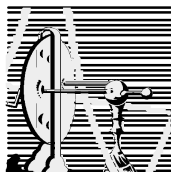


RENATA LOPES ARAUJO

**Função tireóidea em ratos
submetidos à restrição alimentar
ou hiperleptinemia moderada**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS



**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro**

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

RENATA LOPES ARAUJO

**Função tireóidea em ratos
submetidos à restrição alimentar
ou hiperleptinemia moderada**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS

ORIENTADORA: Prof^ª. Denise Pires de Carvalho

Rio de Janeiro
2008

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Endócrina Doris Rosenthal do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a orientação da professora Denise Pires de Carvalho, com apoio financeiro das seguintes instituições:

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro;
(FAPERJ);

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;
(CAPES);

Programa de Apoio a Núcleos de Excelência;
(PRONEX-MCT);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
(CNPq).

*Dedico esta tese as pessoas que sempre me apoiaram,
incentivaram e foram essenciais em minha inserção no mundo
acadêmico: Serjão e Silvinha **(meus pais)**.*

“É um erro capital teorizar antes de ter os dados. Sem se perceber, começa-se a distorcer os fatos para ajustá-los às teorias, em vez de mudar as teorias para que se ajuste aos fatos.”

“*Sherlock Holmes*”

AGRADECIMENTOS

À minha eterna orientadora, **Denise Pires de Carvalho**, que me acompanha desde a iniciação científica (2001) e me acompanhará para sempre, pois segundo suas palavras, assim como não existe ex-mãe também não existe ex-orientadora. Obrigada pela orientação sábia e amiga. Saibas que te admiro pela intensa dedicação à pesquisa e que me inspiras a prosseguir na vida científica.

À professora **Doris Rosenthal**, que colaborou com esta tese, revisando-a com muita competência. Agradeço ainda por toda a sua contribuição (fisiológica e estatística) ao longo do desenvolvimento deste processo.

Às professoras **Tamar Frankenfeld e Vânia Costa**, pelos conselhos e idéias que foram dados durante nossos “meetings” do laboratório.

Aos grandes companheiros de linha de pesquisa, **Álvaro Souto Padrón**, que chegou de mansinho e, simplesmente, “roubou” minha idéia de tratar os animais por, nada mais nada menos, que 3 meses com T2. Obrigada, me livrei de uma boa enrascada. E **Monique Leandro**, que me foi “dada” como um “presente de grego”, durante sua iniciação científica e acabou virando a minha seguidora na linha de pesquisa restrição alimentar. Brincadeiras à parte, nossas parcerias foram muito gratificantes.

À amiga, **Andrea Freitas**, por toda ajuda no tratamento dos animais e nos procedimentos laboratoriais, e ainda, pelas trocas de conhecimentos, que enriqueceram este trabalho.

Ao trio da sala de cultura **Elaine de Souza, Maria Carolina dos Santos e William Braga** pela preciosa ajuda no cultivo e tratamento das células PCCL-3.

Aos meus mais novos alunos de iniciação científica **Fabio Hecht e Juliana Menezes** que chegaram aos “45 do segundo tempo”, mas foram imprescindíveis.

Aos demais amigos de laboratório, **Alba Cenélia, Alexandre Lourenço, Amália Lucy, Ana Lúcia Rocha, Carlos Frederico Gonçalves, Carina Saeta, Daniele Ignácio, Felipe Mousovich, Glória Ginabreda, Iracema Araujo, Karoline Tury, Luciene Cardoso, Mariana Lopes, Mariana Salustiano, Michelle Marassi, Mônica Mühlbauer, Rodrigo Fortunato, Ricardo Cortez, Sabrina Coelho, Thiago Pantaleão**, agradeço por todos os anos de convívio com muita alegria. Nossas boas energias foram essenciais para a realização deste estudo.

Aos técnicos do laboratório, **Advaldo Nunes**, que mesmo dizendo: “Renatinha, isso não vai dar em nada”, nunca me deixou na mão. Muito obrigada. **Norma de Araújo e José Humberto Tavares (Beto)**, por todo o apoio técnico de excelente qualidade.

Ao “figurassa”, **Wagner Nunes**, que ao me conhecer, lá no início da temporada de 2001, simplesmente, cumpria suas exigências laboratoriais, mas ao passar dos anos e das temporadas foi se transformando em um verdadeiro amigo. Como vou me virar sem as nossas bagunças lá no Canadá? Sentirei saudades...

Aos funcionários do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, em especial, **Sandra Brito, Edna Souza e Diogo Cordeiro**, por todos os serviços prestados que influenciaram, direta ou indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pesquisador **Rolando Ceddia** por todas as colaborações, iniciadas no desenvolvimento desta tese, e que se estenderão no Canadá.

Ao meu grande companheiro de trabalho e de vida, **Bruno Moulin de Andrade**, que além de me ajudar com as técnicas desenvolvidas no trabalho, contribuiu com discussões intelectuais sobre o tema e ainda proporcionou muita tranquilidade, em nossa casa, durante toda a preparação do material escrito.

Aos meus queridíssimos **pais Serjão e Silvinha**, e irmãos **Fernanda Araujo, Renato Davi, Saulo Araujo e Camila Haddad**, que souberam compreender minha ausência, em muitos momentos, sempre com muito amor.

Ao mais novo membro da família, **Vitor Araujo Davi**, que trouxe muita alegria com a sua chegada e, conseqüentemente, me ajudou a ter mais inspiração para escrever a tese.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Esquema representativo da fisiologia neuroendócrina da leptina durante a restrição alimentar. ObRb– isoforma longa do receptor de leptina, NPY– neuropeptídeo Y, AGRP– peptídeo relacionado à proteína agouti, α -MSH– melanocortina, CART–transcrito regulado por cocaína e anfetamina, sinal + : efeito estimulatório, sinal - : efeito inibitório (Adaptado de Ahima & Flier, 2000).

Figura 2 - Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireóideos. Tg: tireoglobulina, TPO: tireoperoxidase, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; I^- : iodeto; T4: tiroxina; T3: triiodotironina; TSH-R: receptor do hormônio tireotrófico; NIS: co-transportador de Na^+ e I^- , $\Delta Na^+ - K^+$ ATPase: enzima sódio potássio ATPase (Adaptado de FILETTI *et al*, 1999).

Figura 3 – Esquema representativo das reações de ativação e inativação do T4 pelas desidases tipos 1 (D1), 2 (D2) e 3 (D3) (Adaptado de BIANCO & KIM, 2006).

Figura 4 – Concentração sérica de leptina em experimento-piloto para escolha da dose de leptina (0,2 ug/g). C (controle, n=5), R (restrição alimentar, n=5), L (leptina, n=5). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,05$.

Figura 5 - Esquema representativo da metodologia experimental do estudo 1.

Figura 6 - Esquema representativo da metodologia experimental do estudo 2.

Figura 7 - Esquema representativo da metodologia experimental do estudo 3 (modelo PCCL-3).

Figura 8 – Controle da ingestão alimentar em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. A seta representa o 1º dia de administração de leptina. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância $p < 0,05$.

Figura 9 – Ganho de massa corporal em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. A seta representa o 1º dia de administração de leptina. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,001$.

Figura 10 – Compartimentos de gorduras retroperitoneal (A) e epididimal (B) em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância $p < 0,05$.

Figura 11 – Concentração sérica de leptina em ratos controle (C) e tratados com leptina (L) após 10 dias de administração de baixa dose de leptina. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância $p < 0,05$.

Figura 12 – Concentração sérica de TSH (A), T4 (B) e T3 (C) em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$.

Figura 13 – Concentração sérica de corticosterona em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos.

Figura 14 – Atividade desidase tipo 1 na tireóide (A), no fígado (B) e no rim (C) em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos.

Figura 15 – Atividade desidase tipo 2 no hipotálamo (A), na hipófise (B) e no tecido adiposo marrom (C) em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância * $p < 0,05$.

Figura 16 – Captação de radioiodo pelo NIS (A), e atividade da enzima TPO (B) em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância * $p < 0,05$.

Figura 17 – Massa corporal em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. A seta representa o 1º dia de administração de leptina. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,05$.

Figura 18 – Compartimentos de gorduras retroperitoneal (A) e epididimal (B) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,01$.

Figura 19 – Concentração sérica de leptina em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,001$.

Figura 20 – Concentração sérica de TSH (A), T4 (B) e T3 (C) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância de pelo menos $p < 0,01$.

Figura 21 – Concentração sérica de corticosterona em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,05$.

Figura 22 – Atividade desidase tipo 1 na tireóide (A), no fígado (B) e no rim (C) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,05$.

Figura 23 – Atividade desidase tipo 2 no hipotálamo (A), na hipófise (B) e no tecido adiposo marrom (C) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,05$.

Figura 24 – Captação de radioiodo pelo NIS (A), e atividade da enzima TPO (B) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância de pelo menos $p < 0,05$.

Figura 25 – Captação de radioiodo pelo NIS em células PCCL-3 tratadas com leptina por 72 horas. Os resultados estão expressos como percentual relativo ao controle. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância $***p < 0,001$.

Tabela 1 – Resumo dos resultados sobre a função tireóidea. Os dados estão comparados ao grupo controle.

Tabela 2 – Representação esquemática dos resultados dos hormônios séricos. Os dados estão comparados ao grupo controle.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH – hormônio estimulador de α -melanócitos ou melanocortina

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

AgRP – peptídeo relacionado à proteína agouti

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

ATP – adenosina trifosfato

CART – transcrito regulado por cocaína e anfetamina

CPM – contagem por minuto

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

D1 – desidase tipo 1

D2 – desidase tipo 2

D3 – desidase tipo 3

DIT – diiodotirosina

DTT – ditioneitol

GH – hormônio do crescimento

h - horas

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

Jak – via de sinalização Janus-cinase

Jak-STAT – via de transdução de sinal Jak-STAT

m.c. – massa corporal

MCH – hormônio concentrador de melanina

MIT – moniodotirosina

MTT – 3-4,5-dimetiltiazol-2,5-brometo de difeniltetrazolium

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato

NIS – co-transportador Na^+/I^-

NPY – neuropeptídeo Y

Ob-R – receptor de leptina

Ob-Rb - isoforma longa do receptor de leptina

Ob-Re - isoforma curta do receptor de leptina

pH – potencial hidrogeniônico

POMC – proopimelanocortina

PTU – propiltiouracil

RIE - radioimunoensaio

RNAm – ácido ribonucléico mensageiro

rT3 – 3, 3, 5'triiodotironina

s.c. – subcutânea

SEM – Erro padrão da média

SFB – soro fetal bovino

SNC – sistema nervoso central

SOCS – membro da família de supressores da sinalização de citocinas

STAT – sinal ativador de transcrição e tradução

T2 – 3, 5' diiodotironina ou 3, 3' diiodotironina

T3 – 3, 5, 3' triiodotironina

T4 – 3, 5, 3', 5 tetraiodotironina ou tiroxina

TAM – tecido adiposo marrom

TCA – ácido tricloroacético

Tg - tireoglobulina

TPO –tireoperoxidase

TRH – hormônio liberador de tireotrofina

TSH – hormônio estimulador da tireóide ou tireotrofina

TSH-R – receptor de TSH

RESUMO

A regulação da ingestão e da massa corporal é bastante complexa, devido ao envolvimento de vários hormônios, neurotransmissores e peptídeos, modulando respostas tanto no SNC como em tecidos periféricos. A leptina e os hormônios tireóideos participam deste processo, desempenhando importante papel na regulação do balanço energético. No presente trabalho, avaliamos os efeitos da leptina sobre a função tireóidea de ratos submetidos à restrição alimentar de 40% por 25 dias (grupos R e RL), ou alimentados *ad libitum* (grupos C e L). Após 25 dias de restrição alimentar houve diminuição nas concentrações séricas de leptina, TSH, T3 e T4, e aumento na corticosterona. A reposição de leptina nos 10 últimos dias de restrição restaurou a leptinemia, reverteu a queda do TSH sem modificar o T4 e a corticosterona, mas causou aumento no T3, apesar de não o ter restaurado aos níveis séricos do controle. A hiperleptinemia moderada promovida nos animais do grupo L causou redução no T4 e T3, sem modificar o TSH, a corticosterona e a D1 hepática e renal, mas aumentou a D2 TAM. A atividade da D1, diminuída pela restrição, foi restaurada pela reposição de leptina no fígado e rim, mas não na tireóide. Durante a restrição, a D2 aumentada no hipotálamo, e diminuída no TAM, foi restaurada após a reposição de leptina, enquanto a D2 hipofisária, inalterada durante a restrição, foi diminuída pela leptina. A atividade da TPO diminuiu na restrição e a leptina exógena não reverteu essa diminuição, no entanto a atividade do NIS, que não foi modificada pela restrição, foi significativamente reduzida pelo tratamento com leptina nos grupos R, L e, ainda, em cultura de células PCCL-3. Considerando esses dados, podemos concluir que a leptina exerce ação direta sobre os tireócitos, inibindo o NIS e sobrepondo-se ao efeito estimulatório do TSH. Entretanto, mais estudos são necessários para se esclarecer a via de sinalização modulada pela leptina no tireócito. Em conclusão, além do papel na regulação central do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, a leptina exerce efeito periférico direto tanto sobre a glândula tireóide quanto sobre a atividade das desidases em diversos tecidos.

ABSTRACT

Understanding the regulation of food intake and body mass is complex, mainly due to the fact that several hormones, peptides, neurotransmitters are involved, modulating responses both in the central nervous system and in peripheral tissues. Leptin and thyroid hormones play a relevant role in the regulation of energy balance. Our goal was to evaluate the thyroid function of rats that were fed *ad libitum* (C, L) or 40% food-restricted (R, RL) for 25 days and received or not leptin replacement for the last 10 days of decreased caloric intake. Caloric restriction for 25 days led to significantly reduced serum leptin, TSH, T4, T3 and increased serum corticosterone, while liver, kidney and thyroid type 1 deiodinase (D1) and brown adipose tissue type 2 deiodinase (D2) activities were decreased, and hypothalamic D2 was significantly increased. Interestingly, thyroid iodide uptake was unchanged by caloric restriction, but thyroperoxidase activity was significantly reduced. Leptin replacement for the last 10 days of caloric restriction normalized serum leptin and TSH levels, but serum T4 and T3 levels, and thyroid D1 and TPO activities were not reestablished. In the L group the moderate hyperleptinemia produced both T4 and T3 reduction, without changes in serum TSH or corticosterone, and normal thyroid, liver and kidney D1 but higher BAT D2. A negative effect of leptin administration on NIS function was detected in the RL, L and even in PCCL3 cells. During caloric restriction, liver and kidney D1 and hypothalamic and BAT D2 were normalized by leptin, while pituitary D2 was significantly decreased. In conclusion, a tissue-specific modulation of deiodinases might be implicated in the normalization of thyroid function during leptin replacement in food-restricted rats. Although leptin restores the hypothalamus-pituitary axis during food restriction, it exerts a direct negative effect on the thyroid gland, thus normalization of serum thyroid hormones might depend on changes in deiodinase activities and the long-term thyroid stimulation by TSH to counterbalance the direct negative effects of leptin on the thyroid gland.

