins, levando a importantes implicações fisiopatológicas. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que levam a tais efeitos ²³.

Parte das vias de sinalização ativadas pela ligação da leptina ao receptor Ob-Rb, está demonstrada na **Figura 1**.

Figura 1 - Sinalização intracelular do receptor de leptina (Ob-Rb).

FONTE: (Morris e Rui, 2009) ²⁰

As isoformas curtas do receptor para leptina (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd e Ob-Rf) possuem domínios intracelulares mais curtos que não são capazes de ativar a via JAK/STAT, desencadeando outras vias de sinalização como a via da Akt/PI3K/mTor e ativação de

MAPKs (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*). O receptor Ob-Re é uma forma solúvel que circula no sangue, sendo uma importante proteína ligadora de leptina²⁴.

1.2 Clearance de leptina

Diversos estudos sugerem que a depuração de leptina do plasma ocorre primariamente pelos rins^{25; 26; 27}. Utilizando histo-autoradiografia, Hama et al. (2004) demonstraram que após a filtração glomerular, a leptina é captada através da membrana apical dos túbulos proximais, pela proteína megalina, que promove a sua ligação e internalização. Além disso, demonstraram que a sua distribuição intracelular indica que a captação é então feita para compartimentos endossomais, para ser então metabolizada²⁷.

1.3 Resistência à leptina

Inicialmente acreditava-se que a leptina era apenas um hormônio anti-obesidade, porém a descoberta de resistência à leptina demonstrou que esse seria um modelo muito simplista²⁸. A produção de leptina aumenta proporcionalmente com a adiposidade e os seus níveis estão elevados em modelos animais de obesidade induzida por dieta. Porém, os níveis elevados de leptina não são capazes de desacelerar a progressão da obesidade²⁹. Esta aparente ineficiência de ação do hormônio é identificada como resistência à leptina. Este processo pode ocorrer por uma inabilidade da leptina em alcançar sítios-alvo no sistema nervoso (resistência a leptina administrada periféricamente)³⁰ e/ou por falhas nas respostas celulares dos neurônios-alvo (resistência central à leptina)³¹. A obesidade também está associada com uma redução do transporte de leptina no cérebro³². O receptor Ob-Ra medeia o transporte pela barreira hemato-encefálica³³ e o receptor Ob-Re inibe o seu transporte por antagonizar a ação do receptor Ob-Ra³⁴.

Estudos com camundongos *agouti* conceberam o conceito de resistência seletiva à leptina³⁵. Estes animais possuem uma mutação no gene *agouti*, que leva a uma expressão úbica da proteína agouti. Esta proteína bloqueia os receptores de melanocortina 4 no hipotálamo, promovendo a obesidade nestes animais. Os camundongos *agouti* apresentam hiperleptinemia e hipertensão arterial³⁶. Assim, criou-se a hipótese de que as ações da leptina sobre o sistema nervoso simpático estariam preservadas, apesar da ausência de ações anorexigênicas do hormônio. Esta manutenção da atividade simpática poderia explicar, em parte, como a leptina contribui para a hipertensão nos camundongos *agouti*³⁵. Correia et al.

(2002)³⁷ testaram esta hipótese, comparando os efeitos da leptina sobre a ingestão alimentar, peso corporal e atividade simpática renal em camundongos *agouti* obesos e seus controles. Eles observaram que os efeitos de redução de ingestão alimentar e ganho de peso eram reduzidas nos animais obesos em comparação aos controles, porém, o aumento da atividade simpática renal induzida pela leptina era semelhante em ambos os grupos, o que sugeria uma atenuação e/ou resistência às ações metabólicas do hormônio e preservação das ações simpáticas. No entanto, os mecanismos moleculares do fenômeno de resistência seletiva ainda não foram elucidados.

1.4 Ação central da leptina

A leptina mantém a homeostase energética, principalmente no jejum, ajustando o apetite e o gasto energético. Os receptores de leptina são abundantemente expressos no hipotálamo, no núcleo arqueado (ARC) e núcleos hipotalâmicos ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH) e lateral (LH), onde age após atravessar a barreira hemato-encefálica por transporte específico e saturável³⁸. A leptina interage com várias vias neuronais dentro e fora do hipotálamo para regular o consumo de energia por meio de neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos. A leptina age em duas populações de neurônios do núcleo arqueado, que compõem o sistema melanocortina e regulam o balanço energético a longo prazo: neurônios secretores de pró-opiomelanocortina (POMC) e neurônios AgRP (do inglês, *agouti related peptide*)²⁰ (**Figura 2**). A pró-opiomelanocortina é proteoliticamente clivada em hormônio estimulante de melanócito (α -MSH; do inglês, *melanocyte stimulating hormone*), que age sobre os receptores para melanocortina-3 e 4 (MC3R e MC4R) em neurônios ditos de "segunda ordem", tendo então um efeito anorexigênico e de aumento do metabolismo. Já os neurônios AgRP são orexigênicos e co-expressam as proteínas AgRP e neuropeptídeo Y (NPY). O AgRP é um potente antagonista de ambos MC3R e MC4R e se opõe aos efeitos anorexigênicos de POMC. O NPY tem um potente efeito de estímulo ao comportamento alimentar. A leptina inibe a expressão de AgRP e NPY e também inibe a excitabilidade dos neurônios AgRP^{20; 39}.

A importância do sistema melanocortina deve-se também ao fato de que a perda de função dos receptores MC4R é a causa mais comum de obesidade genética em humanos, participando de 3 a 5% dos casos de obesidade severa em humanos⁴⁰.

Figura 2 - Ação central da leptina.

FONTE: (Philippe e Beutler, 2008) ⁴¹

1.5 Efeitos da leptina sobre o sistema cardiovascular

Sugere-se que em animais obesos, o desenvolvimento da hipertensão arterial está associado à hiperleptinemia ^{36; 42}. No entanto, em humanos com hipertensão essencial também foi relatado o aumento dos níveis plasmáticos de leptina, independentemente da associação com obesidade ou sobrepeso ⁴³. Os mecanismos pelos quais a hiperleptinemia pode induzir a hipertensão incluem: (a) a ativação dos nervos simpáticos que inervam os rins e as glândulas adrenais ⁴⁴, (b) a indução da retenção de sódio ^{45; 46}, (c) o aumento da expressão do vasoconstritor endotelina 1 (ET-1) em células endoteliais ⁴⁷, (d) indução de stress oxidativo e a deficiência de NO, que resultam em vasoconstrição ^{46; 48}.

Já está bem estabelecido que a leptina ativa o sistema nervoso simpático por ações periféricas locais e por ações centrais, mediadas pelo hipotálamo ⁴⁹. A administração sistêmica aguda de leptina está associada à ativação periférica do sistema nervoso simpático, sem elevação da pressão arterial. A ausência de elevação da pressão arterial corrobora as teorias de ativação simultânea de mecanismos locais de vasodilatação, que contrabalanceariam os efeitos vasoconstritores simpáticos ^{50; 51; 52}. No entanto, em condições de hiperleptinemia crônica, como na obesidade, este efeito balanceador poderia não estar presente ³⁵, o que poderia contribuir para a elevação da pressão arterial nesta condição.

Alguns estudos sugerem que a leptina pode estar envolvida no desenvolvimento de complicações da hipertensão, como a hipertrofia do ventrículo esquerdo. A adição de leptina ao meio de cultura aumentou significativamente o tamanho de cardiomiócitos em cultura. Isso sugere uma relação causal direta entre a leptina e a hipertrofia cardíaca ^{53 54}. Em miócitos, a leptina induz aumento da expressão gênica do peptídeo atrial natriurético, um conhecido marcador de remodelamento do miocárdio. Além disso, Xu et al. (2004) ⁵³ relataram que a ET-1 endógena está criticamente envolvida com a hipertrofia induzida por leptina, uma vez que a incubação de cardiomiócitos com leptina induziu um aumento na expressão de ET-1.

1.6 Efeitos da leptina sobre os rins

Tem sido cada vez mais evidente que a leptina exerce efeitos no rim de maneira direta e indireta. O local exato de ação do hormônio no rim ainda não foi elucidado, porém, a identificação de receptores Ob-Ra em células endoteliais glomerulares ⁵⁵ e em células mesangiais ⁵⁶ e de receptores Ob-Rb na medula renal ⁵⁷, sugere que tanto os glomérulos como os túbulos renais são estruturas alvo para a ação da leptina.

Uma vez que pacientes obesos e com altos níveis de leptina circulante muitas vezes desenvolvem glomeruloesclerose, o grupo de Wolf G e Ziyadeh FN estudaram o efeito da leptina sobre células glomerulares. Eles observaram que a leptina estimula a proliferação celular e induz a expressão de RNAm e secreção protéica do fator de crescimento tumoral TGF- β 1 (do inglês, *tumor growth factor - β 1*) em células endoteliais glomerulares. Além disso, eles observaram que a leptina não tem efeito mitogênico sobre as células mesangiais, mas induz um aumento na expressão de RNAm do receptor de TGF- β 1 (T β RII) e na produção de colágeno tipo 1 ⁵⁵, além de aumentar a captação de glicose ⁵⁶. Estes estudos demonstraram que a leptina é capaz de ativar o sistema TGF- β localmente, no glomérulo, induzindo um

cross-talk entre os diferentes tipos celulares do glomérulo, o que poderia estar associado à glomeruloesclerose observada na obesidade.

Apesar da infusão aguda de leptina induzir natriurese ⁵⁸, o efeito da hiperleptinemia crônica na excreção urinária de sódio ainda é controverso e depende da dose, tempo e via de administração do hormônio. Shek et al. (1998) ⁵⁹ e Kuo et al. (2001) ⁴⁸ não observaram efeitos da hiperleptinemia crônica na excreção urinária de sódio, apesar da elevação na pressão arterial, enquanto que Gunduz et al. (2005) ⁶⁰, encontraram aumento da excreção renal de Na⁺ e Beltowski et al. (2004) ⁴⁶ demonstraram que a hiperleptinemia crônica leva à retenção renal de sódio. Este mesmo grupo demonstrou que a hiperleptinemia crônica aumenta a atividade da Na⁺/K⁺ ATPase nos rins, por um mecanismo dependente de stress oxidativo ^{46; 61}.

O aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS; do inglês, *reactive oxygen species*) também medeia respostas proliferativas e efeitos inflamatórios que contribuem para a lesão renal e proteinúria ¹¹. A leptina estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α ; do inglês *tumor necrosis factor*) e IL-6 ⁶². Alguns estudos clínicos sugerem a relação entre níveis de leptina e proteinúria. Pacientes diabéticos com microalbuminúria possuem níveis de leptina significativamente elevados em relação a pacientes diabéticos com normoalbuminúria ⁶³. Além disso, Gunduz et al. (2005) ⁶⁰ e Wolf et al. (1999) ⁵⁵ demonstraram aumento da proteinúria na hiperleptinemia crônica. O mecanismo pelo qual a leptina induz proteinúria ainda não foi elucidado, porém este processo parece ser dependente do aumento da expressão de TGF- β 1, que reduz a endocitose de albumina no túbulo proximal ^{64; 65}.

Assim, alguns dos efeitos que a leptina exerce sobre os rins e que contribuem para a patofisiologia renal estão sumarizados na **Figura 3**.

Figura 3 - Efeitos que a leptina exerce sobre os rins.

FONTE: (Wolf G, 2002) ¹¹

Estudos apontam para uma possível resistência renal à leptina ^{52; 66}. Os mecanismos envolvidos na resistência renal à leptina na obesidade e hipertensão ainda não foram completamente definidos. Porém, devem incluir: (a) diminuição na expressão do receptor de leptina ⁴⁴, (b) alterações na sinalização do receptor de leptina ¹⁷, (c) degradação excessiva de NO ⁶⁷ e (d) aumento na ativação do sistema nervoso simpático ⁶⁸. De fato, estudos com camundongos C57BL/6J induzidos à obesidade por dieta, demonstraram uma resistência seletiva à leptina, com manutenção da resposta simpática renal, o que poderia estar associado ao aumento da pressão arterial neste modelo ⁶⁹. Os efeitos renais poderiam incluir: (a) redução do fluxo plasmático renal e do ritmo de filtração glomerular (b) vasoconstrição renal, (c) aumento na liberação de renina, levando ao aumento na produção de angiotensina II (Ang II), (d) aumento da reabsorção tubular de sódio ⁷⁰.

Assim, a ação da leptina no sistema nervoso central, levando à ativação do sistema nervoso simpático, promove a ativação de outro sistema importante para o controle cardiovascular e renal: o sistema renina-angiotensina (SRA) ^{44; 71}.

1.7 Sistema renina-angiotensina

Desde a sua descoberta em 1898 por Tigerstedt e Bergman, o SRA foi largamente estudado. Na cascata de sinalização sistêmica clássica, as células justaglomerulares secretam renina para a circulação, que cliva o angiotensinogênio proveniente principalmente do fígado,

em Angiotensina I (Ang I). Esta, por sua vez, é clivada pela enzima conversora da Ang I (ECA), formando a Angiotensina II (Ang II). A Ang II atua via dois receptores, AT₁ e AT₂, expressos em vários tecidos. A ativação do receptor AT₁ desencadeia as respostas mais clássicas da Ang II como: vasoconstrição, liberação de aldosterona pela zona glomerulosa da glândula adrenal, retenção de sódio por diversos segmentos do néfron e estimulação do sistema nervoso simpático (via receptores cerebrais) ⁷².

Além dos componentes clássicos do SRA, diversos outros foram descobertos ao longo dos anos. Uma enzima homóloga à ECA, a ECA2, está envolvida na clivagem de Ang II e formação de Ang-(1-7). O grupo de Santos RA descobriu que o proto-oncogene *Mas* é um receptor para este peptídeo e que o eixo ECA2-Ang-(1-7)-Mas parece contrabalancear os efeitos cardiovasculares e renais do SRA clássico ⁷³. Mais recentemente, uma nova proteína, o receptor de pro-renina, (P)RR foi descoberto e este tem uma função ativadora de renina e independente de Ang II ⁷⁴. O papel fisiológico destes novos componentes do SRA ainda não foi completamente desvendado, mas provavelmente exercem um impacto importante sobre a ação do SRA clássico ⁷².