SUMÁRIO

Lista de figuras e tabelas	viii
Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xv
Abstract	xvi
Sumário	xvii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – LEPTINA	1
a) Os genes ob e db	2
b) Regulação da síntese	4
c) O papel da leptina na homeostase energética	5
1.2 – HORMÔNIOS DA TIREÓIDE	10
a) Aspectos anatômicos e histológicos	10
b) Biossíntese dos hormônios tireóideos	11
c) Metabolismo periférico dos hormônios tireóideos	18
d) Regulação da função tireóidea	24
1.3– TIREÓIDE e LEPTINA	27
2 – OBJETIVOS	30
2.1 – OBJETIVO GERAL	30
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 – METODOLOGIA	31

3.1 – <u>ESTUDO 1</u> : Efeito da leptina sobre a função tireóidea em ratos alimentados <i>ad libitum</i>	31
3.2 – <u>ESTUDO 2</u> : Efeito da reposição de leptina sobre a função tireóidea de ratos submetidos à restrição alimentar (40%)	34
3.3 – <u>ANÁLISES</u> (Estudos 1 e 2)	38
3.3.1 - Radioimunoensaios (RIEs)	38
3.3.2 – Função tireóidea	40
3.3.3 - Atividade das enzimas iodotironina-desiodases	42
3.4 - <u>ESTUDO 3</u> : Efeito da leptina em linhagem de célula de tireóide	46
3.5 - <u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	50
4 – RESULTADOS	51
4.1 – <u>ESTUDO 1</u> : Efeito da leptina sobre a função tireóidea em ratos alimentados <i>ad libitum</i>	51
4.1.1 – <u>Ingestão alimentar, massa corporal e conteúdo de gordura</u>	51
4.1.2 – <u>Concentração sérica hormonal</u> –	53
4.1.3 – <u>Desiodases</u> –	56
4.1.4 – <u>Biossíntese hormonal tireóidea</u> –	59
4.2 – <u>ESTUDO 2</u> : Efeito da reposição de leptina sobre a função tireóidea de ratos submetidos à restrição alimentar (40%)	60
4.2.1 – <u>Composição corporal</u> –	60
4.2.2 – <u>Concentração sérica hormonal</u>	62
4.2.3 – <u>Desiodases</u> –	65

4.2.4 – <u>Biossíntese hormonal tireóidea</u> –	67
4.3 – <u>ESTUDO 3</u> : Efeito da leptina em linhagem de célula de tireóide	68
4.4 – <u>RESUMO DOS RESULTADOS</u>	70
5 – DISCUSSÃO	71
6 – CONCLUSÃO	84
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXO 1	98

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - LEPTINA

Indícios da existência de um sistema fisiológico responsável pela regulação homeostática da massa corporal foram acumulados ao longo dos anos. A descoberta da leptina, em 1994, pelo grupo do doutor Friedman, representou importante marco para o entendimento molecular do controle da ingestão alimentar. Inicialmente, o interesse científico na molécula de leptina estava exclusivamente relacionado ao seu potencial terapêutico no tratamento da obesidade. No entanto, hoje já se sabe que este hormônio também exerce influência direta sobre os sistemas hematopoiético (UMEMOTO *et al*, 1997), imune (FAGGIONI *et al*, 2001), reprodutor (HOGGARD *et al*, 1997), cardiovascular (WINNICKI *et al*, 2001; SADER *et al*, 2003), neuroendócrino (AHIMA *et al*, 2000) e no metabolismo ósseo (THOMAS & BURGUERA 2002).

Nos últimos 10 anos, avanços consideráveis foram obtidos na caracterização dos mecanismos hipotalâmicos de controle da ingestão alimentar e da homeostase energética. Em grande parte, tais avanços foram possíveis graças à clonagem dos genes da leptina (*ob*) e de seu receptor (*db*), além dos inúmeros estudos sobre a ação da leptina no sistema nervoso central (SNC) (ZHANG *et al*, 1994).

Acredita-se hoje que um dos maiores desafios para a ciência seja a possibilidade da descoberta de alvos mais específicos envolvidos na regulação neuroendócrina da ingestão alimentar e do gasto energético, possibilitando melhores abordagens terapêuticas da obesidade.

a) Os genes *ob* e *db*

A leptina é o produto do **gene *ob*** expresso, principalmente, mas não exclusivamente, no tecido adiposo branco. A síntese de leptina é também detectada na placenta, na mucosa fúndica gástrica, no músculo esquelético e no epitélio mamário (MASUZAKI *et al*, 1997).

O **gene *ob*** codifica um RNAm de 4.5 Kb que origina uma proteína com 167 aminoácidos. Na corrente sangüínea, a leptina circula como uma proteína não glicosilada de 16 kDa com 146 aminoácidos. A estrutura cristalina da leptina assemelha-se muito à das citocinas (AHIMA & FLIER, 2000). Há forte correlação positiva entre os níveis de RNAm para leptina no tecido adiposo e suas concentrações séricas (CONSIDINE *et al*, 1996).

Mutações no **gene *ob*** levam à deficiência de leptina. Camundongos ***ob/ob*** têm deleção no **gene *ob*** e apresentam hiperfagia, hipotermia, obesidade mórbida e inúmeras anormalidades metabólicas e neuroendócrinas. Em seres humanos, o quadro de deficiência de leptina é caracterizado por hiperfagia, obesidade mórbida e hipogonadismo hipotalâmico. Os camundongos ***ob/ob*** apresentam hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipercortisolismo e hipotermia, mas essas alterações metabólicas ainda não foram observadas em seres humanos leptino-deficientes (MONTAGUE *et al*, 1997). Ainda são desconhecidas as razões que levam a essas diferenças entre as espécies, mas elas sugerem que existam substanciais divergências nas ações fisiológicas da leptina entre seres humanos e roedores (AHIMA *et al*, 2000).

Os efeitos da leptina são desencadeados através de sua interação com o seu receptor (Ob-R) codificado pelo **gene *db***. O receptor da leptina pertence à família de receptores de citocinas classe 1. O **gene *db*** pode codificar 6 isoformas de receptor (Ob-Ra, **b**, **c**, **d**, **e**, **f**), resultantes de diferentes *splicings* (BJORBAEK *et al*, 1997).

Todas as isoformas possuem o mesmo domínio extracelular amino-terminal de ligação ao hormônio, porém diferem entre si quanto ao domínio intracelular carboxi-terminal. A isoforma Ob-**Re** não apresenta domínio transmembrana nem intracelular, circulando como um receptor solúvel. As demais isoformas apresentam diferentes domínios intracelulares, todavia, somente a isoforma Ob-**Rb**, conhecida como isoforma longa, contém todas as regiões intracelulares necessárias à ativação da via de sinalização *Janus-Kinase* (Jak) e do sinal ativador de transcrição e tradução (STAT). Essa via é conhecida como via Jak-STAT. As isoformas curtas são capazes de ativar a via Jak, mas incapazes de ativar o STAT, inviabilizando a ação da leptina sobre a ingestão alimentar (AHIMA & FLIER, 2000).

A leptina se liga com alta afinidade ao homodímero Ob-R, desencadeando a ativação da JAK2. Alterações nessa via de sinalização, como atenuação da fosforilação do STAT-3 ou diminuição da expressão do receptor inviabilizam a ação da leptina, conforme demonstrado em ratos Wistar idosos (GALAZ *et al*, 2002). Em outro estudo, também utilizando ratos Wistar idosos, um modelo clássico de resistência periférica à insulina e central à leptina, encontrou-se inibição da atividade Jak por um membro da família de supressores da sinalização de citocinas (SOCS-3) (PERALTA *et al*, 2002). No hipotálamo, a leptina aumenta os níveis de RNAm do SOCS-3, sugerindo ser este um mediador da resistência à leptina (PERALTA *et al*, 2002).

O Ob-**Rb** está presente em regiões hipotalâmicas, co-localizado com o fator de transcrição STAT3 e neuropeptídeos importantes para a ação anorexígena da leptina (HAKANSSON & MEISTER, 1998). Além da localização hipotalâmica, já se sabe que o receptor de isoforma longa também está presente na hipófise (JIM *et al*,

1999 & 2000) e na tireóide (NOWAK *et al*, 2002). Todavia, os efeitos mediados pela ação direta da leptina nessas glândulas ainda são pouco conhecidos.

As isoformas curtas (Ob-Ra, **c**, **d**, **e**, **f**) são expressas no plexo coróide, no endotélio vascular e em tecidos periféricos como os rins, o fígado, os pulmões e as gônadas (ELMQUIST *et al*, 1998). O efeito da leptina sobre o metabolismo energético parece ser mediado apenas pela isoforma longa, enquanto as isoformas curtas parecem ser responsáveis pelo transporte da leptina até o local de ação hormonal (AHIMA *et al*, 2000).

Mutações no **gene db** causam, em camundongos, insensibilidade à leptina, hiperfagia, obesidade mórbida, anormalidades metabólicas e neuroendócrinas, incluindo hipercortisolismo e hipogonadismo hipotalâmico (HALAAS *et al*, 1995). Em seres humanos, as mutações no Ob-R são extremamente raras e, assim como as mutações no gene *ob*, causam hiperfagia, surgimento precoce da obesidade e hipogonadismo hipotalâmico. Além dessas alterações ainda há comprometimento nas secreções do hormônio estimulador da tireóide (TSH) e hormônio do crescimento (GH). Diferente do camundongo **db/db**, a mutação em seres humanos não está associada com hiperglicemia, hipercortisolismo e hipotermia (CLEMENT *et al*, 1998).

b) Regulação da síntese

A síntese da leptina é influenciada pela quantidade de tecido adiposo corporal. O tamanho do adipócito é um importante determinante da síntese, pois quanto maior é o tamanho da célula, maior é o conteúdo de leptina, como observado em um mesmo indivíduo com diferentes tamanhos de adipócitos (HAMILTON *et al*, 1995). A correlação entre os níveis sanguíneos de leptina e o conteúdo corporal de

tecido adiposo é direta. No entanto, a concentração sérica de leptina decai algumas horas após o início do jejum, sem correlação direta com a redução do conteúdo de tecido adiposo (SALADIN *et al*, 1995).

O efeito dos nutrientes sobre a regulação da leptina parece ser mediado, em parte, pela insulina. Em seres humanos, observa-se forte correlação entre o aumento da expressão de leptina e o pico de secreção de insulina durante os ciclos alimentares. Em cultura de células adiposas, a insulina estimula diretamente a síntese de leptina (KOLACZYNSKI *et al*, 1996). Durante o jejum a queda nos níveis de insulina é seguida do declínio nos níveis de leptina (BODEN *et al*, 1996).

A expressão da leptina também é regulada por outros hormônios, conforme revisto por Ahima *et al* em 2000, o tratamento em doses farmacológicas com glicocorticóides, tanto em cultura de células como em roedores e seres humanos, estimulou a síntese de leptina. No entanto, a regulação da leptina por níveis fisiológicos de glicocorticóides ainda é pouco compreendida. Além da regulação pelos hormônios, a síntese de leptina também pode ser positivamente regulada por infecção aguda, endotoxinas e citocinas pró-inflamatórias e negativamente regulada por exposição ao frio, catecolaminas e ativação dos receptores β -adrenérgicos (Ahima *et al*, 2000).

c) O papel da leptina na homeostase energética

A classificação da leptina como fator anti-obesidade é baseada na sua capacidade de inibir a ingestão alimentar, aumentar o gasto energético e, por conseqüência, diminuir a massa corporal e a adiposidade. A leptina parece exercer seus efeitos sobre o metabolismo energético atuando em distintas regiões do encéfalo, através do receptor de isoforma longa (Ob-Rb). A presença desse receptor

no hipotálamo parece ser maior no núcleo arqueado (TARTAGLIA, 1997; SCHWARTZ *et al*, 2000; PEREIRA DA SILVA *et al*, 2003). No entanto, lesões hipotalâmicas ventrobasais desencadeiam anormalidades no balanço energético que se assemelham às descritas nas mutações de camundongos *ob/ob* e *db/db*. Além disso, injeções intravenosas de leptina ativam neurônios hipotalâmicos localizados em diferentes núcleos como o ventromedial, o dorsomedial e, ainda, nos circuitos neuronais do tronco cerebral que regulam o comportamento alimentar e o balanço energético (AHIMA *et al*, 2000).

Até o presente, duas sub-populações de neurônios foram bem caracterizadas no núcleo arqueado. Uma expressa os neurotransmissores orexigênicos: neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado à proteína agouti (AgRP) enquanto a outra expressa os neurotransmissores anorexigênicos: hormônio estimulante de α -melanócitos (α -MSH) e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) (AHIMA & FLIER, 2000).

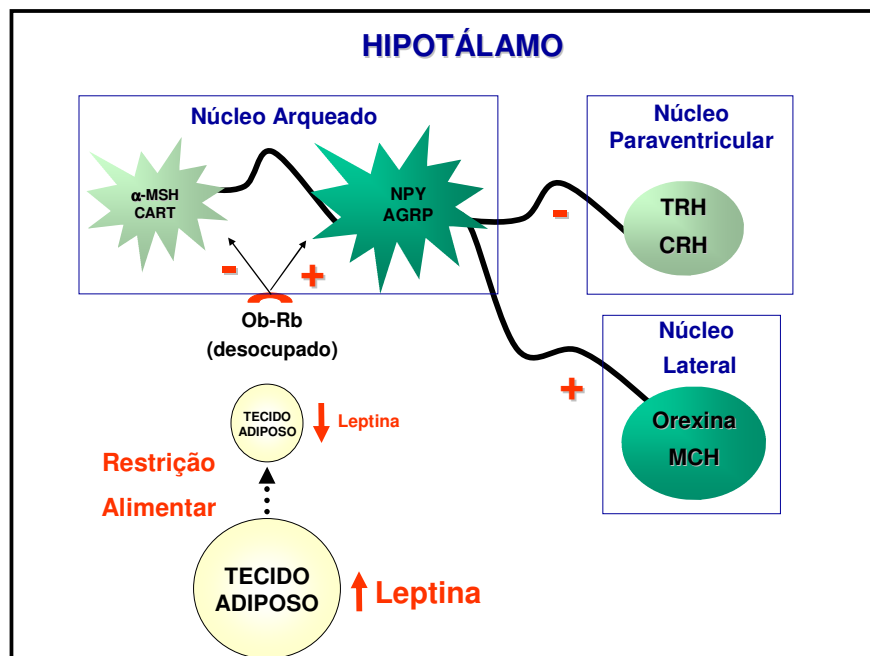
Neurônios α -MSH/CARTérgicos do núcleo arqueado possuem conexões inibitórias curtas com os neurônios NPY/AgRPérgicos e conexões inibitórias longas com neurônios localizados no núcleo hipotalâmico lateral, além de possuírem também conexões excitatórias longas com neurônios do núcleo paraventricular (SCHWARTZ *et al*, 2000). As conexões dos neurônios NPY/AgRPérgicos são inibitórias longas com o núcleo paraventricular e excitatórias longas com o núcleo hipotalâmico lateral (SCHWARTZ *et al*, 2000).

As conexões de ambos os tipos de neurônios se fazem com duas sub-populações distintas tanto no núcleo paraventricular quanto no núcleo hipotalâmico lateral. No núcleo paraventricular existem neurônios que expressam os neurohormônios: hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e hormônio liberador de

tireotrofina (TRH) (SCHWARTZ *et al*, 2000). Ambos os neurotransmissores têm funções anorexigênicas e pró-termogênicas, sendo que o TRH tem ação, predominantemente, pró-termogênica, enquanto CRH desempenha predominantemente função anorexigênica (SCHWARTZ *et al*, 2000 & FLIER 2004). Por outro lado, no núcleo hipotalâmico lateral também foram caracterizadas duas sub-populações distintas, uma delas expressando a orexina, com papel predominantemente orexigênico, e a outra expressando o hormônio concentrador de melanina (MCH), com papel predominante, porém não exclusivamente, anti-termogênico (SCHWARTZ *et al*, 2000; PEREIRA DA SILVA *et al*; FLIER 2004).

Num ambiente onde predominam os **baixos níveis de leptina**, como, por exemplo, durante privação energética prolongada, a maior parte dos receptores Ob-Rb no núcleo arqueado está desocupada (**Figura 1**). Nesta situação, predominam os sinais e conexões **excitatórios** para os neurônios **NPY/AgRPérgicos** e os sinais e conexões **inibitórios** para os **α -MSH/ CARTérgicos** (FLIER, 2004). Como resultado, há aumento da expressão de orexina e MCH no núcleo hipotalâmico lateral, acompanhado da redução da expressão de TRH e CRH no núcleo paraventricular (SCHWARTZ *et al*, 2000). Por outro lado, após uma refeição ou quando há discreto ganho de massa de tecido adiposo, há elevação dos níveis de leptina, desencadeando redução da expressão de orexina e MCH no núcleo hipotalâmico lateral e aumento da expressão de TRH e CRH no núcleo paraventricular (SCHWARTZ *et al*, 2000).

Figura 1 – Esquema representativo da fisiologia neuroendócrina da leptina durante a restrição alimentar. ObRb– isoforma longa do receptor de leptina, NPY– neuropeptídeo Y, AGRP– peptídeo relacionado à proteína agouti, α -MSH–melanocortina, CART–transcrito regulado por cocaína e anfetamina, TRH – hormônio liberador de tireotrofina, CRH – hormônio liberador de corticotrofina, MCH – hormônio concentrador de melanina, sinal + : efeito estimulatório, sinal - : efeito inibitório (Adaptado de Ahima & Flier, 2000).



Os neurotransmissores expressos no núcleo hipotalâmico lateral e no núcleo paraventricular não são os efetores finais deste complexo sistema de controle da fome e da homeostase energética, mas suas participações são indispensáveis para que ocorra um funcionamento adequado e integrado de todo o sistema. Somente através da modulação de intermediários periféricos é que os sinais de fome e/ou saciedade serão convertidos em respostas funcionais adequadas que, em última instância, manterão um ajuste entre a ingestão alimentar e a termogênese, resultando na estabilidade da massa corporal.

A sobrevivência dos inúmeros organismos é dependente da capacidade de procurar, usar e conservar energia eficientemente. Seres humanos e outros mamíferos possuem complexos mecanismos desenvolvidos para manter constante o

suporte energético necessário ao funcionamento celular. Por exemplo, a redução na ingestão alimentar (dietas hipocalóricas e/ou jejum) conduz ao decréscimo de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) séricos com simultânea elevação do T3 reverso (rT3), um derivado metabólico inativo (AHIMA *et al*, 2000), demonstrando a capacidade adaptativa do organismo. Diante dessa situação há também redução significativa no gasto de energia e nas concentrações séricas de leptina (ARAUJO *et al*, 2008).

Tendo em vista que o receptor da leptina foi encontrado na hipófise humana, de camundongos e de ratos (JIM *et al*, 1999 & 2000), e na tireóide de ratos (NOWAK *et al*, 2002), poderia se imaginar que além da influência central sobre a expressão de TRH, durante o ajuste da homeostase energética, a leptina também possa exercer ação direta sobre a secreção de TSH e dos hormônios da tireóide.

1.2 - HORMÔNIOS DA TIREÓIDE

Os hormônios T3 e T4 desempenham papel crítico na diferenciação, no crescimento e no metabolismo celulares. Seus principais efeitos, na vida extra-uterina, estão vinculados à regulação do consumo de oxigênio e da taxa metabólica, por isso são fundamentais para o funcionamento normal de quase todos os tecidos (YEN, 2001). Os hormônios tireóideos são importantes mediadores da homeotermia, pois um dos seus principais efeitos biológicos é a aceleração do metabolismo energético e do *turnover* de ATP com resultante consumo de energia e produção de calor.

a) Aspectos anatômicos e histológicos

A síntese dos hormônios tireóideos é realizada pela glândula tireóide que se localiza abaixo da cartilagem cricóide e é composta por dois lobos unidos por um istmo, estando aderida às regiões anterior e lateral da traquéia (LARSEN *et al*, 2002).

A unidade morfo-funcional da tireóide é o folículo, que é constituído por uma única camada de células epiteliais envolvendo uma região central contendo material gelatinoso, denominado colóide. A superfície celular em contato com o lúmen apresenta microvilosidades que aumentam consideravelmente a área de contato entre a membrana apical e o colóide (CAPEN, 1996).

As células epiteliais ou foliculares apresentam alturas variáveis, podendo ser pavimentosas, cúbicas ou cilíndricas. A altura indica a intensidade do estímulo: quanto menor for o estímulo, mais achatadas as células se apresentam. Em condições normais as células foliculares são cubóides. O colóide é constituído por mucoproteínas e uma glicoproteína chamada tireoglobulina. A tireoglobulina sofre

iodação e corresponde à molécula na qual há armazenamento dos hormônios tireóideos, a triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4). A tireoglobulina é endocitada e hidrolisada para liberação desses hormônios (ROSS *et al*, 1993).

b) Biossíntese dos hormônios tireóideos

Metabolismo do iodo

O iodo é essencial para a síntese hormonal tireóidea, sendo necessário que esteja disponível em concentrações adequadas para que quantidades normais de hormônios tireóideos sejam sintetizadas. O iodo é naturalmente encontrado na água e em determinados alimentos como frutos do mar. Atualmente é adicionado ao sal de cozinha e, ainda, pode ser encontrado em medicamentos, agentes de diagnóstico, suplementos dietéticos e aditivos alimentares. A ingestão diária de iodo é bastante variável, dependendo do conteúdo de iodo presente no solo e na água de diferentes regiões. Do iodeto ingerido, uma mínima porção é perdida nas fezes, sendo a maior parte absorvida rapidamente pelo trato gastrointestinal. O iodeto presente no fluido extracelular pode ser perdido no ar expirado ou através da pele, entretanto, os principais órgãos envolvidos na depuração do iodo são a tireóide e os rins. O iodeto é filtrado pelo glomérulo renal, sendo a maior parte reabsorvida nos túbulos renais por processo passivo (LARSEN *et al*, 2002).

Transporte do iodo

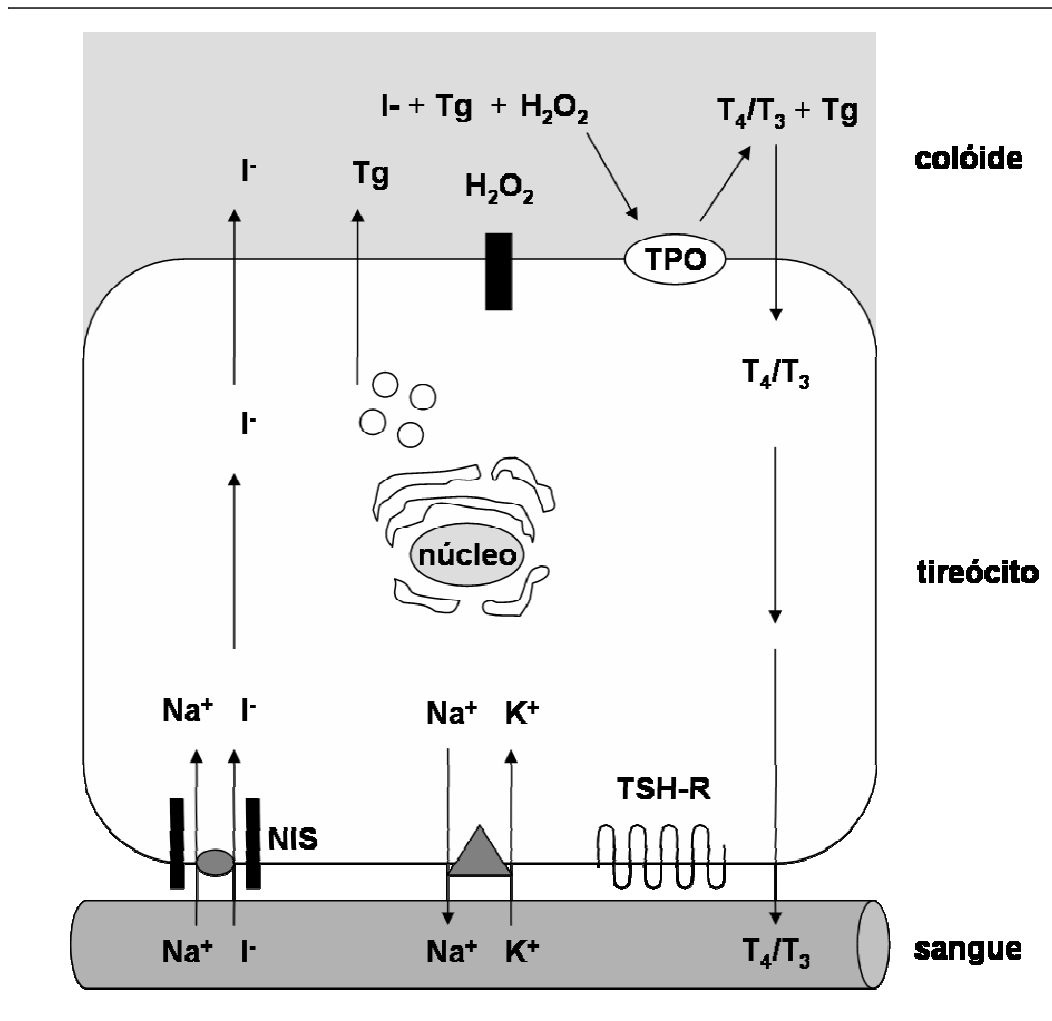
A primeira etapa da biossíntese dos hormônios tireóideos é o transporte ativo do iodeto para o interior do tireócito. Este transporte é realizado pelo co-transportador Na^+/I^- (NIS) (**Figura 2**) (DOHAN *et al*, 2003). O NIS é uma glicoproteína integral de membrana, localizada na membrana basolateral das células foliculares tireóideas, que acopla o transporte de Na^+ a favor do seu gradiente eletroquímico com o transporte de I^- contra o seu gradiente, ambos em direção ao interior da célula folicular (KAMINSKY *et al*, 1994). Para que este transporte ocorra, é necessário que haja disponibilidade de ATP como fonte de energia da Na^+/K^+ -ATPase (LARSEN *et al*, 2002). A atividade da Na^+/K^+ -ATPase é fundamental para a manutenção do gradiente de sódio entre os meios intra- e extracelulares. A atividade do NIS é eletrogênica e sódio-dependente, sendo a estequiometria do co-transporte $2\text{Na}^+:1\text{I}^-$. (ESKANDARI *et al*, 1997). O gene do NIS foi clonado em 1996 (DAI & CARRASCO, 1996; SMANIK *et al*, 1996) e posteriormente foi demonstrado que o NIS também realiza o transporte ativo de I^- em outros tecidos, tais como: glândulas salivares, mucosa gástrica e glândula mamária lactante (DOHAN *et al*, 2003).

Uma vez que o iodeto se encontre no interior da célula folicular tireóidea, ele é transportado através da membrana apical para o colóide. O transporte apical de iodeto é realizado pela pendrina, um transportador de I^- e Cl^- (SCOTT *et al*, 1999). O hormônio estimulador da tireóide (TSH, também chamado de tireotrofina) é capaz de aumentar o transporte de iodeto, efeito este mediado pelo aumento da concentração intracelular de AMP cíclico (AMPc). Em resposta ao aumento de AMPc há aumento dos níveis de RNAm para o NIS e da expressão da proteína (DOHAN *et al*, 2003). O TSH também parece regular o NIS em nível pós-transcricional, influenciando sua

distribuição subcelular. Riedel *et al* (2001) mostraram que, na ausência de TSH, o NIS é redistribuído da membrana plasmática para compartimentos intracelulares.