Diversos estudos têm demonstrado a presença e a importância de SRA locais, em diversos tecidos como coração, tecido adiposo, glândulas adrenais, vasculatura, sistema nervoso central e rins. A ativação do SRA intrarenal contribui para a hipertensão arterial e a progressão da lesão renal em doenças renais crônicas e na obesidade ⁷⁵. De fato, a concentração de Ang II na luz do túbulo proximal é cerca de 1000 vezes maior do que a sua concentração plasmática ⁷⁶, indicando uma atividade da ECA local. Porém, apesar de evidências sólidas da presença de uma SRA intratubular, evidências funcionais de um SRA intraglomerular ainda não foram completamente elucidadas.

As células mesangiais expressam todos os componentes do SRA e são capazes de gerar Ang II localmente, ou seja, expressam RNAm para angiotensinogênio, ECA, renina e receptores de Ang II ⁷⁷. As células mesangiais em cultura são capazes de sintetizar, estocar e secretar pró-renina e renina ⁷⁸.

Diversos estudos demonstraram a presença dos componentes do SRA também em podócitos. Liebau e colaboradores em 2006 demonstraram que podócitos humanos diferenciados em cultura expressam RNAm para angiotensinogênio, renina e ECA ⁷⁹. Em cultura de podócitos diferenciados provenientes de camundongos há expressão predominante de receptores do tipo AT₁ (cerca de 75%) e menor expressão de receptores do tipo AT₂ (cerca de 25%) ⁸⁰.

1.8 Interações entre leptina e SRA

O controle da ingestão de alimentos e da pressão arterial envolvem sistemas altamente complexos, que integram sinais centrais e periféricos, alguns dos quais podem afetar ambas a homeostase energética e a pressão arterial. O SRA é um importante controlador da pressão arterial e inúmeros estudos sugerem seu envolvimento na hipertensão associada à obesidade^{81; 82}.

Além disso, há evidências de uma ação periférica conjugada com a leptina, apesar dos efeitos da leptina sobre o SRA ainda não terem sido completamente elucidados. Sabe-se que a atividade da renina plasmática está significativamente aumentada na maioria dos obesos⁸³ e que a obesidade está também associada com a ativação da ECA renal⁸⁴. Shek et al. (1998)⁵⁹ relataram que em altas doses, a leptina não altera a atividade da renina plasmática, porém os níveis de corticosterona e aldosterona tendem a diminuir. Já os estudos de Wolf et al. (1999)⁵⁵ sugeriram que a Ang II e a leptina exercem efeitos aditivos sobre a proliferação de células endoteliais glomerulares. Além disso, Gunduz et al. (2005) foram os primeiros a demonstrar que o TGF- β 1 desempenha um importante papel na nefropatia induzida por leptina e que o SRA participa desse processo (Gunduz et al., 2005).

Tem sido demonstrado que o tecido adiposo é capaz de produzir todos os componentes do SRA, incluindo o angiotensinogênio⁸⁵, enzima conversora de Angiotensina I (ECA)^{86; 87} e o receptor AT₁⁸⁸. A produção local de Ang II pode diretamente aumentar a liberação de leptina pelos adipócitos⁸⁹.

Há evidências crescentes da presença de receptores de leptina e Ang II em regiões cerebrais essenciais para o controle cardiovascular e metabólico. Por exemplo, há receptores AT₁ na região do núcleo arqueado⁹⁰, uma região predominante da ação de leptina. Também há evidências da presença de receptores Ob-Rb no órgão subfornical (SFO)^{91; 92} e núcleo do trato solitário (NTS)^{93; 49}, que estão intimamente relacionadas à sinalização de Ang II no controle cardiovascular. Além disso, o SRA cerebral facilita a atividade simpática para o tecido adiposo marrom e para os rins, o que contribui para a ativação do SRA sistêmico e intrarenal.

2 OBJETIVOS

2.1 Justificativa

A identificação do gene da leptina em 1994 iniciou uma nova era nos estudos relacionados à obesidade e também contribuiu para o conhecimento de complicações cardiovasculares associadas. Muitos trabalhos sugerem o envolvimento da leptina na regulação da pressão arterial, porém os mecanismos envolvidos ainda não foram elucidados. Alguns trabalhos sugerem uma regulação sinérgica entre leptina, SRA e células endoteliais na patogenia da obesidade ^{47; 84}.

A patogenia da obesidade associada à hipertensão arterial é multifatorial, porém como ocorre em outras formas de hipertensão, uma vasoconstrição excessiva e uma anormal retenção de sódio pelos rins desempenham um importante papel no desenvolvimento da doença ². Essas anormalidades resultam de um desequilíbrio entre os sistemas neuro-humorais que induzem vasoconstrição e retenção de sódio como o SNS, SRA e os fatores vasodilatadores e natriuréticos como o NO e o ANP ³. Os rins recebem cerca de 20% do débito cardíaco, além de desempenharem um importante papel no controle da função cardiovascular e pressão arterial. Porém, os rins também exercem um importante papel endócrino, sendo capazes de sintetizar diversos hormônios e compostos vasoativos como: Ang II, endotelinas, prostaglandinas e NO. Estudos apontam para uma possível participação do SRA na hipertensão associada à obesidade e hiperleptinemia crônica ^{60; 84}.

Apesar de existirem modelos animais de obesidade, como os camundongos *ob/ob* ou *db/db*, a obesidade humana devido a mutações no gene da leptina ou no seu receptor são muito raras ⁹⁴. A obesidade em humanos está associada a níveis elevados de leptina e resistência ao hormônio. A administração de leptina em animais não-obesos pode mimetizar um estado hiperleptinêmico, como o encontrado na obesidade.

2.2 Objetivo geral

Considerando as observações apresentadas até o momento, o **objetivo geral** deste estudo foi avaliar os efeitos da hiperleptinemia induzida sobre: a função renal, a expressão de RNAm e componentes do SRA no tecido renal e a histomorfologia renal de ratos tratados com leptina por 7 e 28 dias. Além disso, avaliamos a participação do SRA nesse processo, através do tratamento dos animais com Losartan (antagonista do receptor AT₁).

2.3 Abordagem experimental

As abordagens experimentais utilizadas foram:

- monitorar alterações na ingestão alimentar e ganho de peso dos animais;
- monitorar as alterações na pressão arterial;
- avaliar os níveis plasmáticos de leptina;
- avaliar a função renal: fluxo plasmático renal, ritmo de filtração glomerular e fluxo urinário;
- avaliar a carga filtrada, a carga excretada e a fração de excreção de Na^+ e K^+ ;
- avaliar parâmetros do equilíbrio ácido-base: carga excretada de amônio, pH urinário e plasmático;
- analisar alterações na histomorfologia renal;
- analisar a expressão de desmina (marcador de injúria glomerular) e ED-1 (marcador da infiltração de macrófagos no tecido; apenas para o grupo de animais tratados por 28 dias);
- avaliar a proteinúria;
- analisar a expressão do RNAm dos genes: renina, angiotensinogênio, ECA1 e GADPH (gene “housekeeping”, para normalização da expressão dos demais genes) no tecido renal dos animais tratados por 28 dias.

O objetivo específico para os estudos *in vitro* foi:

- avaliar a apoptose de células mesangiais tratadas com leptina (10, 100 e 250 ng/ml) por 24, 48 e 72 horas.

Com esses estudos esperamos contribuir para o esclarecimento das alterações renais em ratos com hiperleptinemia induzida e elucidar a participação dos rins na hipertensão associada à hiperleptinemia e/ou à resistência a leptina. O esclarecimento desses processos nos permitirá, futuramente, a busca de tratamentos farmacológicos adequados para corrigir os danos que a hiperleptinemia gera sobre os rins.

Além disso, consideramos que os estudos *in vitro* da ação da leptina sobre a apoptose e ativação do SRA (estudos ainda não realizados) em células mesangiais serão de grande importância para compreendermos como a hiperleptinemia pode afetar a função e morfologia de diferentes células glomerulares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados 100 ratos Wistar com idade 50 dias, adquiridos no biotério de criação e mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições de controle da temperatura e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso à água e à alimentação. Todos os protocolos apresentados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) (Protocolo nº150/09) e estão de acordo com os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

A opção por ratos Wistar se deve à necessidade de animais cujo peso nos possibilite maior segurança nos experimentos de função renal. Além disso, há uma extensa literatura sobre a utilização desses animais como modelo para a investigação científica da associação entre a resistência a leptina e obesidade^{24; 49; 52; 58; 60; 68; 95 - 104}.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram randomicamente distribuídos em 4 grupos experimentais (n= 5 - 8 animais por grupo), para cada tempo de tratamento (7 e 28 dias): Sham, Losartan, Leptina e Leptina + Losartan.

3.3 Obtenção dos modelos experimentais

3.3.1 Indução de hiperleptinemia

Os animais foram anestesiados com Ketamina, Xilazina e Acetopromazina (Virbac, Carros, França) nas doses: 64,9; 3,20 e 0,78 mg/kg de peso corporal, respectivamente, por via intramuscular. Após a perda completa dos reflexos de dor, uma pequena incisão subcutânea foi feita no dorso dos animais e uma mini-bomba osmótica (Alzet, Cupertino, EUA) foi implantada.

Os animais que foram tratados por 7 dias receberam uma dose diária de 0.5 mg/kg de leptina (R&D systems, Minneapolis, EUA) através da bomba osmótica modelo 2ML1, que libera 10 ± 0.01 µl/hora. Já os animais que foram tratados por 28 dias receberam uma dose diária de 0.25 mg/kg de leptina, através da bomba osmótica modelo 2ML4, que libera $2.5 \pm$

0.01 µl/hora. Foram realizados experimentos nestes dois períodos de tratamento para verificarmos se ocorria progressão nas alterações de pressão arterial, função renal e morfologia renal na hiperleptinemia experimental.

Todos os animais submetidos ao processo cirúrgico com o implante de bombas osmóticas tiveram seu grupo controle correspondente, submetido à cirurgia fictícia (animais do grupo Sham). Neste grupo, foi realizada a incisão no dorso dos animais, foi aberto o mesmo espaço subcutâneo para a inserção de bomba osmótica, no entanto a mesma não foi implantada.

3.3.2 Tratamento com Losartan

Os animais tratados com Losartan (Tocris, Bristol, Reino Unido) na dose de 10mg/kg/dia¹⁰⁵ por 7 dias foram submetidos à injeção subcutânea diária da droga diluída em salina, enquanto que os animais tratados com Losartan por 28 dias foram submetidos ao implante de uma segunda mini-bomba osmótica (modelo 2004, liberação de 0.25 ± 0.01 µl/hora), sendo o tratamento com a mesma dose do grupo de 7 dias.

3.4 Avaliação da ingestão alimentar e do ganho de peso

Após a inserção da mini-bomba osmótica ou cirurgia fictícia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e a sua ingestão alimentar foi controlada. A ração foi pesada para avaliação da ingestão alimentar diária, em gramas/dia.

Os animais também tiveram o seu peso corporal monitorado antes e após o período de tratamento no grupo de 7 dias e semanalmente no grupo de 28 dias. O ganho de peso calculado através da fórmula:

$$\text{ganho de peso} = (\text{peso do inicial} - \text{peso final})/(\text{peso inicial}) \text{ (1)}$$

onde os pesos são em gramas.

Assim levamos em consideração o ganho de peso de acordo com o peso inicial dos animais. É importante ressaltar, no entanto, que realizamos os experimentos com os animais na mesma idade e faixa de peso corporal.

3.5 Medidas de pressão arterial por pletismografia de cauda

Com a finalidade de se monitorar a evolução dos níveis pressóricos nos diferentes grupos experimentais, os valores de pressão arterial foram avaliados em animais acordados, de maneira indireta, pela técnica de pletismografia de cauda (LE 5001, Panlab S.I. Barcelona, Espanha), antes e após o tratamento em animais tratados por 7 dias e semanalmente em animais tratados por 28 dias. Os valores de pressão arterial de cauda obtida para cada animal foram apresentados como média aritmética de 10 a 15 medidas coletadas por animal, após estabilização do animal no contensor.

A pressão arterial não é avaliada diretamente na carótida dos animais, pois o animal é manipulado por diversas vezes durante o experimento de clearance renal. Além disso, a duração do experimento de clearance renal é de cerca de 4 horas, o que dificultaria ainda mais a manutenção da sedação dos animais por períodos mais prolongados.

3.6 Ensaio enzimático para determinação da concentração plasmática de leptina

Foi realizada a quantificação de leptina no plasma utilizando-se kit comercial (Phoenix Pharmaceuticals Inc, Burlingame, EUA), pelo método de ensaio imunoenzimático. A amostra de plasma foi obtida através da centrifugação por 10.000 rpm, por 10 minutos, de uma amostra de sangue arterial. A amostra foi retirada antes do início do experimento de clearance renal (descrito a seguir).

3.7 Clearance renal

Ao final dos tratamentos, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de Zoletil (tiletamida + zolazepam) (Virbac, Carros, França) e Xilazina (Virbac) nas doses de 50 e 5 mg/kg de peso, respectivamente, sendo que doses adicionais foram administradas durante o procedimento, quando necessário. Após a perda completa dos reflexos de dor, a traqueia foi canulada com cateter de polietileno PE 260, para manutenção da ventilação adequada do animal.

Em seguida, a artéria carótida direita e a veia jugular esquerda foram canuladas com cateter de polietileno PE 50 heparinizado (Hemofol, Cristália, Itapira, Brasil) para coleta de sangue e infusão de diferentes soluções, respectivamente. No início do experimento, os animais receberam infusão endovenosa contínua de solução 0,9% de NaCl e 3% de manitol à

velocidade constante de 100 µl/min, por 30 minutos, utilizando-se uma bomba infusora (Harvard Instruments, Holliston, EUA). Após este período, uma dose inicial (“primer”), no volume de 1 ml, contendo inulina (90 mg por animal) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e ácido para-amino-hipúrico (PAH; 2 mg por animal) (Sigma Aldrich) foi administrada, em bôlus. A manutenção foi feita pela infusão contínua de inulina (15 mg/ml) e PAH (4 mg/ml) por todo o experimento.