Recentemente, além do TSH, tem-se evidenciado o envolvimento da leptina na regulação do transporte de iodeto. O tratamento das células FRTL-5 (linhagem celular derivada de tireóide murina) com leptina suprime a captação de I^- previamente estimulada por TSH (ISOZAKI *et al*, 2004). Além disso, em animais alimentados a leptina parece inibir a captação de iodeto quando administrada agudamente, embora cronicamente determine aumento da captação de iodeto (OLIVEIRA *et al*, 2007). Esses resultados sugerem que a leptina exerça efeito direto sobre a glândula tireóide; no entanto, os achados ainda são insuficientes para se concluir se o efeito da leptina é inibitório ou estimulatório sobre a captação de iodeto. Tendo em vista que a leptina, seu RNAm e seu receptor foram encontrados na hipófise humana, de camundongos e de ratos (JIM *et al*, 1999 & 2000), pode-se imaginar também um efeito mediado pela ação da leptina sobre a secreção de TSH, com conseqüente efeito sobre o NIS.

Figura 2 - Esquema representativo da biossíntese dos hormônios tireóideos. Tg: tireoglobulina, TPO: tireoperoxidase, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; I⁻: iodeto; T4: tiroxina; T3: triiodotironina; TSH-R: receptor do hormônio tireotrófico; NIS: co-transportador de Na^+ e I^- , $\Delta Na^+ - K^+$ ATPase: enzima sódio potássio ATPase (Adaptado de FILETTI *et al*, 1999).



Oxidação do iodeto e organização do iodo

A biossíntese de T₃ e de T₄ inicia-se com a oxidação do iodeto e a sua organização. A oxidação, em geral, ocorre de maneira muito rápida e o iodeto oxidado é incorporado principalmente à tireoglobulina. A enzima responsável pela catálise destas reações é a tireoperoxidase (TPO) (**Figura 2**). A TPO é uma hemoproteína glicosilada, presente na membrana plasmática apical do tireócito,

tendo seu domínio catalítico voltado para o colóide. Atualmente, se aceita a hipótese de que na TPO oxidada há dois sítios para substrato, um para o I^- e outro para a tirosina. Tanto um substrato quanto o outro sofrem oxidação monoeletrônica, com conseqüente formação dos radicais livres correspondentes (I^\bullet e Tyr^\bullet). Estes substratos oxidados sofrem adição de radical, o que leva à formação de um complexo terciário. Há, então, liberação do produto, monoiodotirosina (**MIT**). Enquanto ainda ligada à TPO, a MIT pode sofrer uma oxidação monoeletrônica adicional, podendo, então, reagir com I^\bullet , formando diiodotirosina (**DIT**) (TAUROG, 2000).

O TSH estimula a atividade da tireoperoxidase através do aumento da transcrição do gene para a TPO e da meia-vida do seu RNAm (CHAZENBALK *et al*, 1987).

Formação das iodotironinas

Concluindo-se a formação de MIT e DIT, a etapa seguinte para a síntese dos hormônios tireóideos é o acoplamento entre as iodotirosinas. Como conseqüência deste acoplamento, ocorre a formação de diversas iodotironinas, dentre as quais, T3 e T4 (**Figura 2**). Para tal, duas iodotirosinas são oxidadas a radicais livres e, em seguida, ocorre interação dos radicais iodotirosil através de um intermediário quinoléter, com formação de iodotironinas (Taurog, 2000). O acoplamento entre 1 MIT e 1 DIT dá origem à 3,5,3'-triiodotironina ou T3, enquanto o acoplamento de duas moléculas de DIT leva à formação de 3,5,3',5'-tetraiodotironina ou tiroxina (T4). A TPO é a enzima responsável por esta reação, necessitando de H_2O_2 como substrato, gerado por uma enzima ou complexo enzimático que utiliza NADPH, ou seja, uma NADPH oxidase (VIRION *et al*, 1984). Não ocorre acoplamento entre

resíduos tirosil não iodados, já que tironina não-iodada não é um constituinte da tireoglobulina. Isto sugere que seja necessário ocorrer antes a reação de iodação para que então haja o acoplamento. A relação T4/T3 encontrada na molécula de tireoglobulina depende da disponibilidade relativa de MIT e de DIT. A formação de T3 é favorecida na presença de baixos níveis de iodo e quantidades maiores de MIT, enquanto a síntese preferencial de T4 ocorrerá em situações nas quais haja mais DIT e maior disponibilidade de iodo. Há várias possibilidades de acoplamento entre iodotirosinas, podendo haver até formação de 3,3',5'- T3 (T3 reverso), 3,5-T2, 3,3'-T2, dentre outras (BIANCO & KIMURA, 1999).

Dentre os 134 resíduos tirosil presentes na molécula homodimérica de tireoglobulina, apenas 25 a 30 são passíveis de serem iodados, sugerindo que apenas determinadas regiões da proteína participam desta reação. Para a reação de acoplamento, a limitação é ainda maior: apenas 6 a 8 resíduos de iodotirosina reagem entre si, com conseqüente formação de 3 a 4 iodotironinas. Em situações normais, quando não há carência ou excesso de iodo, cada molécula de tireoglobulina pode conter até 3 a 4 moléculas de T₄, enquanto o T₃ só é encontrado em 1 entre 5 moléculas de tireoglobulina (LARSEN *et al*, 2002).

Ao se comparar a tireóide com outras glândulas endócrinas, observa-se que a primeira estoca grandes quantidades de hormônio e que o “*turnover*” destes hormônios é bem mais lento. Isto pode ser muito importante em termos homeostáticos, pois, havendo reserva, é possível evitar que as concentrações hormonais decaiam bruscamente em situações de deficiência de síntese. Isto pode ser melhor observado quando se administra medicamentos anti-tireóideos, em seres humanos adultos normais, em dose suficiente para bloquear a síntese hormonal, uma vez que somente após duas semanas de tratamento é possível observar um

leve declínio nas concentrações séricas de T4 em seres humanos (LARSEN *et al*, 2002). Em ratos, a diminuição de T4 é muito mais rápida e já ocorre com 5 dias de tratamento com metimazole (MMI) uma droga anti-tireóidea (MOREIRA *et al*, 2005 & GROZOVSKY *et al*, 2007)

Secreção hormonal

Após a biossíntese, os hormônios tireóideos permanecem na molécula de tireoglobulina, unidos por ligações peptídicas a outros aminoácidos. Para que T3 e T4 sejam secretados, é necessário que estas ligações peptídicas sejam hidrolisadas. A liberação dos hormônios tireóideos inicia-se com a endocitose de uma gotícula do colóide. Os tireócitos podem realizar a endocitose de duas maneiras diferentes. A primeira é através de macropinocitose, em que há formação de pseudópodos na membrana apical seguida de endocitose, quando o conteúdo luminal é internalizado inespecificamente. A segunda maneira é a micropinocitose, em que pequenas vesículas de endocitose são formadas na superfície apical da célula folicular. Na micropinocitose, a endocitose pode ser inespecífica ou mediada por receptor ou ambas. Em seres humanos, observa-se uma predominância da endocitose por micropinocitose, embora o TSH estimule os dois tipos de endocitose (LARSEN *et al*, 2002).

A etapa seguinte para a liberação dos hormônios tireóideos é a fusão das vesículas de endocitose com os lisossomas, o que leva à formação de fagolisossomas. No interior do fagolisossoma, a tireoglobulina sofrerá proteólise, assim como outras proteínas que eventualmente estejam presentes. Várias proteases estão envolvidas neste processo de digestão, sendo o pH ácido encontrado no lisossoma importante para a atividade destas enzimas. Após ocorrer

a hidrólise, são liberados aminoácidos, iodotirosinas e iodotironinas. Os aminoácidos podem ser reutilizados na síntese protéica. As iodotirosinas podem sofrer desiodação pela iodotirosina-desiodase dependente de NADPH, havendo aproveitamento da maior parte do iodeto liberado. Os mais importantes produtos da digestão da tireoglobulina, entretanto, são o T4 e o T3. A passagem dos hormônios tireóides do interior da célula folicular para a circulação sistêmica não parece sofrer nenhum tipo de regulação, embora a secreção hormonal seja estimulada agudamente pelo TSH. Já o aumento do conteúdo intra-glandular de iodo inibe a secreção hormonal (LARSEN *et al*, 2002).

c) Metabolismo periférico dos hormônios tireóides

Germain & Galton, (1997) demonstraram que diferentemente do T4, cuja produção é exclusiva da tireóide, a maior parte do T3 sérico é gerado pela desiodação periférica do T4.

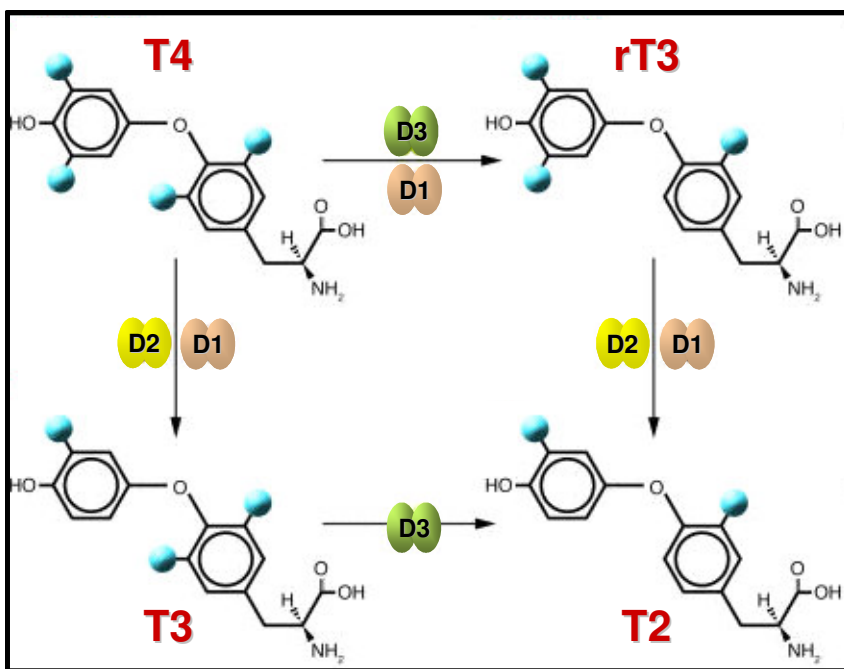
Até bem pouco tempo, o T3 era considerado o único hormônio tireóideo com atividade biológica, mas um grande número de estudos tem mostrado que este conceito deve ser reavaliado, pois se tem evidenciado que outras iodotironinas, em particular o **T2** (3,5-diiodotironina), têm efeitos biológicos (HORST *et al*, 1989; O'REILLY & MURPHY, 1992; GOGLIA *et al*, 1994; MORENO *et al*, 1997; ARNOLD *et al*, 1998; GOGLIA, 2005).

Sendo assim, o T4 sofre alterações metabólicas nos tecidos periféricos, gerando T3 e outras iodotironinas. A monodesiodação do T4 é caracterizada pela retirada do átomo de iodo do anel externo (fenólico) ou interno (tirosílico). As enzimas responsáveis por essas conversões são denominadas iodotironinas desiodases, pois catalisam reações de retirada de um iodo por vez das iodotironinas.

A família dessas selenoproteínas compreende três subtipos que são as desidases tipos 1, 2 e 3 (D1, D2 e D3) (BIANCO *et al*, 2002).

A conversão do T4 a T3 é catalisada pelas enzimas D1 e D2 através da desidatação do anel externo (5'-desidatação), sendo conhecida como via bioativadora. A reação de inativação tanto do T4 como do T3 é catalisada pelas enzimas D1 e D3 através da desidatação do anel interno (5-desidatação), sendo considerada a via bioinativadora (**Figura 3**) (BIANCO *et al*, 2002). Assim sendo, a D1 é a única selenodesidase que funciona como iodotironina desidase do anel externo e interno, enquanto a D2 apresenta atividade exclusivamente de desidatação externa e a D3 exclusivamente de desidatação interna (BIANCO *et al*, 2002).

Figura 3 – Esquema representativo das reações de ativação e inativação do T4 pelas desidases tipos 1 (D1), 2 (D2) e 3 (D3) (Adaptado de BIANCO & KIM, 2006).



Desiodase do tipo 1 (D1)

Foi a primeira isoenzima reconhecida através de ensaios bioquímicos de conversão de T4 em T3 e também foi a primeira a ser clonada. Desse modo, há mais conhecimentos bioquímicos sobre a D1 do que sobre as outras enzimas como revisto por Bianco *et al*, 2002.

A D1 é expressa em diversos tecidos. Em ratos, está presente em fígado, rim, SNC, hipófise, tireóide, intestino e placenta. Em seres humanos, não há atividade no SNC, mas seu RNAm está presente no fígado, rim, hipófise e tireóide (BIANCO *et al*, 2002).

A enzima D1 é uma proteína integral de membrana. Sua localização subcelular, provavelmente, é na membrana plasmática, facilitando o acesso do T4 circulante à enzima, assim como a exportação do T3 produzido a partir do T4 para o plasma. Assim, grande parte do T3 plasmático pode ser proveniente da atividade da D1 (BIANCO & KIM, 2006).

Está bem definido que em ratos, camundongos e seres humanos, os hormônios tireóideos são os mais potentes reguladores da D1 hepática, renal e hipofisária, induzindo o aumento da sua atividade e estimulando a sua transcrição gênica (BERRY *et al*, 1991; KÖHRLE, 1999). Entretanto, na glândula tireóide, a D1 é regulada positivamente pelo TSH (LEONARD & VISSER, 1986; KÖHRLE, 1999).

A expressão e a atividade da D1 também sofrem influências nutricionais. Em situações de privação de energia, como ocorre no jejum e na restrição alimentar (dietas hipocalóricas), observa-se diminuição do T3 circulante relativo ao T4 e aumento do rT3. Essas alterações podem ser interpretadas como decorrentes de modificações na conversão extra-tireóidea de T4 em T3 pela D1 (BIANCO *et al*, 2002). Recentemente, demonstramos que a redução na atividade da D1 hepática,

durante a restrição alimentar, é secundária à redução dos hormônios da tireóide, pois ao administrarmos T4 a animais submetidos a 30 dias de restrição alimentar, observamos restauração dos níveis circulantes de T3 e consequente aumento na atividade da D1 (ARAUJO *et al*, 2008). Além dos hormônios da tireóide, a leptina também parece influenciar a atividade da D1, conforme demonstrado por vários autores (CUSIN *et al*, 2000 LISBOA *et al*, 2003; CABANELAS *et al*, 2006; MOURA *et al*, 2008). Nesses trabalhos a leptina ora teve efeito estimulatório, ora inibitório, demonstrando a necessidade de mais estudos para o melhor entendimento do efeito da leptina sobre as desidases. Além disso, nenhum dos efeitos observados foi em modelo experimental de restrição alimentar prolongada, onde a concentração sérica de leptina está cronicamente reduzida. Portanto, há um vazio de conhecimento, no que diz respeito ao efeito da leptina sobre a modulação das desidases, durante condições de balanço energético negativo.