A bexiga urinária foi canulada com sonda vesical de polietileno PE 260 através da qual, amostras de urina foram coletadas para posterior análise.

Foram realizadas 4 coletas de sangue e urina, em intervalos de 30 minutos, sendo a primeira iniciada após 30 minutos de infusão de inulina + PAH.

O fluxo urinário foi mensurado para cálculo do fluxo urinário (V), através da fórmula:

$$V = (\text{volume} / \text{tempo} / \text{peso}) \text{ (2)}$$

onde volume é o volume de urina coletado em ml, tempo é o tempo da coleta em minutos e peso é o peso do animal em kg.

3.8 Perfusão renal

Após o experimento de clearance renal, os animais receberam uma dose letal de anestésico Zoletil (eutanásia) e foram submetidos à perfusão aórtica com tampão fosfato (PBS: 0.15 M NaCl, 0.01 M, pH 7.4), por 10 minutos (velocidade de perfusão: 20 ml/min), até que os rins estivessem limpos.

A artéria e veia renais do rim direito foram amarradas com fio de algodão e o rim foi retirado para análises posteriores de expressão gênica. O rim esquerdo foi submetido à perfusão com solução de formalina tamponada 4% (10% volume de Formaldeído 40%, 0.034 M NaH₂PO₄, 0.045 M Na₂HPO₄), por 10 minutos (velocidade de perfusão: 20 ml/min). Em seguida, o rim foi removido e seccionado transversalmente. O tecido foi fixado por mais 24 horas em formalina tamponada a 4% e então foi transferido para álcool 70%. Posteriormente, o tecido foi encaminhado para o Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da USP para impregnação com parafina e preparação de cortes histológicos com espessura de 3-4 µm.

3.9 Parâmetros renais e plasmáticos

As osmolalidades da urina e do plasma foram avaliadas utilizando-se um osmômetro (Micro Osmometer, Precision Systems, Natick, EUA). O pH das amostras foi medido utilizando pHmetro (ABL 5, Rodimeter, Copenhagen, Dinamarca). Os níveis de Na^+ e K^+ na urina e no plasma foram avaliados por meio do fotômetro de chama (B462, Micronal, São Paulo, Brasil).

A carga filtrada (CF; em mEq/min/kg) dos íons Na^+ e K^+ foi calculada através da fórmula:

$$\text{CF}_x = P_x \cdot \text{RFG} \quad (3)$$

onde P_x é a concentração do íon no plasma e RFG é o ritmo de filtração glomerular.

A carga excretada (CE; em mEq/min/kg) foi calculada pela fórmula:

$$\text{CE}_x = U_x \cdot V \quad (4)$$

onde U_x é a concentração do íon na urina e V é o fluxo urinário.

Já a fração de excreção (FE; em %) dos íons foi calculada através da fórmula:

$$\text{FE}_x = \text{CF}_x / \text{CE}_x \quad (5)$$

onde CF_x é a carga filtrada do íon e CE_x é a carga excretada do mesmo íon.

3.10 Avaliação da função renal

As concentrações de inulina e PAH no plasma e na urina foram avaliadas por espectrofotometria colorimétrica. Para calcularmos o clearance (C_x) dessas substâncias, utilizamos a equação:

$$C_x = (U_x \cdot V) / P_x \quad (6)$$

onde U_x é a concentração de inulina ou PAH na urina, V é o fluxo urinário e P_x é a concentração de inulina ou PAH no plasma.

Para avaliar o ritmo de filtração glomerular (RFG; em ml/min/kg), utilizamos os dados obtidos com o clearance de inulina (análise através do método de antrona, conforme descrito por Fuhr et al., 1945)¹⁰⁶. A inulina é um polímero de frutose e não se liga à proteínas plasmáticas. Ela é livremente filtrada nos glomérulos e não é nem reabsorvida nem secretada, sendo portanto a sua filtração igual à sua excreção.

Já os valores de fluxo plasmático renal (FPR; em ml/min/kg) foram obtidos através do clearance do PAH (determinação pela reação com N-Naftil (Química Especializada Erich, São Paulo, Brasil), conforme demonstrado por Smith et al. (1955)¹⁰⁷. O PAH é livremente filtrado e secretado nos túbulos, sendo portanto, uma substância totalmente eliminada pelos rins.

A relação entre o RFG e o FPR define o parâmetro de fração de filtração (FF, em %), que é o volume de filtrado formado para um volume de plasma que passou pelos glomérulos. A fração de filtração foi calculada através da fórmula:

$$FF = RFG / FPR \text{ (7)}$$

onde RFG é o ritmos de filtração glomerular e FPR o fluxo plasmático renal.

3.11 Histoquímica

Os cortes longitudinais obtidos foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE), para análise da morfologia renal. As áreas glomerulares foram avaliadas por morfometria, em 5 animais de cada grupo, em um microscópio de luz acoplado a uma câmara de vídeo e a um analisador de imagens (Eclipse 80i, Nikon, Tóquio, Japão). 60 glomérulos por animal foram circulares manualmente e o *software* NIS-Elements (Nikon) forneceu os respectivos valores das áreas glomerulares.

3.12 Imuno-histoquímica

Cortes longitudinais de 3-4 µm embebidos em parafina foram desparafinizados em xilol, re-hidratados em álcool (100%, 90% e 75%) e então submetidos à marcação por imuno-histoquímica. A recuperação antigênica foi realizada através do aquecimento a 100 °C, por 20 minutos, em tampão Tris-EDTA+Tween (pH 9,0), seguido pelo resfriamento em água destilada, por 20 minutos. Após, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução

de peróxido de hidrogênio a 3%. Para todos os passos seguintes, as lâminas, contendo os cortes, foram incubadas com 50 µl das soluções, em câmara úmida e escura. Primeiramente, as ligações de proteínas não específicas foram bloqueadas pela incubação com soro de cabra 20% em albumina 1%, por 30 minutos. Os cortes foram então incubados *overnight* a 4 °C com anticorpo primário específico para desmina (1:500; Abcam, EUA) ou ED-1 (1:50; AbD Serotec, Oxford, Reino Unido). No dia seguinte, os cortes foram lavados 2 vezes de 5 minutos em TBS-T (tampão Tris-Base contendo 0.025% Triton X-100) e então incubados com o anticorpo secundário anti-rabbit (1:200). Após a lavagem, conforme descrito acima, o produto da reação foi detectado com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, EUA). A reação de coloração foi desenvolvida com 3.3-diaminobenzidine (Sigma Aldrich) suplementada com de peróxido de hidrogênio 0.3% (Merck, Whitehouse Station, EUA). O material foi contra-corado com o corante Methylgreen (Amresco, Ohio, EUA) e desidratado em álcool (75%, 90% e 100%) e xilol. As lâminas foram montadas com Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA).

O material foi analisado em um microscópio de luz acoplado a uma câmera de vídeo e a um analisador de imagens (Eclipse 80i, Nikon). Para as marcações de desmina, foram analisados, qualitativamente, 20 glomérulos de cada animal. Para a quantificação de ED-1, foi realizada a contagem das células ED-1 positivas de 50 campos por lâmina, de cada animal.

3.13 Marcação de prata para análise de proteinúria

Amostras de urina do clearance foram analisadas utilizando-se o kit comercial ProteoSilver Plus Silver Stain Kit (Sigma Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. O kit contém nitrato de prata, que se liga a determinados aminoácidos das proteínas em condições específicas de pH. Volumes iguais de amostras de urina (concentração total de proteínas em cada amostra) foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10% e a eletroforese foi realizada a 100 V. Após a corrida, o gel foi fixado *overnight* em uma mistura de etanol/água/ácido acético glacial (50:40:10). No dia seguinte o gel foi exposto a uma solução sensibilizadora, depois a uma solução de prata e finalmente as bandas foram reveladas com uma solução de revelação.

A análise dos resultados foi realizada através da quantificação das bandas por densitometria ótica, utilizando o programa ScionImage (Scion Corporation, Frederick, USA).

3.14 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

3.14.1 *Extração do RNA total*

As amostras de tecido renal total foram homogeneizadas em nitrogênio líquido e então ressuspensas em 1 ml de TRIzol LS Reagent (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Em seguida, o homogeneizado foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. O RNA total foi extraído em mini-colunas do kit RNeasy Plus (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Neste processo, as amostras são passadas também por uma coluna que retém DNA genômico, assegurando maior pureza do RNA extraído.

3.14.2 *Síntese do cDNA a partir do RNAm*

Para a síntese de cDNA à partir do RNAm (RT-PCR) extraído foi utilizado o kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Foster City, EUA) e termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), de acordo com o protocolo do produto, partindo-se de uma concentração inicial de 500 ng de RNA.

3.14.3 *Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase em tempo real*

O cDNA (20 ng) obtido no RT-PCR foi utilizado na análise de expressão gênica através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Na seleção das sondas, foram selecionadas aquelas que amplificam junções exônicas, a fim de reduzir ainda mais o impacto de contaminação por DNA genômico. Sendo assim, foram sempre escolhidas as sondas "*Best Coverage*". As sondas utilizadas foram:

- Angiotensinogênio: Rn00593114_m1;
- Renina: Rn00561847_m1;
- Enzima Conversora de Ang I (ACE): Rn00561094_m1;
- GAPDH: Rn01775763_g1.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados pelo *software* StepOne versão 2.1 (Applied Biosystems), seguidos pela análise estatística no *software* GraphPad Prism (San Diego, EUA).

A semelhança das eficiências de amplificação das sondas (próximo a 100%) permite a utilização do modelo matemático $\Delta\Delta CT$ para o cálculo das diferenças de expressão entre os genes alvo e endógeno. Assim, os resultados são apresentados na forma de *fold change*, ou seja, aumento ou diminuição da expressão em relação ao grupo Sham.

3.15 Cultura celular de células mesangiais de camundongos

As células mesangiais imortalizadas de camundongos (gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Mirian Boim, Universidade Federal de São Paulo) foram cultivadas em recipientes de plástico próprios para cultura e mantidas em meio de cultura D-MEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium, Gibco, Grand Island, EUA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil), 100 IU/mL penicillina (Gibco), 100 µg/mL streptomicina (Gibco) e 2 mmol/L L-glutamine (Gibco), pH 7.4. As células foram mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. Para remover as células da parede do recipiente de cultura foi utilizada tripsina-EDTA 0.05% (Gibco).

3.16 Ensaio de apoptose (*in vitro*)

As células mesangiais foram cultivadas e após cerca de 70% de confluência, foram tratadas com leptina nas concentrações de 10, 100 ou 250 ng/ml por 24, 48 ou 72 horas^{55; 56}. Foi realizado ensaio de apoptose, utilizando o kit Cell Death Detection ELISA Plus (Roche, Mannheim, Alemanha). Os resultados foram apresentados como porcentagem do respectivo grupo Controle.

3.17 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via, completamente randomizada, seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni, realizados a partir do programa GraphPad Prism Software. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram apresentados como um valor médio $\pm$ erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Animais tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias

4.1.1 Ingestão alimentar e ganho de peso

Conforme pode ser observado na **Tabela 1**, o tratamento com leptina por 7 dias levou a uma queda, não significativa, na ingestão alimentar diária de ração. No entanto, no grupo tratado apenas com leptina houve uma significativa diminuição no ganho de peso. O tratamento apenas com Losartan não alterou nenhum desses parâmetros em relação aos animais do grupo Sham, já o co-tratamento com leptina + Losartan, reverteu o efeito de queda no ganho de peso dos animais.

Tabela 1 - Ingestão alimentar e o ganho de peso de animais tratados por 7 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
Ingestão alimentar diária	20,64 ± 0,89	20,00 ± 1,18	17,30 ± 1,14	19,81 ± 1,02
Ganho de peso	17,33 ± 1,90	16,15 ± 1,16	3,62 ± 1,17*	10,71 ± 1,88* [#]

Ingestão alimentar diária em g; ganho de peso em %; *p< 0.05 *versus* Sham; [#]p <0.05 *versus* Leptina.

4.1.2 Pressão arterial

A medida de pressão arterial por pletismografia de cauda foi realizada com os animais acordados, antes do início do tratamento e no último dia de tratamento. Os resultados indicam que a PA inicial de todos os grupos estudados era semelhante. No entanto, o tratamento com leptina por 7 dias induziu um aumento significativo na PA final, em relação ao grupo Sham. O grupo Leptina + Losartan teve a pressão arterial normalizada (**Tabela 2**). Os valores de delta de PA negativos encontrados nos grupos Sham, Losartan e Leptina + Losartan são considerados normais, visto que na última medida de pressão arterial os animais já estão mais aclimatados ao experimento e à contensão no equipamento. Os valores de delta de PA positivos no grupo Leptina reforçam o aumento de PA observado.

Tabela 2 - Pressão arterial sistólica (PAS) de animais tratados por 7 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
PAS inicial	107 ± 0,5	1080 ± 0,9	105 ± 0,6	106 ± 0,3
PAS final	106 ± 0,7	106 ± 1,1	118 ± 1,5 [*]	103 ± 0,7 [#]
Δ da PAS	-1,3 ± 0,7	-2,3 ± 0,4	+12,5 ± 1,2 [*]	-2,2 ± 0,7 [#]

PAS em mmHg; ^{*}p< 0.05 *versus* Sham; [#]p< 0.05 *versus* Leptina

4.1.3 Concentração plasmática de leptina

As análises da concentração plasmática de leptina demonstram que os animais tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias apresentam uma maior concentração deste hormônio no plasma (Sham: 1433 ± 191 ; Losartan: 1721 ± 159 ; Leptina: $4083 \pm 634^*$; Leptina + Losartan: $3518 \pm 258^{\$}$) (**Figura 4**).

Figura 4 - Concentração plasmática de leptina em animais tratados por 7 dias.

Concentração plasmática de leptina (em pg/ml) em animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias (n=5 por grupo). * $p < 0.05$ versus Sham; \$ $p < 0.05$ versus Losartan.

4.1.4 Hemodinâmica renal

Para todos os resultados a seguir foram coletadas 4 amostras de sangue e urina por animal (n=6 por grupo).

O tratamento com leptina por 7 dias induziu uma queda, não estatisticamente significativo, porém de 23% no FPR, conforme **Figura 5 e Tabela 3**.

Figura 5 - Fluxo plasmático renal de animais tratados por 7 dias.

Fluxo plasmático renal (FPR, em ml/min/kg) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias.

O tratamento com leptina por 7 dias também não alterou significativamente o RFG, como pode ser observado na **Figura 6** e **Tabela 3**. O aumento observado no grupo Leptina, foi de 11,5%.

Figura 6 - Ritmo de filtração glomerular de animais tratados por 7 dias.

Ritmo de filtração glomerular (RFG, em ml/min/kg) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias.

A queda no FPR associada ao pequeno aumento no RFG levou a um significativo aumento na FF de animais tratados com leptina, conforme demonstrado na **Figura 7** e **Tabela 3**. O grupo Leptina + Losartan teve este parâmetro normalizado.

Figura 7 - Fração de filtração de animais tratados por 7 dias.

Fração de Filtração (em %) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias.
*p < 0.05 *versus* Sham; #p < 0.05 *versus* Leptina.

Tabela 3 - Hemodinâmica renal de animais tratados por 7 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
FPR	20,48 ± 0,77	17,96 ± 2,21	15,79 ± 1,02	18,99 ± 1,54
RFG	8,24 ± 0,36	7,46 ± 0,61	9,19 ± 0,59	6,98 ± 0,52
FF	40,59 ± 1,83	45,54 ± 4,27	59,09 ± 2,46*	34,42 ± 3,06#

FPR e RFG em ml/min/kg; FF em %; *p < 0.05 *versus* Sham; #p < 0.05 *versus* Leptina

4.1.5 Função tubular

O grupo tratado com leptina apresentou um significativo aumento no fluxo urinário, que foi corrigido no grupo Leptina + Losartan, conforme pode ser observado na **Figura 8** e **Tabela 4**.

Figura 8 - Fluxo urinário de animais tratados por 7 dias.

Fluxo urinário (em ml/min/kg) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias.
* $p < 0.05$ versus Sham; # $p < 0.05$ versus Leptina.

A carga filtrada de Na^+ (CF Na^+) não foi alterada pelos tratamentos. No entanto, a carga excretada de Na^+ (CE Na^+) foi significativamente aumentada no grupo Leptina em relação ao grupo Sham e normalizada no grupo Leptina + Losartan, como pode ser observado na **Tabela 4**. A fração de excreção de Na^+ aumentou significativamente no grupo tratado com leptina, como pode ser observado na **Figura 9A** e **Tabela 4**. Acompanhando a normalização de todos os parâmetros da função tubular, a FE Na^+ no grupo Leptina + Losartan também voltou ao seu valor basal.

Já em relação ao K^+ nenhum dos parâmetros (CF K^+ , CE K^+ e FE K^+) foi modificado pelos tratamentos (**Tabela 4** e **Figura 9B**).

Tabela 4. Função tubular de animais tratados por 7 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
V	0,18 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,25 ± 0,02 [*]	0,22 ± 0,01 [#]
CF Na⁺	1337 ± 129	1263 ± 180	1283 ± 108	951 ± 144
CE Na⁺	9,49 ± 2,42	8,05 ± 1,08	19,20 ± 1,58 [*]	6,54 ± 0,62 [#]
FE Na⁺	0,68 ± 0,13	0,69 ± 0,16	1,53 ± 0,18 [*]	0,71 ± 0,07 [#]
CF K⁺	37,59 ± 7,29	24,91 ± 3,54	31,56 ± 3,99	20,00 ± 3,04
CE K⁺	9,95 ± 1,24	10,32 ± 1,18	9,65 ± 1,41	7,65 ± 0,92
FE K⁺	24,74 ± 4,87	43,06 ± 6,24	31,00 ± 3,24	39,25 ± 3,79

V em ml/min/kg; CF e CE em mEq/ml/min/kg, FE em %; ^{*}p< 0.05 *versus* Sham; [#]p< 0.05 *versus* Leptina.

Figura 9 - Fração de excreção de Na⁺ e K⁺ de animais tratados por 7 dias.

Fração de excreção de Na⁺ (**A**) e K⁺ (**B**) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias. ^{*}p<0.05 *versus* Sham; [#]p< 0.05 *versus* Leptina.

4.1.6 Parâmetros do equilíbrio ácido-base e osmolalidade

O tratamento com leptina por 7 dias não alterou parâmetros como carga excretada do íon amônio (NH_4^+), osmolalidade da urina, pH do plasma e da urina e HCO_3^- do plasma, como pode ser observado na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Parâmetros do equilíbrio ácido-base e osmolalidade de animais tratados por 7 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
Excreção de NH_4^+	1,48 ± 0,13	1,58 ± 0,13	1,35 ± 0,13	1,78 ± 0,13
pH da urina	6,19 ± 0,14	6,69 ± 0,07	6,10 ± 0,12	6,66 ± 0,17
Osmolalidade da urina	583,20 ± 56,96	625,60 ± 22,35	563,40 ± 31,71	545,00 ± 45,25
pH do plasma	7,29 ± 0,03	7,23 ± 0,02	7,28 ± 0,03	7,29 ± 0,01
HCO_3^- do plasma	20,60 ± 1,54	19,20 ± 0,49	22,57 ± 1,06	21,20 ± 0,20

Excreção de NH_4^+ em mEq/ml/min/kg; osmolalidade em mOsm/kg H_2O , HCO_3^- do plasma em mmol/l.

4.1.7 Morfologia renal

A análise morfológica, realizada em cortes histológicos (3-4 μm) corados com hematoxilina-eosina, demonstrou que o tratamento com leptina por 7 dias levou a alterações na morfologia renal. A aérea intersticial está preservada em todos os grupos estudados, no entanto houve um aumento da área glomerular (glomérulos indicados por setas pretas) nos animais tratados com leptina em relação aos animais Sham (em μm^2 ; Sham: 6708 ± 62, Losartan: 6779 ± 23, Leptina: 7796 ± 130^{*}; ^{*}p<0.05 *versus* Sham). Este parâmetro foi normalizado nos animais do grupo Leptina + Losartan (6822 ± 20[#]; [#]p<0.05 *versus* Leptina), conforme podemos observar nas imagens histológicas (**Figura 10 A a D**) e na análise estatística (**Figura 10 E**). Para as análises de área glomerular, foram calculadas as áreas de 50 glomérulos de 5 animais de cada grupo.

Figura 10 - Morfologia renal de animais tratados por 7 dias.

Cortes histológicos (3-4 μm) de rins corados com hematoxilina-eosina, de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias (A-D). Quantificação da área glomerular em 50 glomérulos por animal (E). * $p < 0.05$ versus Sham; # $p < 0.05$ versus Leptina. Aumento de 200 X, barra = 100 μm .

4.1.8 Expressão de desmina

Estudos de imuno-histoquímica em lâminas parafinizadas e silanizadas demonstraram que o tratamento com leptina por 7 dias aumentou, qualitativamente, a expressão da proteína glomerular desmina (indicação com setas pretas) (**Figura 11**). Esta proteína tem sua expressão aumentada em glomérulos com injúria ¹⁰⁸.

Figura 11 - Expressão glomerular de desmina em animais tratados por 7 dias.

Imuno-histoquímica para proteína desmina em cortes histológicos (3-4 μm) de rim de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 7 dias. As setas indicam a marcação de desmina nos glomérulos; aumento de 200 X, barra = 100μm.

4.1.9 Albuminúria

Os resultados de excreção de proteína dos animais tratados por 7 dias demonstraram uma intensa albuminúria nos animais do grupo Leptina (Leptina: $26728 \pm 1279^*$; $p < 0.05$ *versus* Sham: 2819 ± 1229 e Losartan: 2498 ± 926 em unidades arbitrárias) e uma melhora nos animais do grupo Leptina + Losartan (Leptina + Losartan: $9623 \pm 3629^\#$; $p < 0.05$ *versus* Leptina) (**Figura 12**).

B

Figura 12 - Albuminúria de animais tratados por 7 dias.

Experimento representativo da corrida de amostras de urina de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan em gel de acrilamida 10%, seguido da marcação de proteínas com prata (**A**). Análise densitométrica das bandas (**B**). Controle: albumina (BSA; 69 kDa); $^*p < 0.05$ *versus* Sham; $^\#p < 0.05$ *versus* Leptina.

4.2 Animais tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias

4.2.1 Ingestão alimentar e ganho de peso

Conforme pode ser observado na **Figura 13 e Tabela 6**, o tratamento com leptina não alterou a ingestão alimentar diária de ração entre os grupos estudados. No entanto, podemos observar que os animais Sham e tratados com Losartan apresentaram uma discreta elevação na ingestão alimentar na 1ª semana e nas semanas seguintes uma leve queda deste parâmetro. Já os animais do grupo Leptina e Leptina + Losartan também apresentaram uma elevação da ingestão alimentar a partir da 1ª semana de tratamento, porém a sua ingestão alimentar continuou em ascensão nas semanas subsequentes.

Figura 13 - Ingestão alimentar de animais tratados por 28 dias.

Ingestão alimentar semanal (médias em gramas/dia) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias.

Tabela 6 - Ingestão alimentar de animais tratados por 28 dias.

Ingestão alimentar	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
Semana 1	20,87 ± 3,46	23,57 ± 2,10	20,46 ± 2,36	19,19 ± 3,33
Semana 2	26,78 ± 2,00	26,68 ± 1,03	23,60 ± 2,65	23,48 ± 2,92
Semana 3	25,68 ± 2,33	25,89 ± 1,92	24,37 ± 2,82	24,12 ± 3,42
Semana 4	22,00 ± 0,83	20,97 ± 1,62	24,52 ± 3,30	25,66 ± 2,38

Ingestão alimentar diária em g.

Os resultados indicam que não houve diferença no ganho de peso entre os grupos estudados (**Tabela 7**), demonstrando que o tratamento com leptina por 28 dias não teve ações anorexigênicas sobre os animais.

Tabela 7 - Ganho de peso de animais tratados por 28 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
Ganho de peso	45,65 ± 0,83	44,35 ± 2,49	41,05 ± 2,62	39,23 ± 1,95

Ganho de peso em %.

4.2.2 Pressão arterial

A medida de pressão arterial por pletismografia de cauda foi realizada com os animais acordados, o que permitiu realizarmos as medidas de PA semanalmente, para avaliarmos a evolução da pressão arterial durante todo o período de tratamento.

O tratamento com leptina por 28 dias induziu um aumento significativo da pressão arterial, em relação ao grupo Sham, já na 1ª semana de tratamento. O aumento foi progressivo durante as demais semanas de tratamento. O tratamento com leptina + Losartan preveniu o aumento da PA (**Figura 14 e Tabela 8**).

Figura 14 - Evolução da pressão arterial sistólica em animais tratados por 28 dias.

Pressão arterial sistólica (em mmHg) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias. * $p < 0.05$ versus Sham; # $p < 0.05$ versus Leptina.

Tabela 8 - Pressão arterial sistólica semanal de animais tratados por 28 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
Basal	106 ± 1,4	105 ± 0,9	105 ± 0,4	105 ± 0,7
Semana 1	104 ± 0,7	104 ± 0,4	117 ± 1,4*	101 ± 3,9 [#]
Semana 2	105 ± 0,6	103 ± 0,8	123 ± 1,8*	104 ± 2,3 [#]
Semana 3	104 ± 0,3	104 ± 1,4	128 ± 3,7*	104 ± 1,5 [#]
Semana 4	103 ± 1,1	104 ± 1,6	129 ± 2,1*	104 ± 1,2 [#]
Δ PAS	-2,1 ± 0,6	-1,2 ± 0,8	+23,5 ± 1,0*	-0,9 ± 0,7 [#]

PA em mmHg; *p< 0.05 *versus* Sham; [#]p< 0.05 *versus* Leptina

4.2.3 Concentração plasmática de leptina

As análises da concentração plasmática de leptina nos animais do tratados por 28 dias demonstram que os animais do grupo Leptina apresentam uma maior concentração do hormônio no plasma (Leptina: 7751 ± 417,8 *versus* Sham: 1742 ± 601,5; Losartan: 1628 ± 149,3) e que os animais tratados com leptina + Losartan apresentam uma redução parcial nestes níveis (Leptina + Losartan: 3928 ± 660,5) (**Figura 15**).

Figura 15 - Concentração plasmática de leptina de animais tratados por 28 dias.

Concentração plasmática de leptina (em pg/ml) em animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias (n= 4 - 8 por grupo). *p< 0.05 *versus* Sham; [#]p< 0.05 *versus* Leptina.

4.2.4 Hemodinâmica renal

Para todos os resultados a seguir foram coletadas 4 amostras de sangue e urina de cada animal.

O tratamento com leptina por 28 dias induziu uma queda significativa no FPR e os animais do grupo Leptina + Losartan tiveram este parâmetro normalizado, como pode ser observado na **Figura 16** e **Tabela 9**.

Figura 16 - Fluxo plasmático renal de animais tratados por 28 dias.

Fluxo plasmático renal (FPR, ml/min/kg) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias. * $p < 0.05$ versus Sham; # $p < 0.05$ versus Leptina.

No entanto, o tratamento com Leptina por 28 dias não alterou significativamente o RFG, como pode ser observado na **Figura 17** e **Tabela 9**.

Figura 17 - Ritmo de filtração glomerular de animais tratados por 28 dias.

Ritmo de filtração glomerular (RFG, ml/min/kg) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias.

A queda no FPR, mesmo sem alterações no RFG levou a um significativo aumento na FF de animais do grupo Leptina. Este aumento se manteve no grupo Leptina + Losartan, conforme demonstrado na **Figura 18** e **Tabela 9**.