Desidase do tipo 2 (D2)

A atividade da D2 foi primeiramente identificada na hipófise como uma monodesidase de anel externo do T4, insensível ao 6n-propil-2-tiouracil (PTU) (BIANCO & KIM, 2006). Trabalhos posteriores demonstraram que o substrato preferencial da D2 é o T4, gerando T3, mas que a enzima age também na desidatação do rT3, formando 3,3' – T2. Esta isoforma catalisa apenas a remoção do iodo do anel externo, diferente da D1 que pode desidar tanto o anel externo quanto o interno das iodotironinas (**Figura 3**), como revisto por Bianco *et al*, 2002.

Assim como a D1, a isoforma tipo 2 é um proteína integral de membrana, sendo entretanto, uma enzima residente no retículo endoplasmático. Essa diferença de localização entre a D1 (membrana plasmática) e D2 (retículo endoplasmático)

poderia explicar a existência de uma contribuição mínima na geração de T3 intracelular por D1, em contraste com a grande fração gerada pela D2 (BIANCO *et al*, 2002).

A atividade D2 é modulada em resposta a alterações séricas dos hormônios tireóideos. No hipotireoidismo há aumento da atividade e do RNAm para D2 no encéfalo de ratos, enquanto a reposição hormonal leva à redução de ambos. Esta regulação parece ser importante para proteger os tecidos que expressam D2 contra os efeitos deletérios de quantidades insuficientes ou excessivas de T3 (BIANCO *et al*, 2002). Além da regulação por T3, a atividade D2 hipofisária é também regulada por TRH, cujo efeito é estimulatório (KÖHRLE *et al*, 1991).

Parecia ser um consenso que a principal contribuição da D2 sobre o metabolismo hormonal extra-tireóideo era regular os níveis intracelulares do T3 em tecidos criticamente dependentes deste. Todavia, hoje já se sabe que além da contribuição para geração do T3 intracelular, esta enzima também pode contribuir para a formação do T3 liberado para a circulação (MAIA *et al*, 2005).

A D2 apresenta distribuição tecidual relativamente ampla, embora mais restrita que a D1. Em ratos, a atividade D2 é encontrada, predominantemente, na hipófise, encéfalo e tecido adiposo marrom.

Tecidos que expressam D2 apresentam atividade aumentada durante o hipotireoidismo e a deficiência grave de iodo. Este aumento da D2 leva a aumento da conversão local de T4 para T3, o que pode ser visto como um mecanismo adaptativo destes tecidos em resposta à queda dos níveis circulantes dos hormônios tireóideos (BIANCO *et al*, 2002). Cettour-Rose *et al* (2002), demonstraram que, durante privação energética, a restauração dos níveis séricos de T3 determinada pela leptina exógena é mediada pelo aumento na atividade da D2 no tecido adiposo

marrom. Em 2005, Coppola *et al* demonstraram que o aumento na atividade da D2 hipotâlamica durante o jejum é determinado pela combinação entre a redução sérica de leptina e aumento de corticosterona. Ao repor a leptina sérica, diminuída pela condição do jejum, a atividade da D2 era restaurada, contribuindo para elevação do T3 sérico (COPPOLA *et al*, 2005).

Desiodase do tipo 3 (D3)

A principal via de inativação do T3 é através da atividade desiodase do tipo 3, que remove o átomo de iodo do anel tirosílico da iodotironina. Essa enzima protege os tecidos do excesso de hormônios tireóideos, como revisto por Bianco *et al*, 2002.

Sua localização subcelular não está bem definida, mas parece estar associada à fração microssomal (BIANCO *et al*, 2002).

A atividade da D3 no SNC aumenta no hipertireoidismo e diminui no hipotireoidismo, com níveis indetectáveis de RNAm para D3 no encéfalo de indivíduos hipotireóideos (BIANCO *et al*, 2002).

A expressão da D3, em mamíferos, parecia estar relacionada ao desenvolvimento, sendo a enzima bastante expressa durante as fases críticas do desenvolvimento do SNC, quando possivelmente teria papel protetor contra danos relacionados à exposição precoce de altas concentrações dos hormônios tireóideos (BIANCO *et al*, 2002). No mamífero adulto, em condições normais, a isoforma D3 tem distribuição bastante limitada, estando presente somente em placenta, pele e sistema nervoso central (CROTEAU *et al*, 1995). Porém, a expressão da D3 também pode ser induzida em resposta a inflamação e lesão teciduais, como demonstrado por Rich *et al*, 2008 durante a inflamação aguda pulmonar e por Olivares *et al*, 2007 durante o infarto agudo do miocárdio.

O T3 é fundamental para um desenvolvimento fetal normal. Entretanto, níveis elevados deste hormônio são prejudiciais para o feto, podendo levar a malformações e morte. Assim, é necessário que durante o desenvolvimento os níveis séricos e intracelulares de T3 sejam mantidos dentro de um limite estreito (CARVALHO, 2003). Durante este período, a D2 e a D3 exercem um papel fundamental no controle do T3 sérico, enquanto a D1 parece ser mais importante posteriormente (BIANCO *et al*, 2002).

d) Regulação da função tireóidea

Eixo hipotálamo-hipófise-tireóide

A tireóide, assim como outras glândulas do sistema endócrino, está sob a regulação do eixo hipotálamo-adenohipófise. A função de todo este complexo é regulada por um modelo básico de retroalimentação negativa envolvendo o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) produzido pelo hipotálamo, o hormônio tireotrófico (TSH) produzido pela hipófise e os hormônios tireóideos (T3 e T4) (LARSEN *et al*, 2002).

O principal regulador da função tireóidea é o hormônio estimulador da tireóide, TSH. Células da adenohipófise denominadas tireotrofos são as responsáveis pela síntese e secreção de TSH. O TSH é uma glicoproteína e possui duas cadeias peptídicas, alfa e beta. Para que o TSH possa influenciar a função tireóidea, é necessário que as células foliculares expressem o receptor para este hormônio. O receptor do TSH (TSH-R) pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G: Gs e Gq (RASPE & DUMONT, 1991). Assim, quando o TSH se liga ao seu receptor na membrana das células foliculares, ocorre ativação da adenilato ciclase e, quando em altas concentrações, também há ativação da

fosfolipase C (DUMONT & VASSART, 2001). Como consequência, ocorre uma série de modificações no metabolismo da célula folicular, que leva ao estímulo da produção hormonal e também ao crescimento da glândula (LARSEN *et al*, 2002).

Existem três hormônios de grande importância no controle da síntese e secreção do TSH: o T3 e a somatostatina, que têm ação inibitória e o TRH, que tem efeito estimulatório.

O TRH é sintetizado como um precursor, o pré-pró-TRH. Após o processamento, há formação do tripeptídeo modificado, o TRH. Quando o TRH liga-se ao seu receptor nos tireotrofos adenohipofisários ocorre estímulo da síntese de ambas subunidades do TSH, assim como do seu processamento pós-traducional (LARSEN *et al*, 2002). Apesar do TRH, agir em balanço com reguladores hipotalâmicos inibitórios, como a somatostatina e a dopamina, os hormônios tireóideos exercem o controle mais importante do *feedback* negativo, isto é, são capazes de inibir a secreção de TSH, agindo diretamente nos tireotrofos (SCANLON, 2001).

O que se observa em indivíduos normais é que um eventual aumento nas concentrações séricas de hormônios tireóideos tem como consequência a diminuição da produção de TSH. A redução da quantidade de TSH que chega à tireóide leva à diminuição do estímulo do TSH sobre a glândula, assim, a tireóide produzirá menos hormônios tireóideos, de forma que as concentrações de T3 e T4 circulantes retornem à faixa da normalidade. Na situação oposta, quando há diminuição nas concentrações circulantes de hormônios tireóideos, a inibição da produção de TSH diminui com consequente aumento na síntese e secreção deste hormônio e estímulo à produção hormonal pela tireóide. Assim, as concentrações de

T3 e T4 são restauradas e diminui o estímulo para a liberação de TSH (LARSEN *et al*, 2002).

Sob certas condições, a regulação do eixo tireóideo através do mecanismo de retroalimentação negativa pode ser alterada. Durante a restrição alimentar (jejum ou dieta prolongada) há redução das concentrações séricas de T3 e T4, diminuição ou concentrações normais de TSH e redução na expressão de TRH. Este quadro parece ser mediado pela redução sérica de leptina que suprime a regulação do eixo através da redução da expressão do RNAm do TRH no núcleo paraventricular. Esse efeito da leptina parece ser mediado indiretamente pelos neurônios do núcleo arqueado que expressam POMC e NPY e diretamente através dos receptores Ob-R colocalizados com os neurônios paraventriculares que expressam TRH e ainda, regulando a atividade da região promotora do gene do TRH (AHIMA *et al*, 2000).

1.3 – TIREÓIDE e LEPTINA

Apesar de 14 anos terem se passado desde a descoberta da leptina, ainda hoje se busca compreender os mecanismos envolvidos na regulação da ingestão alimentar e do gasto energético. Tendo em vista que os principais efeitos dos hormônios da tireóide estão vinculados à regulação do consumo de oxigênio e da taxa metabólica (YEN, 2001), é possível que a leptina e os hormônios tireóideos exerçam suas ações sobre o metabolismo energético por intermédio de efetores comuns.

Sabendo-se que a leptina, seu RNAm e seu receptor foram encontrados na hipófise humana, de camundongos e de ratos (JIM *et al*, 1999 & 2000), pode-se imaginar um efeito sobre o metabolismo energético mediado pela ação direta da leptina sobre a secreção de TSH. Além da hipófise, a tireóide também expressa o receptor para leptina e sua ação direta sobre os tireócitos vem sendo demonstrada (NOWAK *et al*, 2002; ISOZAKI *et al*, 2004; OLIVEIRA *et al*, 2007). Na literatura, a relação entre leptina e hormônios da tireóide é bastante controversa.

Até o momento, está bem estabelecido que durante o estado de inanição há redução sérica de leptina, levando à inibição da liberação de TRH que, por sua vez, leva à diminuição de TSH, conduzindo assim à redução da função tireóidea (AHIMA *et al*, 2000).

A normalização dos níveis circulantes de leptina, durante o jejum em roedores, causa retorno parcial dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (AHIMA *et al*, 1996; SEOANE *et al*, 2000). Em seres humanos, a supressão da secreção de TSH induzida por 72 horas de jejum é abolida quando os indivíduos são repostos com leptina, todavia esta mesma reposição é incapaz de induzir alterações sobre as concentrações plasmáticas diminuídas de T3 e aumentadas de rT3 (CHAN

et al, 2003). Entretanto, recentemente, indivíduos tratados com baixas doses de leptina após 10 % de redução na massa corporal apresentaram aumento nas concentrações séricas de T3 e T4, sem modificação sérica do TSH (ROSENBAUM *et al*, 2005).

Ortiga *et al*, (2002) demonstraram que a injeção aguda de baixa dose de leptina em animais alimentados exerce efeito estimulatório sobre secreção de TSH. Esse efeito da leptina sobre o TSH vem sendo justificado pela ação estimulatória da leptina sobre a síntese e liberação de TRH (AHIMA *et al*, 1996; LEGRADI *et al*, 1997), uma vez que o efeito direto da leptina na hipófise sobre a secreção de TSH *in vitro* é inibitório (ORTIGA *et al*, 2002).

Alguns autores demonstram que o hipotireoidismo, condição de redução sérica de T3 e T4, é coincidente com a redução sérica de leptina, independente do índice de massa corporal (VALCAVI *et al*, 1997; DIEKMAN *et al*, 1998; YOSHIDA *et al*, 1998). No entanto, outros autores demonstram o inverso (ESCOBAR-MORREALE *et al*, 1997; LEONHARDT *et al*, 1998; PINKNEY *et al*, 1998), de forma que uma relação consistente entre as concentrações séricas de leptina e dos hormônios da tireóide ainda não está estabelecida.

Os hormônios da tireóide são os mais importantes inibidores fisiológicos da secreção de TSH. Essa forte regulação negativa dos hormônios da tireóide sobre a produção e liberação de TSH e TRH determina o padrão regulatório do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (LARSEN *et al*, 2002). No entanto, o estado nutricional pode alterar esse padrão regulatório de retroalimentação negativa do eixo, conforme observado em ratos submetidos a 30 dias de restrição alimentar, nos quais as concentrações séricas de T4 e T3 estavam diminuídas assim como as concentrações séricas de TSH (ARAUJO *et al*, 2008).

Em indivíduos obesos, sem restrição alimentar, a concentração de leptina no fluido espinhal correlaciona-se positivamente com a concentração sérica de T4. Ao serem submetidos a dietas hipocalóricas apresentam subseqüentemente diminuição da concentração de leptina no fluido espinhal que se correlaciona à diminuição nas concentrações séricas dos hormônios tireóideos, mas essa diminuição dos hormônios da tireóide não determina aumento nas concentrações séricas de TSH (KROTKIEWSKI, 2002).

Hoje, a literatura sobre a relação entre tireóide e leptina é bastante controversa, o que pode ser explicado pelas diferentes metodologias usadas que vão desde diferentes doses administradas a condições alimentares (alimentado ou jejum) diversas.

Tendo em vista que os hormônios tireóideos exercem papel fundamental na regulação do metabolismo energético e que a leptina parece interferir no funcionamento da glândula, é de extrema relevância compreender os efeitos da administração de leptina sobre a função tireóidea tanto de animais alimentados como de animais submetidos à restrição alimentar, nos quais há redução dos níveis séricos de leptina. Para tanto, estudamos os efeitos da mesma dose de leptina administrada por 10 dias sobre a função tireóidea em 2 modelos animais: estudo 1: animal alimentado; estudo 2: animal submetido à restrição alimentar prolongada. Além disso, visando compreender os mecanismos pelos quais a leptina produz seus efeitos sobre os tireócitos, avaliou-se também o efeito do tratamento com leptina sobre a linhagem de tireóide de rato, células PCCL-3 (estudo 3).