Figura 18 - Fração de filtração de animais tratados por 28 dias.

Fração de Filtração (em %) de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias.
*p< 0.05 *versus* Sham; \$p<0.05 *versus* Losartan.

Tabela 9 - Hemodinâmica renal de animais tratados por 28 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
FPR	21,22 ± 0,46	20,58 ± 0,61	16,44 ± 0,71 *	19,00 ± 0,99 [#]
RFG	7,83 ± 0,24	7,31 ± 0,32	6,79 ± 0,32	7,31 ± 0,45
FF	35,95 ± 2,27	35,87 ± 1,57	42,70 ± 1,36 *	40,88 ± 1,58 ^{\$}

FPR e RFG em ml/min/kg; FF e %; *p< 0.05 *versus* Sham; [#]p< 0.05 *versus* Leptina; ^{\$}p<0.05 *versus* Losartan.

4.2.5 Função tubular

O tratamento com leptina e/ou Losartan não alterou o fluxo urinário entre os grupos estudados, conforme pode ser observado na **Figura 19** e **Tabela 10**.

Figura 19 - Fluxo urinário de animais tratados por 28 dias.

Fluxo urinário (em ml/min/kg) de animais Sham ou tratados com Leptina e/ou Losartan por 7 dias.

O tratamento com leptina e/ou Losartan por 28 dias não alterou as cargas filtradas (CF), as cargas excretadas (CE), nem a fração de excreção (FE) dos íons Na^+ e K^+ , entre os grupos estudados, como pode ser observado na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Função tubular de animais tratados por 28 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
V	$0,18 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
CF Na^+	$983,2 \pm 40,3$	$1010,0 \pm 92,7$	$959,8 \pm 92,3$	$843,0 \pm 53,8$
CE Na^+	$8,73 \pm 1,67$	$7,65 \pm 0,71$	$8,38 \pm 1,14$	$7,50 \pm 1,20$
FE Na^+	$0,96 \pm 0,17$	$0,80 \pm 0,12$	$0,87 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,09$
CF K^+	$27,26 \pm 1,68$	$27,81 \pm 3,68$	$25,67 \pm 2,36$	$20,19 \pm 1,32$
CE K^+	$6,62 \pm 1,19$	$5,76 \pm 0,58$	$7,19 \pm 0,65$	$5,46 \pm 0,75$
FE K^+	$23,69 \pm 3,38$	$21,76 \pm 2,28$	$27,52 \pm 2,22$	$22,73 \pm 2,12$

V em ml/min/kg; CF e CE em mEq/ml/min/kg, FE em %.

4.2.6 Parâmetros do equilíbrio ácido-base e osmolalidade

A carga excretada do íon amônio (NH_4^+) foi diminuída nos grupos Losartan e Leptina + Losartan. Já outros parâmetros como osmolalidade da urina, pH da urina e do plasma e HCO_3^- do plasma não foram alterados entre os grupos estudados, como pode ser observado na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Parâmetros do equilíbrio ácido-base e osmolalidade de animais tratados por 28 dias.

	Sham	Losartan	Leptina	Leptina + Losartan
Excreção de NH_4^+	1,34 ± 0,09	0,83 ± 0,03 ^{\$}	1,36 ± 0,07	1,09 ± 0,05 ^{\$#}
pH da urina	6,53 ± 0,06	6,40 ± 0,04	6,45 ± 0,05	6,59 ± 0,03
Osmolalidade da urina	504,3 ± 22,15	551,7 ± 24,67	557,30 ± 32,08	514,00 ± 22,56
pH do plasma	7,53 ± 0,02	7,30 ± 0,02	7,39 ± 0,02	7,30 ± 0,01
HCO_3^- do plasma	21,33 ± 1,08	20,17 ± 1,08	22,75 ± 0,63	22,00 ± 1,15

Excreção de NH_4^+ em mEq/ml/min/kg; osmolalidade em mOsm/kg H_2O , HCO_3^- do plasma em mmol/l; ^{\$}p<0.05 *versus* Sham; [#]p<0.05 *versus* Leptina.

4.2.7 Morfologia renal

A análise morfológica foi realizada em cortes histológicos (3-4 μm) corados com hematoxilina-eosina. Para as análises de área glomerular, foram calculadas as áreas de 50 glomérulos de 5 animais de cada grupo. Os resultados demonstram que o tratamento com leptina por 28 dias levou a alterações na morfologia renal. O tratamento induziu um aumento significativo da área glomerular (glomérulos indicados por setas pretas) (em μm^2 ; Sham: 7090 ± 72, Losartan: 7093 ± 39, Leptina: 8689 ± 149^{*}; ^{*}p<0.05 *versus* Sham). Este aumento não foi observado nos animais tratados com Leptina + Losartan (7243 ± 74[#]; [#]p<0.05 *versus* Leptina), conforme imagens histológicas e análise estatística (**Figura 20**).

Figura 20 - Morfologia renal de animais tratados por 28 dias.

Cortes histológicos (3-4 µm) de rins corados com hematoxilina-eosina, de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias (A-D). Quantificação da área glomerular em 50 glomérulos por animal. * $p < 0.05$ versus Sham; # $p < 0.05$ versus Leptina (E). Aumento de 200 X; barra = 100 µm.

4.2.8 Expressão de desmina

Estudos de imuno-histoquímica em cortes histológicos de 3-4 μm de rim, em lâminas parafinizadas e silanizadas demonstraram que o tratamento com leptina por 28 dias aumentou, qualitativamente, a expressão da proteína glomerular desmina (indicação pelas setas vermelhas).

Figura 21 - Expressão glomerular de desmina em animais tratados por 28 dias.

Imuno-histoquímica para proteína desmina em cortes histológicos (3-4 μm) de rim de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias. As setas indicam a marcação de desmina nos glomérulos; aumento de 200 X, barra = 100 μm .

4.2.9 Expressão de ED-1

O tratamento por 28 dias com leptina aumentou significativamente a expressão da proteína ED-1, um importante marcador da infiltração de macrófagos no tecido renal (**Figura 22**, indicação pelas setas verdes) (Leptina: $92,5 \pm 9,39^*$ *versus* Sham: $10,75 \pm 1,38$; $^*p < 0.05$; Losartan: $7,5 \pm 0,64$). Os animais tratados com leptina + Losartan apresentam uma redução parcial nestes níveis (Leptina + Losartan: $31,75 \pm 2,17^{\#\$}$; $^{\#}p < 0.05$ *versus* Leptina e $^{\$}p < 0.05$ *versus* Losartan). A quantificação foi realizada através da contagem de 30 campos no aumento de 40X.

Figura 22 - Expressão de ED-1 no tecido renal de animais tratados por 28 dias.

Imuno-histoquímica para proteína ED-1 em cortes histológicos (3-4 μm) de rim de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan por 28 dias (**A-D**). Quantificação das células ED-1 positivas (**E**). As setas indicam a marcação de células ED-1 positivas; aumento de 200 X, barra = 100 μm ; * $p < 0.05$ versus Sham; # $p < 0.05$ versus Leptina; \$ $p < 0.05$ versus Losartan

4.2.10 Albuminúria

Os nossos resultados de excreção de proteína nos animais tratados por 28 dias revelaram que os animais tratados com leptina apresentaram albuminúria e houve uma melhora nos animais do grupo Leptina + Losartan (**Figura 23**).

Figura 23 - Albuminúria de animais tratados por 28 dias.

Experimento representativo da corrida de amostras de urina de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan em gel de acrilamida 10%, seguido da marcação de proteínas com prata (**A**). Análise densitométrica das bandas (**B**). Controle: albumina (BSA; 69 kDa); * $p < 0.05$ versus Sham; # $p < 0.05$ versus Leptina.

4.2.11 Expressão de componentes do SRA no tecido renal

O tratamento com leptina por 28 dias não induziu alteração na expressão dos componentes do SRA, como pode ser observado na **Figura 24**. No entanto, os animais dos grupos Losartan e Leptina + Losartan tiveram a expressão do RNAm da renina significantivamente aumentada (**Figura 24 B**).

Figura 24 - Expressão do RNAm de componentes do SRA no tecido renal de animais tratados por 28 dias.

Expressão do RNAm de angiotensinogênio, renina e ECA no tecido renal de animais Sham ou tratados com leptina e/ou Losartan (n=4 por grupo). Representação em *fold change*, referente à diferença de expressão em relação ao grupo Sham. [&]p<0.05 versus Sham; [#]p<0.05 versus Leptina.

4.3 Estudos *in vitro*

4.3.1 Apoptose de células mesangiais

Os resultados do ensaio de apoptose em células mesangiais, indicam que aumentou significativamente a apoptose celular no tratamento com 100 e 250 ng/ml por 72 horas (Figura 25 e Tabela 12).

Figura 25 - Apoptose de células mesangiais tratadas com leptina.

Apoptose, expressa como % do respectivo controle em células mesangiais tratadas com leptina nas concentrações de 10, 100 ou 250 ng/ml por 24, 48 ou 72 (n=2). *p<0.05 *versus* Controle.

Tabela 12 - Apoptose de células mesangiais tratadas com leptina.

	Controle	10 ng/ml	100 ng/ml	250 ng/ml
24 horas	100,00 ± 1,55	97,95 ± 0,35	120,82 ± 0,10	103,07 ± 0,10
48 horas	100,00 ± 2,95	94,90 ± 1,30	108,41 ± 2,45	92,19 ± 0,15
72 horas	100,00 ± 2,25	99,04 ± 0,35	513,08 ± 13,75*	870,31 ± 3,1*

Valores em % padronizados pelo grupo Controle; * p < 0.05 *versus* Controle; n=2.

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos acumulam evidências de que a leptina é um hormônio multifuncional e que suas ações claramente se estendem além das envolvidas na regulação do apetite e do peso corporal. Sugere-se que em animais obesos, o desenvolvimento da hipertensão arterial está associado à hiperleptinemia^{36; 42}. Sendo assim, a administração de leptina em animais não-obesos pode mimetizar um estado hiperleptinêmico, sem a influência de outros fatores relacionados à obesidade.

Nossos resultados indicam que os animais tratados com leptina por 7 dias tiveram uma ingestão alimentar igual à dos animais controle. Beltowski et al. (2005)⁶¹ e Wójcicka et al. (2008)¹⁰⁴ haviam demonstrado que a ingestão alimentar nos animais tratados com leptina por 7 dias diminuía apenas do 6º para o 7º dia. Sendo assim, esta manutenção da ingestão alimentar no período de tratamento de 7 dias está de acordo com outros dados da literatura.

Já os resultados do tratamento de 28 dias foram surpreendentes e revelaram uma aparente resistência aos efeitos anorexigênicos da leptina, uma vez que os animais Sham e tratados com Losartan apresentaram um leve aumento na ingestão alimentar na 1ª semana de tratamento, que sofreu discreta queda ao longo das semanas e os animais tratados com leptina e/ou Losartan apresentaram uma elevação da ingestão alimentar no início do tratamento, que continuou em ascensão durante todo o período de tratamento. Há poucos trabalhos na literatura que utilizaram o período de tratamento mais prolongado de 28 dias e no estudo de Gunduz et al. (2005)⁶⁰ foi demonstrado que os animais hiperleptinêmicos apresentavam uma ingestão alimentar normal, porém menor ganho de peso no tratamento por 28 dias. No entanto a dose utilizada neste estudo foi de 250 ng por hora por meio de mini-bombas intraperitoniais, o que totaliza 6 mg/dia de leptina. Portanto, a dose utilizada por Gunduz et al. (2005) foi bastante superior à dose utilizada no nosso estudo (0.25 mg/kg/dia).

Apesar da ausência de diferenças em relação à ingestão alimentar, o tratamento por 7 dias induziu a uma queda significativa no ganho de peso dos animais hiperleptinêmicos. Os animais Sham e Losartan tiveram um aumento de 16-17% no peso corporal, enquanto que os animais do grupo Leptina tiveram um aumento menor que 4%. O grupo Leptina + Losartan teve um ganho de peso maior que o grupo tratado apenas com leptina, porém o crescimento foi menor que nos grupos Sham e Losartan. Já o grupo de animais tratados por 28 dias, não apresentaram diferença no ganho de peso corporal, acompanhando a ausência de diferenças na ingestão alimentar.

Vale ressaltar que as diferenças de ingestão alimentar e ganho de peso observadas entre os grupos de 7 e 28 dias se devem ao fato de os animais de 28 dias receberem metade da dose do grupo de 7 dias. Assim, os animais tratados por 28 dias não apresentaram a mesma

queda no ganho de peso que os animais tratados por 7 dias ao final da primeira semana de tratamento.

Uma vez que o Losartan foi capaz de reverter parcialmente o efeito de queda no ganho de peso dos animais hiperleptinêmicos (7 dias), podemos sugerir que este efeito da leptina esteja associado à Ang II. De fato, Yoshida et al. (2012) ¹⁰⁹ demonstraram que os níveis circulantes de leptina estão reduzidos em animais com infusão crônica de Ang II e que estes animais apresentam uma reduzida ingestão alimentar. Eles demonstraram ainda que a queda da ingestão alimentar nos animais com infusão crônica de Ang II é dependente da sinalização de receptores do tipo AT₁. A Ang II, via receptor AT₁, induz a diminuição da expressão dos genes *Npy* e *orexin* no hipotálamo, ambos reguladores da ingestão alimentar. Além disso, há evidências da presença concomitante de receptores para leptina e Ang II em regiões cerebrais como núcleo arqueado, núcleo do trato solitário e órgão subfornicial ¹¹⁰. A maioria dos inibidores do SRA são incapazes de penetrar a barreira hemato-encefálica (BHE). No entanto, as drogas mais lipofílicas, como o antagonista do receptor AT₁ (Losartan) são capazes de atravessá-la, especialmente no tratamento crônico. O Losartan é capaz de atravessar a BHE inclusive após administração periférica aguda, sugerindo ações centrais adicionais às periféricas ¹¹¹. Assim, ao tratarmos os animais cronicamente com leptina + Losartan estaríamos reduzindo o efeito anorexigênico da Ang II, que ocorre via receptor AT₁ no hipotálamo, e que promove a redução da ingestão alimentar e possui também um efeito catabólico na musculatura esquelética. Porém vale ressaltar que outras ações de Losartan podem ser periféricas.

Nos animais tratados por 7 dias, ambos os grupos hiperleptinêmicos (Leptina e Leptina + Losartan), apresentaram concentrações plasmáticas de leptina elevadas. No entanto, no grupo de animais tratados por 28 dias, a concentração plasmática de leptina foi significativamente maior somente no grupo Leptina, enquanto que os animais do grupo Leptina + Losartan não apresentaram concentrações superiores aos grupos Sham e Losartan. Sendo assim, parece que no tratamento crônico (28 dias), as altas concentrações de leptina parecem ser mantidas, não somente pela leptina administrada exogenamente, mas também por mecanismo dependente da ação de Ang II via receptores AT₁. De fato, Skurk et al. ¹¹², demonstraram que a Ang II é capaz de estimular a liberação de leptina pelos adipócitos e que este processo envolve os receptores AT₁ e a via de sinalização da ERK.

Diversos estudos já demonstraram a capacidade da leptina em induzir aumento da pressão arterial. Em 1998, Shek et al. ⁵⁹, demonstraram pela primeira vez que a administração intravenosa de leptina aumentava a pressão arterial de ratos. O grupo de Jerzy Beltowski já

demonstrou em inúmeros estudos que o tratamento com leptina por 7 dias, via injeções subcutâneas diárias, é capaz de aumentar a pressão arterial de ratos^{46; 98; 113; 114}. Estes estudos foram realizados em animais não-obesos e assim buscavam mimetizar um estado hiperleptinêmico não associado à obesidade. Nossos resultados demonstram que os animais tratados com leptina por 7 dias apresentaram um aumento estatisticamente significativo na pressão arterial. Porém, vale ressaltar que os animais ficaram com uma pressão arterial final de 118 mmHg. Assim, podemos considerar que o tratamento com leptina por 7 dias teve um efeito de elevação da pressão arterial, porém ela não induziu hipertensão nos animais. Beltowski et al. 2005⁶¹ haviam demonstrado uma elevação de 20% na pressão arterial de ratos tratados com leptina por 7 dias, com valores finais de pressão arterial de 152 mmHg, já considerados hipertensivos. Porém, os animais controle apresentavam pressão arterial final de 126 mmHg, valor este que consideramos elevado para animais controle.

Já no grupo tratado com leptina por 28 dias, observamos uma progressiva elevação da pressão arterial nos animais, que chegaram a uma PA final de $129 \pm 2,1$ ou seja, um estado de pré-hipertensão. Estes resultados indicam que o tratamento por um período mais longo é capaz de elevar progressivamente a pressão arterial, o que vai de encontro aos dados da literatura, de que a leptina poderia ser um dos fatores envolvidos com a hipertensão na obesidade (estado hiperleptinêmico).

Em ambos os períodos (7 e 28 dias), o tratamento com leptina + Losartan normalizou a PA, sugerindo que, a elevação da PA nos animais hiperleptinêmicos está associada ao aumento de Ang II sistêmica, que é um hormônio vasopressor.

Concomitantemente com as alterações nos níveis de pressão arterial, o tratamento com leptina, induziu mudanças na função renal dos animais tratados, em ambos os períodos de tratamento. Nossos resultados mostram uma queda não significativa no FPR nos animais tratados com leptina por 7 dias, porém uma queda significativa neste parâmetro nos animais tratados por 28 dias. Em ambos os períodos de tratamento, o FPR foi normalizado nos animais tratados com leptina + Losartan. Esses resultados vão de encontro com a hipótese de que a leptina tem ações no sistema cardiovascular e sistema nervoso simpático. Esta diminuição no FPR pode ser decorrente de uma vasoconstrição nas arteríolas renais, tanto via ação direta simpática, como via ativação do SRA. Uma vez que os animais do grupo Leptina + Losartan tiveram este efeito revertido, isso indica que a queda no FPR deve estar associada à ação de Ang II sobre as arteríolas renais. DiBona GF (2004)⁷⁰ já havia sugerido que os efeitos renais da hiperleptinemia poderiam incluir a redução do fluxo plasmático renal, vasoconstrição renal e aumento na liberação de renina, levando ao aumento na produção de

Ang II. Além disso, Gunduz et al. (2005)⁶⁰ já demonstraram que em ratos hiperleptinêmicos os níveis de ET-1 estão aumentados e que estes diminuem quando os animais hiperleptinêmicos são tratados com Losartan, indicando uma interação dos sistemas leptina/ET/SRA. Também já foi descrito que o endotélio é alvo de ação da leptina^{67; 115}.

Beltowski et al. (2004)⁴⁶ e Gunduz et al. (2005)⁶⁰, haviam demonstrado que o tratamento crônico com leptina por 7 e 28 dias, respectivamente, não induzia alterações no RFG (avaliado através do clearance de creatinina). Nossos resultados também indicam que o tratamento com leptina tanto por 7 como por 28 dias não alterou o RFG estatisticamente (avaliado através do clearance de inulina).

As alterações no FPR, mesmo com ausência de alteração no RFG nos animais tratados com leptina induziram uma resposta fisiologicamente importante, uma vez que a fração de filtração (FF) foi significativamente aumentada nos dois períodos de tratamento. A Ang II exerce uma importante influência sobre a hemodinâmica glomerular, por elevar a resistência vascular renal, levando à diminuição do FPR e menor alteração sobre o RFG. Isso ocorre devido à relativa seletividade da Ang II pela arteríola eferente em relação à aferente. Este maior aumento na resistência da arteríola eferente provoca uma elevação na pressão hidráulica do capilar glomerular e consequentemente aumento na pressão de ultrafiltração, o que contribui para a manutenção ou até leve aumento no RFG e o aumento na FF. No entanto, o co-tratamento com Losartan normalizou a FF apenas no grupo de animais tratados por 7 dias, indicando que neste período de tratamento a Ang II está envolvida. O grupo de animais tratados com leptina + Losartan por 28 dias não teve a sua FF completamente normalizada, indicando que neste período de tratamento mais prolongado não apenas a Ang II, mas também outros fatores como, por exemplo, a ativação simpática e ET-1 estão atuando na queda do FPR. É importante ressaltar que o FPR dos animais do grupo Leptina + Losartan não é estatisticamente diferente em relação ao grupo Losartan nem ao grupo Leptina, indicando que houve uma atenuação deste efeito.

O aumento na FF, que é a relação entre o RFG e o FPR, refletiu também no aumento do fluxo urinário dos animais tratados com leptina, porém isso ocorreu apenas no grupo tratado por 7 dias. Já foi bem descrito que a infusão aguda de leptina produz aumento na natriurese e diurese em ratos normais⁵², sem alterações na pressão arterial e RFG^{13; 52; 116}. Por outro lado, em ratos espontaneamente hipertensos e obesos, este efeito está atenuado^{13; 52}. A manutenção do fluxo urinário no grupo de animais tratados com leptina por 28 dias pode ser uma resposta compensatória ao período de tratamento mais prolongado e vai de encontro aos

achados de Gunduz et al. (2005) ⁶⁰, que também não observaram alterações no fluxo urinário dos animais cronicamente tratados (28 dias).

No estudo de Villareal et al. (1998) ⁵² foi sugerido que o aumento na fração de excreção de Na^+ , sem alterações significativas no clearance de creatinina ou no sistema renina-angiotensina-aldosterona, ocorria devido a uma indução de natriurese por mecanismo tubular. A identificação de receptores de leptina na medula renal, principalmente nos ductos coletores medulares, sugere que este segmento é um possível alvo para as ações da leptina ⁵⁷; ⁵⁸. Apesar da infusão aguda de leptina induzir aumento na excreção renal de Na^+ , ainda há controvérsias sobre os efeitos no manejo de Na^+ na hiperleptinemia crônica ⁶⁰. Kuo et al. (2001) ⁴⁸, não observaram alterações na excreção renal de Na^+ no tratamento crônico com leptina, enquanto que Beltowski et al. (2004) ⁴⁶ demonstraram retenção de Na^+ e Gunduz et al. (2005) ⁶⁰ observaram um efeito natriurético. As razões para estas discrepâncias entre os estudos não estão claras, porém há diversas diferenças nos protocolos experimentais, como duração, dose e via de administração da leptina. Nossos resultados também indicaram um efeito natriurético da leptina no grupo de 7 dias, que foi revertido no grupo Leptina + Losartan. De fato, os nossos resultados indicam que o aumento na FE Na^+ deve ser devido a um efeito tubular e em consequência do aumento do fluxo urinário, uma vez que a carga filtrada deste íon (CFNa^+) manteve-se inalterada. Já em relação ao K^+ , não houve alteração na carga filtrada, na carga excretada e na fração de excreção no tratamento com leptina por 7 dias. Já no grupo de 28 dias, concomitante à manutenção do fluxo urinário, não foram observadas alterações na carga excretada e fração de excreção de Na^+ e K^+ , o que reforça o efeito tubular da leptina.

Beltowski et al. (2004) ⁴⁶ e Gunduz et al. (2005) ⁶⁰ já sugeriam que a leptina deve agir primariamente sobre a reabsorção e secreção tubular, uma vez que não há alterações no RFG. Assim, no grupo de 7 dias observamos um aumento simultâneo do fluxo urinário e fração de filtração de Na^+ , enquanto que no grupo de 28 dias, nenhum destes parâmetros foi alterado. Portanto, a resposta observada no grupo de 7 dias parece estar realmente associada a um mecanismo tubular. É importante ressaltar que embora ainda não se saiba os exatos locais de expressão dos receptores de leptina no rim, é possível que haja uma ação direta da leptina sobre os transportadores renais, que também poderia estar participando destas modulações na excreção de íons.

Nossos dados não demonstraram alterações nos parâmetros relacionados ao equilíbrio ácido-base nos animais tratados por 7 dias, como: carga excretada de amônio, osmolalidade urinária, pH urinário e plasmático e concentração de HCO_3^- plasmático. Portanto, o equilíbrio

ácido base dos animais está preservado nos animais tratados por 7 dias. Já no grupo de 28 dias, não foram observadas alterações no pH do plasma e da urina, nem na concentração de HCO_3^- plasmático. No entanto, os grupos tratados com Losartan (Losartan e Leptina + Losartan) apresentaram uma queda na excreção de amônio. Já é descrito que a Ang II é capaz de estimular a produção e o transporte de amônia no túbulo proximal ¹¹⁷. Assim, no tratamento por 28 dias com Losartan é provável que o bloqueio do receptor AT_1 tenha afetado a produção e o transporte deste íon, o que refletiu na diminuição da sua carga excretada.

Os estudos histológicos demonstraram que o tratamento com leptina por 7 dias não alterou a estrutura tubular e intersticial, no entanto, induziu um aumento da área glomerular nos animais do grupo Leptina. Interessantemente, os animais do grupo Leptina tratados por 28 dias tiveram uma hipertrofia glomerular acentuada em relação aos animais tratados por 7 dias, além de aparente dilatação tubular e infiltração intersticial, demonstrando que o período de exposição à hiperleptinemia é capaz de agravar a injúria renal. A normalização da hipertrofia glomerular nos animais do grupo Leptina + Losartan em ambos os períodos de tratamento demonstra que há a participação da Ang II, via receptor AT_1 , nesta injúria. A hipertrofia glomerular é considerada um evento importante na progressão do dano glomerular ¹⁰⁸.

Associada à hipertrofia glomerular, os animais tratados com leptina por 7 e 28 dias exibiram uma maior marcação de desmina, um importante marcador de lesão glomerular. A expressão normal de desmina na maioria das linhagens de ratos está confinada às células mesangiais e os podócitos apenas expressam desmina após injúria ¹⁰⁸. A hipertrofia glomerular e o aumento da expressão de desmina estão associados à albuminúria observada nos animais do grupo Leptina e que foi normalizada no grupo Leptina + Losartan, em ambos os tempos de tratamento. Além disso, os animais tratados por 28 dias apresentaram uma significativa infiltração de macrófagos (marcados pela proteína ED-1) para o tecido renal, indicando um processo inflamatório local.

Uma vez que os efeitos da hiperleptinemia foram sensíveis ao co-tratamento com Losartan, consideramos que a investigação da ativação de SRA intrarenal no grupo de 28 dias, em que os efeitos do tratamento com leptina são mais pronunciados, seriam importantes para podermos elucidar as interações entre a leptina e o SRA. No entanto, nossos resultados de PCR em tempo real não demonstraram a ativação do SRA intrarenal. Sendo assim, os efeitos renais causados pela interação entre leptina e Ang II não são por ativação do SRA intrarenal, mas sim SRA sistêmico. O aumento na expressão do RNAm da renina observado nos grupos Losartan e Leptina + Losartan deve-se ao bloqueio do mecanismo de *feedback* negativo sobre a síntese e a secreção de renina pelas células justaglomerulares. A Ang II inibe a secreção de

renina diretamente, por um *feedback* que ocorre via receptor AT₁ e também indiretamente, através do mecanismo vasopressor e aumento de pressão arterial ^{118; 119}. Assim, ao tratarmos os animais com Losartan, ocorre o bloqueio destes efeitos e aumento da transcrição do gene da renina. Surpreendentemente, não observamos aumento da expressão do gene da renina no grupo Leptina, apesar de os nossos resultados sugerirem que há ativação do SRA. No entanto, também já foi demonstrado que doses subpressoras de Ang II inibem a secreção de renina, sugerindo um efeito independente da pressão arterial sobre a liberação de renina ^{120; 118}. Dado que os animais do nosso estudo tiveram uma elevação da PA, porém sem atingirem um estado hipertensivo, a concentração de Ang II no plasma pode estar suficientemente elevada para causar injúria renal, porém não suficientemente elevada para alterar a síntese e secreção de renina.