2 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Investigar a influência fisiológica da leptina sobre a regulação da função tireóidea.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o efeito inibitório da dose diária de 20µg/100g m.c. de leptina sobre a ingestão alimentar em ratos alimentados *ad libitum*;
- Investigar os efeitos da leptina sobre a massa corporal e o conteúdo de gorduras retroperitoneal e epididimal em ratos alimentados *ad libitum*;
- Comparar os efeitos da restrição alimentar (40%) sobre o conteúdo de gorduras retroperitoneal e epididimal com os efeitos da leptina;
- Avaliar se a administração prolongada de leptina é capaz de influenciar as concentrações séricas de T3, T4, TSH e corticosterona em animais alimentados ou submetidos à restrição alimentar (40%);
- Analisar os efeitos da leptina sobre a atividade das enzimas desidases tipo 1, na tireóide, no fígado e no rim e tipo 2 no hipotálamo, na hipófise e no tecido adiposo marrom tanto em animais alimentados como em animais em restrição alimentar;
- Avaliar se a leptina tem efeito direto sobre a glândula tireóide, quantificando as atividades do co-transportador Na⁺/I⁻ (NIS) e da enzima tireoperoxidase (TPO), em animais alimentados ou em restrição alimentar;
- Estudar a ação da leptina sobre a atividade do co-transportador Na⁺/I⁻ (NIS) em células PCCL-3.

3 - METODOLOGIA

3.1 - ESTUDO 1: Efeito da leptina sobre a função tireóidea em ratos alimentados *ad libitum*

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos com 3 meses de idade (250 – 300 g), mantidos em gaiolas individualizadas sob condições de temperatura (23 °C) e ciclo claro/escuro (12h / 12h, com ciclo claro iniciando às 19h) controladas. Todos os animais tiveram água e ração oferecidos *ad libitum*.

Após o período de 1 semana para aclimação, os animais foram, aleatoriamente, separados para receber leptina ou veículo, formando os seguintes grupos: **Controle (C)** e **Leptina (L)**.

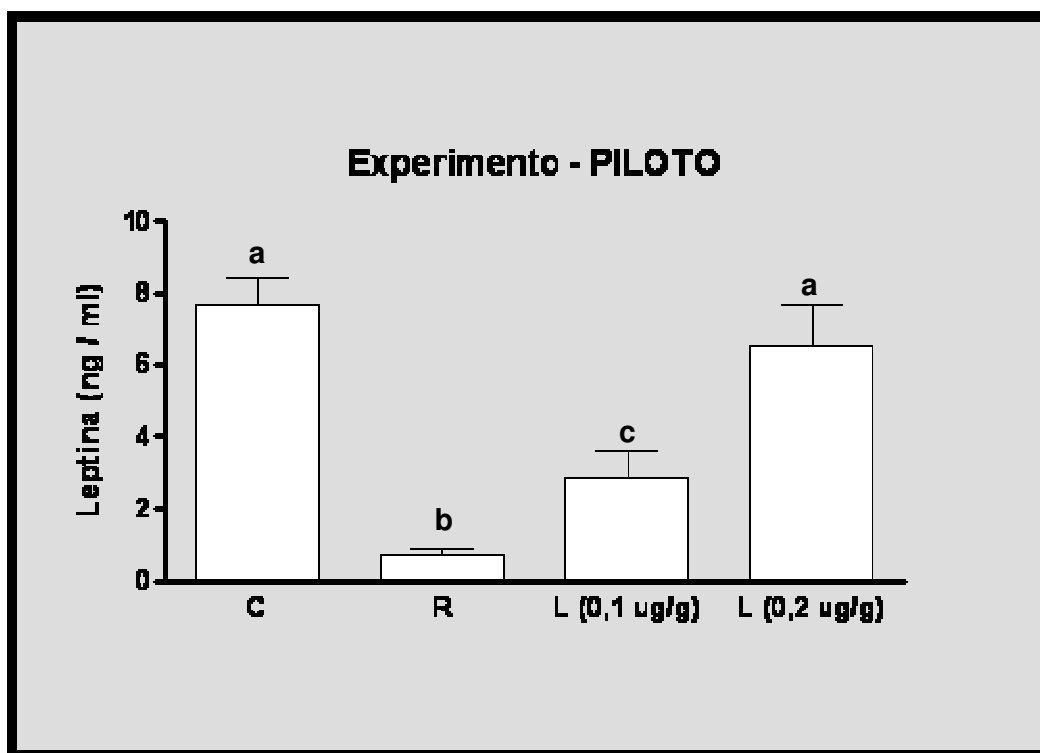
Administração de leptina

A leptina (recombinante de rato) utilizada foi fornecida pelo *National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases – NIDDK* (Torrance, Califórnia, USA).

A administração foi por via subcutânea (s.c.), 2 vezes ao dia durante 10 dias seguidos, sendo a primeira injeção às 8 horas e a segunda às 17 horas. A dose administrada foi de 10 µg/100 g de massa corporal (m.c.). A dose diária de 20 µg/100 g m.c. (0,2 µg/g) foi escolhida através de experimento-piloto, por ter normalizado os níveis séricos de leptina nos animais submetidos à restrição alimentar (**Figura 4**). Os animais que não foram tratados com leptina receberam 100 µL do veículo (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4), nas mesmas condições da

administração da leptina. Todos os animais foram sacrificados 3 horas após a última injeção de leptina ou veículo.

Figura 4 – Concentração sérica de leptina em experimento-piloto para escolha da dose de leptina (0,2 $\mu\text{g/g}$). C (controle, $n=5$), R (restrição alimentar, $n=5$), L (leptina, $n=5$). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p<0,05$.



Controle da ingestão e da massa corporal

Durante todo o período experimental (10 dias) a ingestão alimentar e massa corporal foram aferidos utilizando-se balança digital (*Precision*) com variação de duas casas decimais. Ambas as medidas foram realizadas a cada 2 dias.

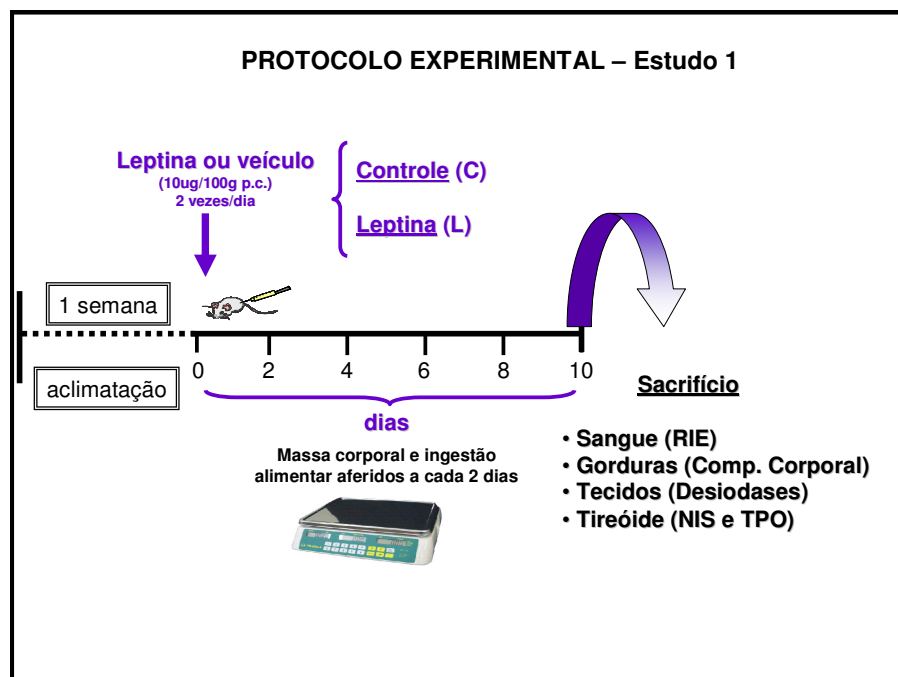
Sacrifício dos animais

No último dia experimental, metade dos animais foi separada para receber solução de radioiodo Na^{125}I (3700 Bq, i.p., *Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra*). Desses animais somente foram utilizadas as tireóides para as atividades do NIS e da TPO. Da outra metade dos animais, foram coletados sangue e tecidos para as análises. Para a obtenção do soro foi realizada a centrifugação (1000 x g, 15 minutos, 4 °C) do sangue em tubos individualizados com a retirada do sobrenadante (soro). As amostras de soro foram aliqüotadas em 3 tubos e armazenadas a – 70 °C até o momento das análises das concentrações séricas de TSH, T3, T4, leptina e corticosterona através de radioimunoensaios específicos.

As gorduras retroperitoneal e epididimal foram retiradas, pesadas e relacionadas à massa corporal do animal no dia do sacrifício.

Os tecidos excisados foram armazenados a – 70 °C para posterior dosagem da atividade das enzimas desidases - D1 (fígado, rim e tireóide) e D2 (hipotálamo, hipófise e tecido adiposo marrom).

Figura 5 - Esquema representativo da metodologia experimental do estudo 1.



3.2 - ESTUDO 2: Efeito da reposição de leptina sobre a função tireóidea de ratos submetidos à restrição alimentar (40%)

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*, machos com 3 meses de idade (250 – 300 g), mantidos em gaiolas individualizadas sob condições de temperatura (23 °C) e ciclo claro/escuro (12h / 12h, com ciclo claro iniciando às 19h) controladas. Todos os animais tiveram água e ração oferecidos *ad libitum* até o momento de se iniciar a restrição alimentar.

Restrição alimentar

Com o intuito de estabelecer a ingestão diária de cada animal, a ração ingerida foi controlada durante o período de 1 semana. Para tanto, os animais foram alocados em gaiolas individualizadas. Cada animal teve acesso a 100 gramas de ração por 24 horas. Assim, através da subtração da ração oferecida pelo resto encontrado na gaiola obtinha-se o valor da ingestão diária ($100 \text{ g} - X \text{ g} = \text{ração ingerida por dia (g)}$). Ao final de 1 semana foi realizado o cálculo da ingestão diária média.

De acordo com dados da literatura (SALIH *et al*, 1993; GAZDAG *et al*, 1999; DAVIDSON *et al*, 2002; ARAUJO *et al*, 2008) foi estabelecido o valor de 60% da ingestão média para ser oferecido aos animais em restrição alimentar.

Aleatoriamente, parte dos animais foi separada para receber a restrição alimentar. Diariamente, os animais em restrição alimentar recebiam a quantidade de ração que fora determinada pelo cálculo de privação de 40% da ingestão alimentar. Os animais do grupo controle receberam ração *ad libitum*. Este procedimento foi mantido por 25 dias até a data do sacrifício.

Controle da massa corporal

Durante todo o período experimental (25 dias) a massa corporal dos animais foi aferida utilizando-se balança digital (*Precision*) com variação de duas casas decimais.

Após 15 dias do início da restrição alimentar, metade dos animais em restrição passou a receber leptina. Assim, os novos grupos formados foram: **Controle (C)**; **Restrição alimentar (R)** e **Restrição alimentar + Leptina (RL)**.

Administração de leptina

De acordo com protocolo, previamente estabelecido pelo nosso grupo (ARAÚJO *et al*, 2008), foi administrada Leptina após os 15 primeiros dias de privação energética de 40%. A leptina foi administrada por via subcutânea (s.c.), 2 vezes ao dia durante 10 dias seguidos, sendo a primeira injeção às 8 horas e a segunda às 17 horas. A dose administrada foi de 10 µg/100 g de massa corporal (m.c.), sendo a dose diária de 20 µg/100 g m.c. (0,2 µg/ g m.c.); escolhida através de experimento-piloto onde foi capaz de normalizar os níveis séricos de leptina nos animais submetidos à restrição alimentar (**Figura 4**). Os animais que não foram tratados com leptina receberam 100 µL de veículo (tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4) por via subcutânea nos mesmos horários da administração da leptina. Os animais foram sacrificados 3 horas após a última injeção de leptina ou salina (**Figura 6**).

Sacrifício dos animais

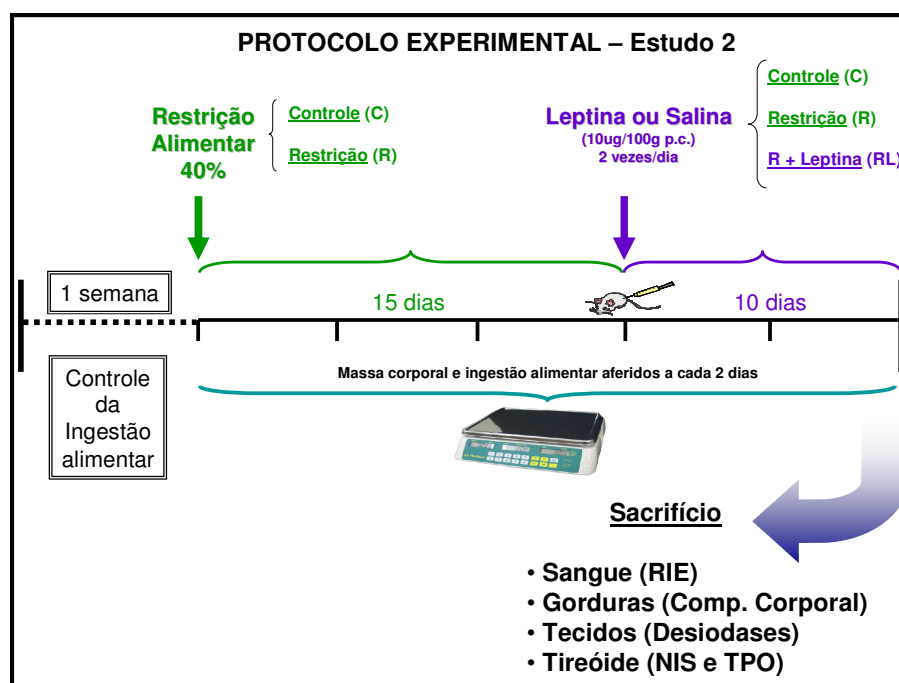
No último dia experimental, metade dos animais foi separada para receber solução de radioiodo Na¹²⁵I (3700 Bq, i.p., *Amersham, Buckinghamshire*, Inglaterra). Desses animais somente foram utilizadas as tireóides para as atividades do NIS e da TPO.

Da outra metade dos animais, foram coletados sangue e tecidos para as análises. Para a obtenção do soro foi realizada a centrifugação (1000 x g, 15 minutos, 4 °C) do sangue em tubos individualizados com a retirada do sobrenadante (soro). As amostras de soro foram armazenadas a – 70 °C até o momento das análises das concentrações séricas de TSH, T3, T4, leptina e corticosterona através de radioimunoensaios (RIE) específicos.