Os achados de lesão glomerular, hipertrofia glomerular e albuminúria observados nos estudos *in vivo*, apesar da ausência de alterações no RFG, indicam que os glomérulos são alvos para os efeitos da leptina. O tufo glomerular é composto de 3 tipos celulares: células endoteliais dos capilares glomerulares, podócitos e células mesangiais. Juntamente com a membrana basal glomerular, o endotélio e os podócitos formam a barreira de ultrafiltração glomerular.

As células mesangiais produzem matriz extracelular, estão em contato direto com as células endoteliais glomerulares e separadas dos podócitos pela membrana basal glomerular. Elas mantêm a integridade do tufo glomerular, formando um arcabouço que suporta os capilares. Além disso, as células mesangiais produzem diversos fatores de crescimento e outras proteínas importantes para a fisiologia dos podócitos e das células endoteliais glomerulares ¹²¹.

Han DC et al. (2001), demonstraram que as células mesangiais expressam a isoforma ObRa, mas não a isoforma ObRb de receptores para leptina ⁵⁶. Além disso, as células mesangiais expressam todos os componentes do SRA e são capazes de gerar Ang II localmente, ou seja, expressam RNAm para angiotensinogênio, ECA, renina e receptores de Ang II ⁷⁷. As células mesangiais em cultura são capazes de sintetizar, estocar e secretar a renina em suas duas formas: ativa e inativa ⁷⁸. Sendo assim, as células mesangiais são possíveis alvos para a ação da leptina e podem sintetizar e secretar fatores que atuam paracrinamente sobre as demais células glomerulares. Vale ressaltar também que, apesar de não ter observado alterações na expressão dos componentes do SRA no tecido renal como um todo, isso não exclui a possibilidade de modulação deste sistema em células isoladas.

O tratamento com leptina aumentou a apoptose das células mesangiais tratadas com leptina nas concentrações de 100 e 250 ng/ml nos período de 72 horas. Nossos dados estão de acordo com a literatura, uma vez que o grupo de Wolf G e Ziyadeh FN observou que a leptina estimula a proliferação de células endoteliais dos capilares glomerulares, porém não tem efeito mitogênico sobre as células mesangiais ⁵⁵.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados demonstram que o tratamento com leptina induz aumento progressivo da pressão arterial, bem como das alterações na função e na morfologia renal. O tecido renal é alvo da ação da leptina direta e indiretamente, apresentando lesão glomerular e infiltração de macrófagos. As alterações são, em grande parte, normalizadas com o Losartan, evidenciando uma interação entre a leptina e a Ang II na injúria renal, neste modelo experimental. No entanto, não foi observado aumento na expressão dos componentes do SRA intrarenal como em outros modelos de hipertensão arterial e injúria renal.

Estes achados histológicos são os primeiros a demonstrar tais tipos de lesão da ultraestrutura glomerular em animais com hiperleptinemia. Assim, consideramos que são estudos de grande importância para compreendermos como a hiperleptinemia pode afetar a função e morfologia glomerular, contribuindo assim para a gênese e manutenção da elevação da pressão arterial neste modelo experimental.

Uma vez que os dados dos estudos *in vivo* demonstraram um importante papel da leptina associada ao SRA em induzir injúria glomerular, consideramos que os estudos *in vitro* da ação da leptina sobre a ativação do SRA e também da ET-1 em células mesangiais e podócitos serão importantes para a compreensão de como este hormônio pode afetar funcionalmente e morfológicamente diferentes tipos celulares que compõem os glomérulos. Assim, apesar de preliminares, os estudos *in vitro*, indicam que a leptina é capaz de induzir apoptose de células mesangiais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- 1 WOFFORD, M. R.; HALL, J. E. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. **Curr. Pharm. Des.**, v. 10, n. 29, p. 3621-3637, 2004.
- 2 HALL, J. E. The kidney, hypertension, and obesity. **Hypertension**, v. 41, n. 3, p. 625-633, 2003.
- 3 BELTOWSKI, J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. **J. Hypertens.**, v. 24, p. 789-801, 2006.
- 4 BRADLEY, R. L.; CLEVELAND, K. A.; CHEATHAM, B. The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 56, p. 329-358, 2001.
- 5 KENNEDY, G. C. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 140, n. 901, p. 578-596, 1953.
- 6 COLEMAN, D. L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. **Diabetologia**, v. 9, n. 4, p. 294-298, 1973.
- 7 ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-432, 1994.
- 8 BELTOWSKI, J. Leptin and the Regulation of Renal Sodium Handling and Renal Na-Transporting ATPases: Role in the Pathogenesis of Arterial Hypertension. **Curr. Cardiol. Rev.**, v. 6, n. 1, p. 31-40, 2010.
- 9 PURDHAM, D. M. et al. Rat heart is a site of leptin production and action. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 287, n. 6, p. H2877-2884, 2004.
- 10 CHUA, S. C., JR. et al. Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. **Genomics**, v. 45, n. 2, p. 264-270, 1997.
- 11 WOLF, G. et al. Leptin and renal disease. **Am. J. Kidney Dis.**, v. 39, p. 1-11, 2002.
- 12 FORTUÑO, A. et al. Leptin inhibits angiotensin II-induced intracellular calcium increase and vasoconstriction in the rat aorta. **Endocrinology**, v. 143, n. 9, p. 3555-3560, 2002.
- 13 STENVINKEL, P.; LÖNNQVIST, F.; SCHALLING, M. Molecular studies of leptin: implications for renal disease. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 14, n. 5, p. 1103-1112, 1999.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- ¹⁴ MYERS, M. G.; COWLEY, M. A.; MUNZBERG, H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 70, p. 537-556, 2008.
- ¹⁵ GONG, Y. et al. The long form of the leptin receptor regulates STAT5 and ribosomal protein S6 via alternate mechanisms. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 42, p. 31019-31027, 2007.
- ¹⁶ MYERS, M. G., JR. Outstanding Scientific Achievement Award Lecture 2010: deconstructing leptin: from signals to circuits. **Diabetes**, v. 59, p. 2708-2714, 2010.
- ¹⁷ BANKS, A. S. et al. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 19, p. 14563-14572, 2000.
- ¹⁸ SWEENEY, G. Leptin signalling. **Cell. Signal.**, v. 14, n. 8, p. 655-663, 2002.
- ¹⁹ GAMBER, K. M. et al. Over-expression of leptin receptors in hypothalamic POMC neurons increases susceptibility to diet-induced obesity. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30485, 2012.
- ²⁰ MORRIS, D. L.; RUI, L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 297, n. 6, p. E1247-1259, 2009.
- ²¹ BJORBAEK, C. et al. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 7, p. 4747-4755, 2001.
- ²² ZABOLOTNY, J. M. et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. **Dev. Cell.**, v. 2, n. 4, p. 489-495, 2002.
- ²³ HARLAN, S. M.; RAHMOUNI, K. PI3K signaling: A key pathway in the control of sympathetic traffic and arterial pressure by leptin. **Mol. Metab.**, v. 2, n. 2, p. 69-73, 2013.
- ²⁴ BELTOWSKI, J. et al. Role of PI3K and PKB/Akt in acute natriuretic and NO-mimetic effects of leptin. **Regul. Pept.**, v. 140, p. 168-177, 2007.
- ²⁵ CUMIN, F.; BAUM, H. P.; LEVENS, N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the kidney. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 20, n. 12, p. 1120-1126, 1996.
- ²⁶ _____. Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. **J. Endocrinol.**, v. 155, n. 3, p. 577-585, 1997.
- ²⁷ HAMA, H. et al. Evidence indicating that renal tubular metabolism of leptin is mediated by megalin but not by the leptin receptors. **Endocrinology**, v. 145, n. 8, p. 3935-3940, 2004.
- ²⁸ SWEENEY, G. Cardiovascular effects of leptin. **Nat. Rev. Cardiol.**, v. 7, n. 1, p. 22-29, 2010.

- 29 HALAAS, J. L. et al. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, n. 16, p. 8878-8883, 1997.
- 30 BANKS, W. A.; FARRELL, C. L. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, n. 1, p. E10-15, 2003.
- 31 ENRIORI, P. J. et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. **Cell. Metab.**, v. 5, n. 3, p. 181-194, 2007.
- 32 CARO, J. F. et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **Lancet**, v. 348, n. 9021, p. 159-161, 1996.
- 33 HILEMAN, S. M. et al. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 775-783, 2002.
- 34 TU, H. et al. Soluble receptor inhibits leptin transport. **J. Cell. Physiol.**, v. 214, n. 2, p. 301-305, 2008.
- 35 MARK, A. L. et al. Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications. **J. Hypertens.**, v. 20, n. 7, p. 1245-1250, 2002.
- 36 _____. Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. **J. Hypertens.**, v. 17, n. 12, p. 1949-1953, 1999.
- 37 CORREIA, M. L. et al. The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. **Diabetes**, v. 51, n. 2, p. 439-442, 2002.
- 38 RAHMOUNI, K. et al. Role of melanocortin-4 receptors in mediating renal sympathoactivation to leptin and insulin. **J. Neurosci.**, v. 23, n. 14, p. 5998-6004, 2003.
- 39 CHEUNG, C. C.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4489-4492, 1997.
- 40 VAISSE, C. et al. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. **J. Clin. Invest.**, v. 106, n. 2, p. 253-262, 2000.
- 41 PHILIPPE GEORGEL, N. G. S., BEUTLER B. **Phenotypic Mutation 'Business class'**. 2008. Disponível em: <<http://mutagenetix.utsouthwestern.edu:80>>. Acesso em: 07/abr/2014.
- 42 AIZAWA-ABE, M. et al. Pathophysiological role of leptin in obesity-related hypertension. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 9, p. 1243-1252, 2000.
- 43 AGATA, J. et al. High plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension. **Am. J. Hypertens.**, v.10, p. 1171-1174, 1997.

- 44 HAYNES, W. G. et al. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 2, p. 270-278, 1997.
- 45 EL-GHARBAWY, A. H. et al. Gender-specific correlates of leptin with hypertension-related phenotypes in African Americans. **Am. J. Hypertens.**, v. 15, n. 11, p. 989-993, 2002.
- 46 BELTOWSKI, J. et al. Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. **Life Sci.**, v. 74, n. 24, p. 2987-3000, 2004.
- 47 QUEHENBERGER, P. et al. Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. **Circ. Res.**, v. 90, n. 6, p. 711-718, 2002.
- 48 KUO, J. J.; JONES, O. B.; HALL, J. E. Inhibition of NO synthesis enhances chronic cardiovascular and renal actions of leptin. **Hypertension**, v. 37, n. 2, p. 670-6, 2001.
- 49 MARK, A. L. et al. Leptin signaling in the nucleus tractus solitarii increases sympathetic nerve activity to the kidney. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 375-380, 2009.
- 50 FRÜHBECK, G. Pivotal role of nitric oxide in the control of blood pressure after leptin administration. **Diabetes**, v. 48, n. 4, p. 903-908, 1999.
- 51 LEMBO, G. et al. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. **Diabetes**, v. 49, n. 2, p. 293-297, 2000.
- 52 VILLARREAL, D. et al. Renal effects of leptin in normotensive, hypertensive, and obese rats. **Am. J. Physiol.**, v. 275, n. 6, p. R2056-2060, 1998.
- 53 XU, F. P. et al. Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. **Circulation**, v. 110, n. 10, p. 1269-1275, 2004.
- 54 MADANI, S. et al. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. **Cardiovasc. Res.**, v. 69, n. 3, p. 716-725, 2006.
- 55 WOLF, G. et al. Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. **Kidney Int.**, v. 56, n. 3, p. 860-872, 1999.
- 56 HAN, D. C. et al. Leptin stimulates type I collagen production in db/db mesangial cells: glucose uptake and TGF-beta type II receptor expression. **Kidney Int.**, v. 59, p. 1315-1323, 2001.
- 57 MARTÍNEZ-ANSÓ, E.; LOSTAO, M. P.; MARTINEZ, J. A. Immunohistochemical localization of leptin in rat kidney. **Kidney Int.**, v. 55, n. 3, p. 1129-1130, 1999.
- 58 JACKSON, E. K.; LI, P. Human leptin has natriuretic activity in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 272, n. 3, p. F333-3338, 1997.

- 59 SHEK, E. W.; BRANDS, M. W.; HALL, J. E. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. **Hypertension**, v. 31, n. 1, p. 409-414, 1998.
- 60 GUNDUZ, Z. et al. Renal effects of long-term leptin infusion and preventive role of losartan treatment in rats. **Regul. Pept.**, v. 132, n. 1-3, p. 59-66, 2005.
- 61 BELTOWSKI, J. Effect of hyperleptinemia on endothelial nitric oxide production. **Atherosclerosis**, v. 178, n. 2, p. 403-404, 2005.
- 62 SANTOS-ALVAREZ, J.; GOBERNA, R.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. **Cell. Immunol.**, v. 194, n. 1, p. 6-11, 1999.
- 63 RUDBERG, S.; PERSSON, B. Serum leptin levels in young females with insulin-dependent diabetes and the relationship to hyperandrogenicity and microalbuminuria. **Horm. Res.**, v. 50, n. 6, p. 297-302, 1998.
- 64 GEKLE, M. et al. Transforming growth factor-beta1 reduces megalin- and cubilin-mediated endocytosis of albumin in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. **J. Physiol.**, v. 552, p. 471-481, 2003.
- 65 PORRECA, E. et al. Transforming growth factor-beta1 levels in hypertensive patients: association with body mass index and leptin. **Am. J. Hypertens.**, v. 15, n. 9, p. 759-765, 2002.
- 66 BELTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G. Spectrophotometric method for the determination of renal ouabain-sensitive H⁺,K⁺-ATPase activity. **Acta Biochim. Pol.**, v. 49, n. 2, p. 515-527, 2002.
- 67 BOULOUMIE, A. et al. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. **FASEB J.**, v. 13, n. 10, p. 1231-1238, 1999.
- 68 VILLARREAL, D.; REAMS, G.; FREEMAN, R. H. Effects of renal denervation on the sodium excretory actions of leptin in hypertensive rats. **Kidney Int.**, v. 58, n. 3, p. 989-994, 2000.
- 69 RAHMOUNI, K. et al. Role of selective leptin resistance in diet-induced obesity hypertension. **Diabetes**, v. 54, n. 7, p. 2012-2018, 2005.
- 70 DIBONA, G. F. The sympathetic nervous system and hypertension: recent developments. **Hypertension**, v. 43, n. 2, p. 147-150, 2004.
- 71 HAYNES, W. G. Interaction between leptin and sympathetic nervous system in hypertension. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 2, n. 3, p. 311-318, 2000.
- 72 BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 86, n. 6, p. 615-621, 2008.

- 73 SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 16, n. 2, p. 122-128, 2007.
- 74 BURCKLE, C.; BADER, M. Prorenin and its ancient receptor. In: (Ed.). **Hypertension**, v.48, p. 549-551, 2006.
- 75 NAVAR, L. G. et al. Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states. **J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.**, v. 2, p. S176-S184, 2001.
- 76 KIM, S.; IWAO, H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 1, p. 11-34, 2000.
- 77 VIDOTTI, D. B. et al. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 286, n. 6, p. F1039-1045, 2004.
- 78 ANDRADE, A. Q. et al. Characterization of renin mRNA expression and enzyme activity in rat and mouse mesangial cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 1, p. 17-24, 2002.
- 79 LIEBAU, M. C. et al. Functional expression of the renin-angiotensin system in human podocytes. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 290, n. 3, p. F710-719, 2006.
- 80 WANG, L.; FLANNERY, P. J.; SPURNEY, R. F. Characterization of angiotensin II-receptor subtypes in podocytes. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 142, n. 5, p. 313-321, 2003.
- 81 HALL, J. E. Pathophysiology of obesity hypertension. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 2, n. 2, p. 139-147, 2000.
- 82 BOUSTANY, C. M. et al. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 287, n. 4, p. R943-949, 2004.
- 83 BARTON, M. et al. Obesity-associated activation of angiotensin and endothelin in the cardiovascular system. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 35, n. 6, p. 826-837, 2003.
- 84 _____. Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 329-336, 2000.
- 85 ENGELI, S.; NEGREL, R.; SHARMA, A. M. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 35, n. 6, p. 1270-1277, 2000.
- 86 PINTEROVA, L.; KRIZANOVA, O.; ZORAD, S. Rat epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system. **Gen. Physiol. Biophys.**, v. 19, n. 3, p. 329-334, 2000.
- 87 JONSSON, J. R. et al. The expression and localisation of the angiotensin-converting enzyme mRNA in human adipose tissue. **Blood Press.**, v. 3, n. 1-2, p. 72-75, 1994.

- 88 CRANDALL, D. L. et al. Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes. **J. Lipid Res.**, v. 35, n. 8, p. 1378-1385, 1994.
- 89 CASSIS, L. A. et al. Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 169-174, 2004.
- 90 ARAKAWA, H.; CHITRAVANSI, V. C.; SAPRU, H. N. The hypothalamic arcuate nucleus: a new site of cardiovascular action of angiotensin-(1-12) and angiotensin II. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 300, n. 3, p. H951-960, 2011.
- 91 SMITH, P. M.; FERGUSON, A. V. Cardiovascular actions of leptin in the subfornical organ are abolished by diet-induced obesity. **J. Neuroendocrinol.**, v. 24, n. 3, p. 504-510, 2012.
- 92 SMITH, P. M. et al. The subfornical organ: a central nervous system site for actions of circulating leptin. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 296, n. 3, p. R512-520, 2009.
- 93 ARNOLD, A. C. et al. Leptin impairs cardiovascular baroreflex function at the level of the solitary tract nucleus. **Hypertension**, v. 54, n. 5, p. 1001-1008, 2009.
- 94 MONTAGUE, C. T. et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 903-908, 1997.
- 95 RAJAPUROHITAM, V. et al. The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. **Circ. Res.**, v. 93, n. 4, p. 277-279, 2003.
- 96 UMEDA, M.; KANDA, T.; MURAKAMI, M. Effects of angiotensin II receptor antagonists on insulin resistance syndrome and leptin in sucrose-fed spontaneously hypertensive rats. **Hypertens. Res.**, v. 26, n. 6, p. 485-492, 2003.
- 97 BELTOWSKI, J. et al. Differential effect of antioxidant treatment on plasma and tissue paraoxonase activity in hyperleptinemic rats. **Pharmacol. Res.**, v. 51, n. 6, p. 523-532, 2005.
- 98 _____. H₂O₂ and Src-dependent transactivation of the EGF receptor mediates the stimulatory effect of leptin on renal ERK and Na⁺, K⁺-ATPase. **Peptides**, v. 27, p. 3234-3244, 2006.
- 99 BELTOWSKI, J. et al. Regulation of renal ouabain-resistant Na⁺-ATPase by leptin, nitric oxide, reactive oxygen species, and cyclic nucleotides: implications for obesity-associated hypertension. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 29, n. 3, p. 189-207, 2007.
- 100 BELTOWSKI, J. et al. Renal antioxidant enzymes and glutathione redox status in leptin-induced hypertension. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 319, n. 1-2, p. 163-174, 2008.

- 101 _____ . Resistance to acute NO-mimetic and EDHF-mimetic effects of leptin in the metabolic syndrome. **Life Sci.**, v.85, p.557-567, 2009.
- 102 BELTOWSKI, J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 39, n. 2, p. 168-178, 2012.
- 103 MARCINIAK, A. et al. Time-dependent effect of leptin on renal Na⁺,K⁺-ATPase activity. **Acta Biochim. Pol.**, v. 52, p. 803-809, 2005.
- 104 WOJCICKA, G. et al. Role of extracellular signal-regulated kinases (ERK) in leptin-induced hypertension. **Life Sci.**, v.82, p. 402-412, 2008.
- 105 KAWANO, Y. et al. Chronic effects of central and systemic administration of losartan on blood pressure and baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.**, v. 7, n. 6, p. 536-542, 1994.
- 106 FUHR, J.; KACZMARCZYK, J.; KRUTTGEN, C. D. A simple colorimetric method of inulin determination in renal clearance studies on metabolically normal subjects and diabetics. **Klin. Wochenschr**, v. 33, n. 29-30, p. 729-30, 1955.
- 107 SMITH, H. W. et al. The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. **J. Clin. Invest.**, v. 24, n. 3, p. 388-404, 1945.
- 108 COIMBRA, T. M. et al. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. **Kidney Int.**, v. 57, n. 1, p. 167-182, 2000.
- 109 YOSHIDA, T. et al. Angiotensin II reduces food intake by altering orexigenic neuropeptide expression in the mouse hypothalamus. **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1411-1420, 2012.
- 110 HILZENDEGER, A. M. et al. A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 303, n. 2, p. H197-206, 2012.
- 111 CHAI, S. Y.; ZHUO, J.; MENDELSON, F. A. Localization of components of the renin-angiotensin system and site of action of inhibitors. **Arzneimittelforschung**, v. 43, n. 2A, p. 214-221, 1993.
- 112 SKURK, T. et al. Angiotensin II promotes leptin production in cultured human fat cells by an ERK1/2-dependent pathway. **Obes. Res.**, v. 13, n. 6, p. 969-973, 2005.
- 113 BELTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G.; BORKOWSKA, E. Human leptin stimulates systemic nitric oxide production in the rat. **Obes. Res.**, v. 10, n. 9, p. 939-946, 2002.
- 114 BELTOWSKI, J. et al. Phosphodiesterase 5 inhibitor ameliorates renal resistance to atrial natriuretic peptide associated with obesity and hyperleptinemia. **Arch. Med. Res.**, v. 37, p. 307-315, 2006.

- ¹¹⁵ SIERRA-HONIGMANN, M. R. et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. **Science**, v. 281, n. 5383, p. 1683-1686, 1998.
- ¹¹⁶ JACKSON, E. K.; HERZER, W. A. A comparison of the natriuretic/diuretic effects of rat vs. human leptin in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 277, n. 5, p. F761-765, 1999.
- ¹¹⁷ NAGAMI, G. T. Role of angiotensin II in the enhancement of ammonia production and secretion by the proximal tubule in metabolic acidosis. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 294, n. 4, p. F874-880, 2008.
- ¹¹⁸ HACKENTHAL, E. et al. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. **Physiol. Rev.**, v. 70, n. 4, p. 1067-1116, 1990.
- ¹¹⁹ CASTROP, H. et al. Physiology of kidney renin. **Physiol. Rev.**, v. 90, n. 2, p. 607-673, 2010.
- ¹²⁰ DAVIS, J. O.; FREEMAN, R. H. Mechanisms regulating renin release. **Physiol. Rev.**, v. 56, n. 1, p. 1-56, 1976.
- ¹²¹ LEEUWIS, J. W. et al. Targeting podocyte-associated diseases. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.62, p. 1325-1336, 2010.

ANEXO A

Artigos publicados no período da presente tese (2010 a 2014)

Cell Physiol Biochem. 2010;26(4-5):541-52. doi: 10.1159/000322322. Epub 2010 Oct 29.

Regulation of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 (NHE1) by calmodulin-binding sites: role of angiotensin II.

Equiti DM¹, Thieme K, Leung GP, Mello-Aires M, Oliveira-Souza M.

Author information

¹Department of Physiology and Biophysics, Instituto de Ciências Biomédicas, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Abstract

We examined the effect of Angiotensin II (Ang II) on the interaction between the Ca(2+)/CaM complex and hNHE1. Considering that calmodulin binds to NHE1 at two sites (A and B), amino acids at both sites were modified and two mutants were constructed: SA(1K3R/4E) and SB(1K3R/4E). Wild type and mutants were transfected into PS120 cells and their activity was examined by H(+) flux (J(H+)). The basal J(H+) of wild type was 4.71 ± 0.57 (mM/min), and it was similar in both mutants. However, the mutations partially impaired the binding of CaM to hNHE1. Ang II (10⁻¹²) and 10⁻⁹ M increased the J(H+) in wild type and SB. Ang II (10⁻⁶) M increased this parameter only in SA. Ang II (10⁻⁹) M maintained the expression of calmodulin in wild type or mutants, and Ang II (10⁻⁶) M decreased it in wild type or SA, but not in SB. Dimethyl-Bapta-AM (10⁻⁷) M, a calcium chelator, suppressed the effect of Ang II (10⁻⁹) M in wild type. With Ang II (10⁻⁶) M, Bapta failed to affect wild type or SA, but it increased the J(H+) in SB. W13 or calmidazolium chloride (10⁻⁵) M, two distinct calmodulin inhibitors, decreased the effect of Ang II (10⁻⁹) M in wild type or SB. With Ang II (10⁻⁶) M, W13 or calmidazolium chloride decreased the J(H+) in wild type or SA and increased it in SB. Thus, with Ang II (10⁻¹²) and 10⁻⁹ M, site A seems to be responsible for the stimulation of hNHE1 and with Ang II (10⁻⁶) M, site B is important to maintain its basal activity.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel.

PMID: 21063092 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Eur J Pharmacol. 2013 Dec 5;721(1-3):322-31. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.08.043. Epub 2013 Sep 25.

The regulation of NHE₁ and NHE₃ activity by angiotensin II is mediated by the activation of the angiotensin II type I receptor/phospholipase C/calcium/calmodulin pathway in distal nephron cells.

Costa-Pessoa JM¹, Figueiredo CF, Thieme K, Oliveira-Souza M.

Author information

¹Department of Physiology and Biophysics, Instituto de Ciências Biomédicas. University of São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil.

Abstract

Angiotensin II (Ang II), acting via the AT1 receptor, induces an increase in intracellular calcium [Ca(2+)]_i that then interacts with calmodulin (CaM). The Ca(2+)/CaM complex directly or indirectly activates sodium hydrogen exchanger 1 (NHE1) and phosphorylates calmodulin kinase II (CaMKII), which then regulates sodium hydrogen exchanger 3 (NHE3) activity. In this study, we investigated the cellular signaling pathways responsible for Ang II-mediated regulation of NHE1 and NHE3 in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. The NHE1- and NHE3-dependent pHi recovery rates were evaluated by fluorescence microscopy using the fluorescent probe BCECF/AM, messenger RNA was evaluated with the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and protein expression was evaluated by immunoblot. We demonstrated that treatment with Ang II (1 pM or 1 nM) for 30 min induced, via the AT1 but not the AT2 receptor, an equal increase in NHE1 and NHE3 activity that was reduced by the specific inhibitors HOE 694 and S3226, respectively. Ang II (1 nM) did not change the total expression of NHE1, NHE3 or calmodulin, but it induced CaMKII, cRaf-1, Erk1/2 and p90(RSK) phosphorylation. The stimulatory effects of Ang II (1 nM) on NHE1 or NHE3 activity or protein abundance was reduced by ophiobolin-A (CaM inhibitor), KN93 (CaMKII inhibitor) or PD98059 (Mek inhibitor). These results indicate that after 30 min, Ang II treatment may activate G protein-dependent pathways, including the AT1/PLC/Ca(2+)/CaM pathway, which induces CaMKII phosphorylation to stimulate NHE3 and induces cRaf-1/Mek/Erk1/2/p90(RSK) activity to stimulate NHE1.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

KEYWORDS: Angiotensin II, CaMKII, Erk1/2, NHE(1), NHE(3)

PMID: 24076179 [PubMed - in process]

ANEXO B

Artigos em fase de submissão

THIEME K, VOLPINI RA, OLIVEIRA-SOUZA M. Renal morphological and functional changes after chronic isoproterenol treatment. - em fase final de redação para submissão ao *American Journal of Nephrology*.

CASARE F, THIEME K, FERNANDES FB, CASARINI DE, OLIVEIRA-SOUZA M. Angiotensin II type 1 receptor-mediated renal hemodynamic and function changes in chronic angiotensin II-infused rats. - submetido ao *AJP - Renal Physiology*.

THIEME K AND OLIVEIRA-SOUZA M. Leptin treatment for 7 and 28 days induces renal morphological and functional changes. - em fase final de redação para submissão ao *AJP - Renal Physiology*.