As gorduras retroperitoneal e epididimal foram retiradas, pesadas e relacionadas à massa corporal do animal no dia do sacrifício.

Os tecidos foram excisados e armazenados a -70°C para posterior dosagem da atividade das enzimas desidases - D1 (fígado, rim e tireóide) e D2 (hipotálamo, hipófise e tecido adiposo marrom).

Figura 6 - Esquema representativo da metodologia experimental do estudo 2.



3.3 – ANÁLISES (Estudos 1 e 2)

3.3.1 - Radioimunoensaios (RIEs)

Leptina

As dosagens de leptina sérica foram feitas por RIE específico, empregando um kit fornecido pela Linco Research, Inc. (*Rat Leptin RIA Kit – RL-83K*) que é constituído por reagentes prontos para o uso: tampão de amostra, leptina murina purificada em concentrações de 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 e 50 ng/mL para a curva padrão, anticorpo anti-leptina murina (1º anticorpo), leptina purificada por HPLC e marcada com ¹²⁵I e anticorpo anti-IgG (2º anticorpo). Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 3,3-6,8% e 4,1-2,0%, respectivamente e a sensibilidade do ensaio foi de 0,5 ng/ml, usando volume de 100 µl por amostra. Para a realização do RIE utilizamos o protocolo fornecido pelo fabricante. O resultado foi expresso em ng/ml.

TSH

A determinação dos níveis séricos de TSH foi realizada através de radioimunoensaio específico, utilizando um kit fornecido pelo “National Hormone and Peptide Program/NIDDK” (*Dr. Parlow, Bethesda, MD, USA*), e expressos em termos da preparação de referência 3 (RP-3). Este kit é composto por TSH murino purificado para a preparação das amostras utilizadas na curva padrão (0,625 a 25 ng/ml), TSH murino para ser iodado e anticorpo de coelho anti-TSH murino (1º anticorpo).

A iodação da molécula de TSH com ¹²⁵I foi realizada em nosso laboratório, pelo método da cloramina T, sendo a molécula marcada purificada em uma coluna de Biogel (Biogel-P60 fino da Bio-rad, EUA), conforme previamente descrito

(ORTIGA, 1992). O RIE foi realizado pelo método do 2º anticorpo (anti-rabbit IgG, SIGMA), com adição de 6% de polietilenoglicol (PEG) (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil).

Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 7,7 e 6,5%, respectivamente e a sensibilidade do ensaio foi de 0,625 ng/ml usando volume de 100 µl por amostra. O TSH sérico foi expresso em ng/ml.

T3 e T4

As concentrações séricas de T3 e T4 foram determinadas através de Kit comercial para RIE de T3 (DLS – 3100 Active®, TX, EUA) e T4 (DLS – 3200, Active®, TX EUA) totais, contendo anticorpos específicos aderidos à parede dos tubos de polipropileno e com T3 e T4 marcados com ¹²⁵I como traçador. As curvas padrão foram preparadas com T3 e T4 em soro de rato livre de iodotironinas (soro zero) nas concentrações de 25 a 1000 ng/dL e 1 a 50 µg/dL, respectivamente. Para o kit de T3 os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 4,2 e 6,0% e 7,1 e 7,4%, respectivamente e a sensibilidade do ensaio foi de 4,3 ng/dl, usando volume de 50µl por amostra. Para o kit de T4 os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 7,1 e 7,4% e 2,9 e 5,1%, respectivamente e a sensibilidade do ensaio foi de 0,4 µg/dl usando volume de 25 µl por amostra. Todo o procedimento foi realizado seguindo-se as recomendações do fornecedor. Os resultados foram expressos em ng/dl para o T3 e em µg/dl para o T4.

Corticosterona

As concentrações séricas de corticosterona foram medidas usando o kit de RIE da ImmuChem™ ¹²⁵I obtido pela MP Biomedicals, LCC (*Orangeburg, NY, USA*). O kit, especificamente desenvolvido para análise laboratorial em roedores, contém corticosterona marcada com ¹²⁵I e anticorpo específico de coelho para corticosterona. A análise dos níveis séricos de corticosterona é realizada através da técnica de dupla ligação ao anticorpo. Os coeficientes de variação intra- e inter-ensaio foram 4,4 e 10,3% e 6,5 e 7,1%, respectivamente e a sensibilidade do ensaio foi de 7,7 ng/ml, usando volume de 100 µl por amostra. Para a realização do RIE utilizamos o protocolo fornecido pelo fabricante. A corticosterona sérica foi expressa em ng/dl.

A contagem da radioatividade dos RIEs foi realizada em um cintilador de fase sólida (*1470 Wallac Wizard™ automatic gamma counter, Turku, Filand*).

3.3.2 – Função tireóidea

Captação de radioiodo

Para avaliar a função do co-transportador Na⁺/I⁻ (NIS) foi utilizada a técnica desenvolvidas por Ferreira *et al* (2005) em nosso laboratório.

Resumidamente, 15 minutos antes da eutanásia cada animal recebeu solução intraperitoneal de radioiodo Na¹²⁵I (3700 Bq i.p., *Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra*). As tireóides foram removidas e pesadas. A radioatividade das glândulas foi medida, usando contador gama de fase sólida (*1470 Wallac Wizard™ automatic gamma counter, Turku, Filand*) e expressa como o percentual da dose de ¹²⁵I administrada por mg de tireóide.

Atividade da enzima tireoperoxidase (TPO)

A extração da TPO de tireóides foi realizada como descrito anteriormente (MOURA *et al*, 1987 & 1989; CARVALHO *et al*, 1994; NAKASHIMA & TAUROG, 1978; POMMIER, 1978). Cada tireóide foi homogeneizada em 0,5ml de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,2, contendo iodeto de potássio 10^{-3} M, utilizando-se homogeneizador elétrico (*Ultra-Turrax T-25, Ika-Labortechnik, Germany*). Os homogenatos foram centrifugados (100.000 x g, 1h, 4 °C) e o precipitado foi ressuspenso em 0,5 ml de triton (1%) e mantido a 4 °C em câmara fria por 24 horas. A seguir, foi realizada uma nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante contendo TPO pseudo-solubilizada foi utilizado nos ensaios de medida da atividade TPO. O conteúdo de proteína da amostra foi medido através do método de Bradford (1976).

A atividade de oxidação do iodeto da tireoperoxidase foi medida como descrito anteriormente (MOURA *et al*, 1987 & 1989; CARVALHO *et al*, 1994; NAKASHIMA & TAUROG, 1978; POMMIER, 1978). Para tal, quantidades crescentes da preparação contendo TPO foram adicionadas a uma cubeta contendo iodeto de potássio 24 mM, glicose 11 mM e tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4, em volume final de 2ml. A seguir, adicionou-se 10 µl de glicose oxidase 0,1% (*Boehringer Grade I*) para iniciar a reação. A absorbância (A) foi então medida em um espectrofotômetro Hitachi U-3300, no comprimento de onda de 353nm durante 4 minutos. O $\Delta A_{353nm}/min$ foi determinado a partir da porção linear da curva de reação e relacionado com a concentração de proteína da amostra. O resultado foi expresso em U/g de proteína. 1 unidade de atividade TPO corresponde à $\Delta A_{353nm}/min = 1,0$.

3.3.3 - Atividade das enzimas iodotironina-desiodases

Tipo 1 (D1)

A atividade da enzima D1 foi determinada pelo método previamente publicado (BERRY *et al*, 1991) e adaptado por Antonio Carlos Bianco e Peer. Reed Larsen (comunicação pessoal).

As amostras teciduais (fígado, rim e tireóide) foram homogeneizadas em tampão sacarose-DTT (0,25 M sacarose e 10 mM DTT). Para fígado e rim foram pesados 25 mg do tecido, em balança digital (Precision advanced) e homogeneizados em 1000 µl de tampão, enquanto a glândula tireóide foi inteiramente homogeneizada em 500 µl de tampão. Os tecidos foram homogeneizados, em gelo, em Ultra-Turrax T25 (*Ika-Labortechnik, Germany*). Os homogenatos foram armazenados a – 70 °C até o dia do ensaio.

Alíquotas de 20 µL foram guardadas separadamente, a – 20 °C para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). As amostras foram solubilizadas com NaOH 2,5 N pelo menos 30 minutos antes da dosagem (em duplicata) e a albumina bovina sérica (BSA – SIGMA, MO, EUA) foi utilizada para a construção de uma curva padrão.

Antes da dosagem da atividade da D1 foi necessário purificar o traçador radioativo em virtude do decaimento radioativo e da desiodação das iodotironinas marcadas, mesmo na ausência da enzima. Esta etapa garantiu que todo o iodo radioativo presente após a reação de desiodação advinha da ação enzimática. Para isso, foi utilizada uma coluna de 2 cm de SephadexTM LH-20 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) para obter somente o rT3 radioativo presente na solução (*Perkinelmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA*). Uma alíquota de 70 µL da iodotironina marcada foi diluída em 12 mL de H₂O destilada e aplicada à coluna.

Desprezou-se o eluato, pois o rT3 radioativo, o composto de interesse, fica retido na trama da coluna. Após esta etapa, a coluna foi lavada por duas vezes com 6 mL de H₂O MilliQ, e posteriormente, foram adicionados 500 µL de etanol 70% por nove vezes. O eluato de etanol 70% contendo a iodotironina foi colhido em sete tubos de vidro, de onde 5 µL foram retirados para contagem da radioatividade no contador automático (*1470 Wallac WizardTM automatic gamma counter, Turku, Filand*), com o intuito de determinar a quantidade de rT3 radioativo presente em cada tubo.

A dosagem da atividade D1 foi determinada em tampão PE (fosfato de sódio 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6,9), contendo ditioneitol (DTT) 10 mM (cofator da enzima), rT3 frio 1 µM e volume de homogeneizado tecidual calculado para conter 30 µg de proteína para fígado e rim, e 15 µg de proteína para tireóide. Todos os tubos são adicionados de 50 µL do **rT3-¹²⁵I** e imediatamente incubados a 37 °C por 1 hora, dando início à reação enzimática. Decorridos os 60 minutos, a reação foi interrompida colocando-se os tubos no gelo. Em seguida, com os tubos no gelo foram adicionados 200 µL de soro fetal bovino (Cripion Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 100 µL de ácido tri-cloro acético (TCA) 50% para a precipitação das proteínas. Os tubos foram agitados em *vortex* e centrifugados (8000 x g por 3 minutos, microcentrífuga). Finalmente, 360 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos de contagem para medir a radioatividade no contador gama (*1470 Wallac WizardTM automatic gamma counter*). A atividade da enzima foi expressa em pmoles de **rT3**/min.mg de proteína.

Tipo 2 (D2)

A atividade da enzima D1 foi determinada pelo método previamente publicado (BERRY *et al*, 1991) e adaptado por Antonio Carlos Bianco e Peer. Reed Larsen (comunicação pessoal).

As amostras teciduais (hipotálamo, hipófise e tecido adiposo marrom) foram homogeneizadas em tampão sacarose-DTT (0,25 M sacarose e 10 mM DTT). Para tecido adiposo marrom foi pesado 40 mg do tecido, em balança digital (*Precision advanced*) e homogeneizado em 1000 µL de tampão, enquanto as glândulas hipotálamo e hipófise foram inteiramente homogeneizadas em 500 µL de tampão. Os tecidos foram homogeneizados, em gelo, em Ultra-Turrax T25 (*Ika-Labortechnik, Germany*). Os homogenatos foram armazenados a – 70 °C até o dia do ensaio.

Alíquotas de 20 µL foram guardadas separadamente, a – 20 °C para dosagem de proteínas (ptn) pelo método de Bradford (1976). As amostras foram solubilizadas com NaOH 2,5 N pelo menos 30 minutos antes da dosagem (em duplicata) e a albumina bovina sérica (BSA – SIGMA, MO, EUA) foi utilizada para a construção de uma curva padrão.

Antes da dosagem da atividade da D2 foi necessário purificar o traçador radioativo em virtude do decaimento radioativo e da desiodação das iodotironinas marcadas, mesmo na ausência da enzima. Esta etapa garantiu que todo o iodo radioativo presente após a reação de desiodação advinha da ação enzimática. Para isso, foi utilizada uma coluna de 2 cm de *SephadexTM LH-20* (*GE Healthcare, Uppsala, Suécia*) para obter somente o T4 radioativo presente na solução (*Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA*). Uma alíquota de 70 µL da iodotironina marcada foi diluída em 12 mL de H₂O destilada e aplicada à coluna. Desprezou-se o

eluato, pois o T4 radioativo, o composto de interesse, fica retido na trama da coluna. Após esta etapa, a coluna foi lavada por duas vezes com 6 mL de H₂O MilliQ, e posteriormente, foram adicionados 500 µL de etanol 70% por nove vezes. O eluato de etanol 70% contendo a iodotironina foi colhido em sete tubos de vidro, de onde 5 µL foram retirados para contagem da radioatividade no contador automático (*1470 Wallac WizardTM automatic gamma counter, Turku, Filand*), com o intuito de determinar a quantidade de T4 radioativo presente em cada tubo. Os três tubos com mais de 5.000 cpm/5 µL foram guardados na geladeira ao abrigo da luz para o ensaio.

A dosagem da atividade D2 foi determinada em tampão PE (fosfato de sódio 100 mM, EDTA 1 mM, pH 6,9), contendo ditioneitol (DTT) 20 mM (cofator da enzima), PTU 100 nM (inibidor da enzima), T4 frio 1 nM e volume de homogeneizado tecidual calculado para conter 50 µg de proteína para hipófise, 100 µg de proteína para hipotálamo e 150 µg de proteína para tecido adiposo marrom. Todos os tubos são adicionados de 100 µL do **T4-¹²⁵I** e imediatamente incubados à 37°C por 3 horas, dando início à reação enzimática. Decorridos os 180 minutos, a reação foi interrompida colocando-se os tubos no gelo. Em seguida, com os tubos no gelo foram adicionados 200 µL de soro fetal bovino (Cripion Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e 100 µL de ácido tri-cloro acético (TCA) 50% para a precipitação das proteínas. Os tubos foram agitados no *vortex* e centrifugados (8000 x g por 3 minutos, microcentrífuga). Finalmente, 360 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos de contagem para medir a radioatividade no contador gama (*1470 Wallac WizardTM automatic gamma counter, Turku, Filand*). A atividade da enzima foi expressa em fmoles de **T4**/min.mg de proteína.

Tubos contendo excesso de T4 frio (100 μM) foram utilizados como controle da reação, pois a atividade D1 residual não bloqueada por PTU pode ser retirada da atividade D2 final.

3.4 - ESTUDO 3: Efeito da leptina em linhagem de célula de tireóide

Materiais

Foram utilizados TSH bovino, insulina bovina, apo.transferrina humana e penicilina-streptomicina, todos fornecidos pela Sigma (*Aldrich Corporation, St Louis, USA*). A leptina (recombinante de rato) utilizada no estudo foi adquirida do *National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases – NIDDK* (Torrance, California, USA). O meio de cultura *Coon's Modified Ham's F12* foi obtido da *HIMEDIA®* (Rio de Janeiro, Brasil) e o soro fetal bovino (SFB) da *GIBCO™/Invitrogen Corporation* (São Paulo, Brasil). As células PCCL-3 foram generosamente doadas pelo Dr. Roberto Di Lauro (*Università Federico II, Napoli, Itália*).

Cultivo celular

Foi utilizada a linhagem celular PCCL3, estabelecida a partir de células epiteliais da tireóide derivadas de ratos Fisher adultos de 18 meses, que mantém *in vitro* a maioria das características das células tireóideas diferenciadas, como secreção de tireoglobulina e captação de iodeto. A proliferação destas células é principalmente regulada por TSH e insulina (FUSCO *et al*, 1987). As células cresceram em monocamada, com meio de cultura F12 suplementado com 5% de SFB, transferrina (5 $\mu\text{g/mL}$), insulina (10 $\mu\text{g/mL}$) e TSH (1 mU/mL), chamado de

meio (3H). As células cresceram em ambiente controlado contendo 5% CO₂-95% ar atmosférico a 37 °C.

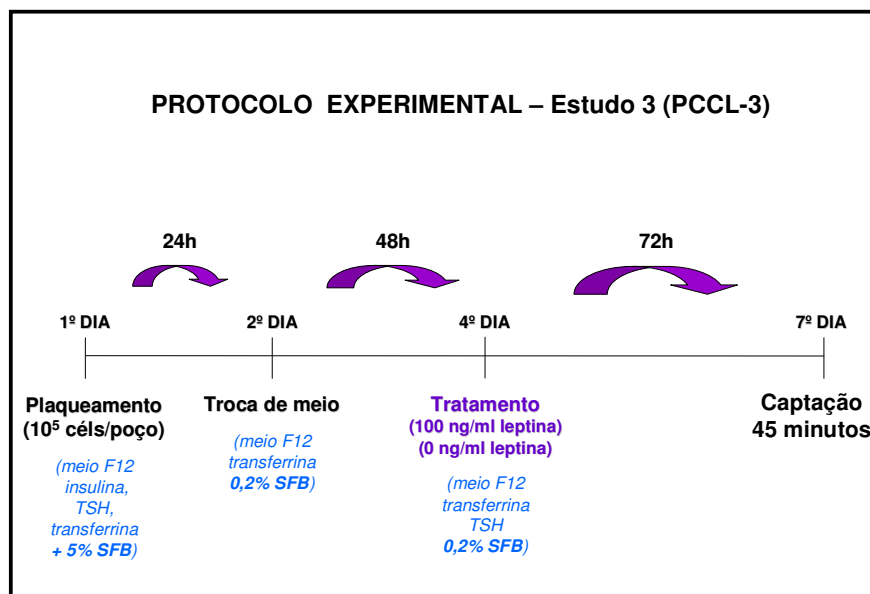
Tratamento com leptina

As células foram plaqueadas (10⁵ células/poço) em placas de 24 poços e o tratamento foi realizado conforme descrito abaixo e ilustrado na **Figura 7**.

Após 24h do plaqueamento, quando as células já estavam aderidas à superfície, o meio de cultura contendo 5% de SFB foi trocado por meio contendo apenas transferrina (meio 1H) e 0,2% de SFB. Após 48 horas, o meio de cultura foi novamente trocado pelo meio 2H (transferrina + TSH) com leptina ou veículo, contendo 0,2% de SFB. As células foram tratadas com leptina recombinante de rato na concentração de 100 ng/ml. Esta concentração foi determinada a partir do trabalho de Isozaki, (2004) em células FRTL-5. O leptina foi diluída em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 e para o controle usamos o veículo.

As células foram mantidas nestas condições por 72 horas até o dia do ensaio da captação de iodeto (**Figura 7**).

Figura 7 - Esquema representativo da metodologia experimental do estudo 3 (modelo PCCL-3).



Ensaio de captação de iodeto

Os efeitos da leptina sobre a captação de radioiodo foram mensurados conforme descrito previamente (VENKATARAMAN *et al*, 1999). Resumidamente, as células tratadas com leptina (100 ng/mL) e as células controle foram lavadas com 1 mL da solução HBSS (*Hank's balanced salt solution*) e incubadas por 45 minutos na mesma solução suplementada com Na^{125}I (100,000-150,000 cpm) e 0,1 mmol/L NaI. Após esse período as células foram novamente lavadas com HBSS e lisadas com 0,5 mL de NaOH (0.1 mol/L). Esse lisado foi então coletado e levado para contagem da radioatividade em contador (*1470 Wallac WizardTM automatic gamma counter, Turku, Filand*). Uma placa paralela de células tratadas nas mesmas condições foi utilizada para a normalização da captação de iodeto através do ensaio de viabilidade celular 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-brometo de difeniltetrazolium - MTT)

(MOSMANN, 1983). As contagens de radiação gamma foram subtraídas das contagens das células que foram incubadas com KClO_4 (10 μM), nas mesmas condições de tratamento, para o cálculo da captação específica de iodeto e corrigido pelo número de células normalizadas pela viabilidade celular, foi medida pelo ensaio do MTT.

Os resultados foram expressos como percentual do total de ^{125}I relativo às células controle (sem o tratamento com leptina)

Foram realizados 3 experimentos em triplicata e em ocasiões independentes.

3.5 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados pelo menos 4 vezes, sendo todos os dados expressos como média \pm S.E.M. (Erro padrão da média). Em cada grupo experimental havia, no mínimo, 4 animais correspondentes a cada tratamento realizado. A análise estatística empregada na comparação dos resultados apresentados foi realizada com a utilização do programa de análises estatísticas Graphpad Prism (versão 4, *Graphpad Software, Inc., San Diego, USA*).

Os resultados dos estudos 1 e 3 foram analisados por test t não pareado. Já o estudo 2 foi analisado por análise de variância univariada paramétrica, seguida de teste de comparação múltipla, *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. (massa corporal, gorduras retro e epididimal, T3, T4, leptina, corticosterona, D1 e D2). Os resultados de TPO, captação e TSH, que não seguem uma distribuição normal, foram analisados por variância univariada não paramétrica, *Kruskal-Wallis*, seguido de teste de comparação múltipla de *Dunn*.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 – **RESULTADOS**

4.1 – **ESTUDO 1: Efeito da leptina sobre a função tireóidea em ratos alimentados *ad libitum***

4.1.1 – **Ingestão alimentar, massa corporal e conteúdo de gordura –**

A ingestão alimentar dos ratos, antes da administração de leptina, não diferia entre os grupos controle e leptina. Após o 4º dia da administração de leptina os animais do grupo leptina consumiram significativamente menos ração que o grupo controle. Ao longo deste período (4º ao 10º dia), a ingestão média do grupo leptina foi reduzida em $4,2 \pm 0,13$ g/100 g de massa corporal em relação ao grupo controle, representando, em percentual, 20% de inibição da ingestão (**Figura 8**).

Ao avaliarmos a massa corporal, observamos que a leptina impediu o ganho de massa no grupo leptina. Enquanto a massa corporal do grupo controle aumentou em $38,10 \pm 1,72$ g, no grupo leptina aumentou apenas $21,30 \pm 1,34$ g ($p < 0,001$) (**Figura 9**). Essa modificação na massa corporal total foi, em parte, determinada pela redução de gordura no compartimento retroperitoneal, sem qualquer modificação no compartimento epididimal (**Figura 10**).

Figura 8 – Controle da ingestão alimentar em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. A seta representa o 1º dia de administração de leptina. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância $p < 0,05$.

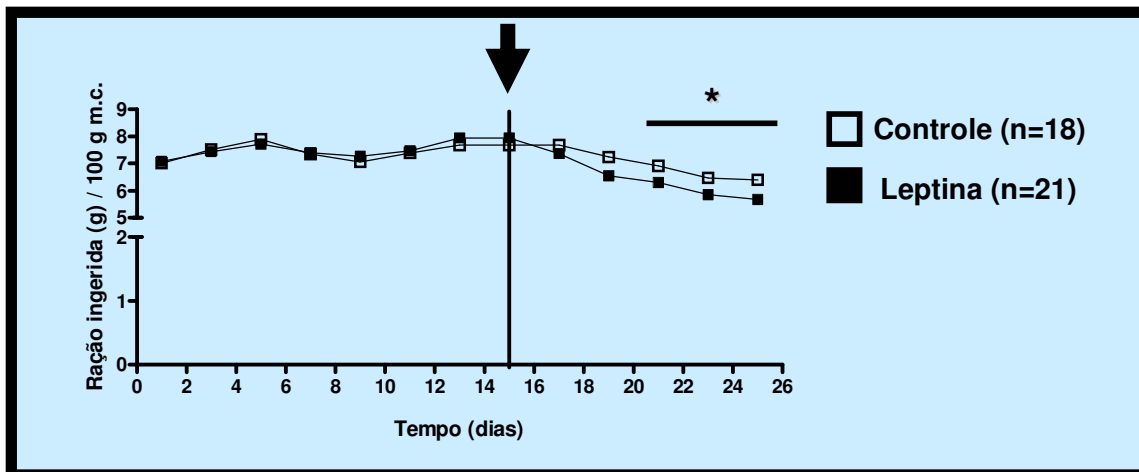


Figura 9 – Ganho de massa corporal em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. A seta representa o 1º dia de administração de leptina. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,001$.

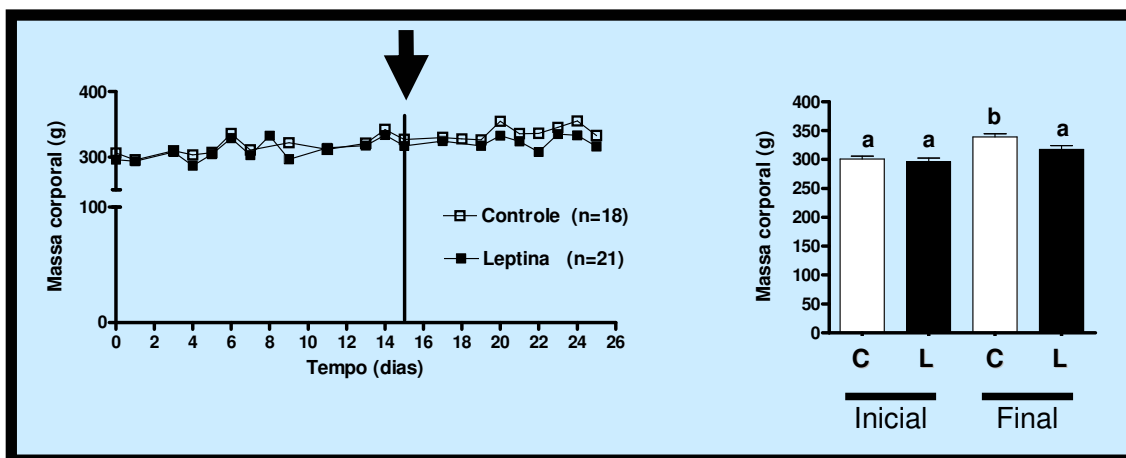
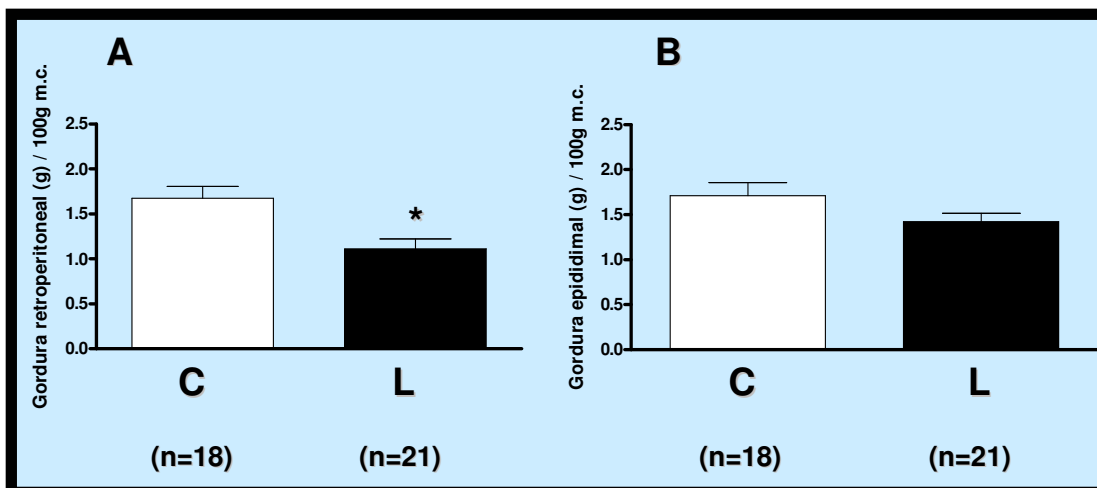


Figura 10 – Compartimentos de gorduras retroperitoneal (A) e epididimal (B) em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância $p < 0,05$.



4.1.2 – Concentração sérica hormonal –

A concentração sérica de leptina aumentou no grupo L após os 10 dias de tratamento com a baixa dose (0,2 $\mu\text{g/g}$) de leptina (**Figura 11**). Apesar da concentração sérica de TSH não diferir entre os grupos (**Figura 12 – A**) após prolongada administração de leptina, houve significativa redução nas concentrações séricas de T3 e T4 ($p < 0,0001$ e $p < 0,05$, respectivamente) (**Figura 12 – B e C**). A concentração sérica de corticosterona não foi alterada pela administração de leptina (**Figura 13**).

Figura 11 – Concentração sérica de leptina em ratos controle (C) e tratados com leptina (L) após 10 dias de administração de baixa dose de leptina. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância $p < 0,05$.

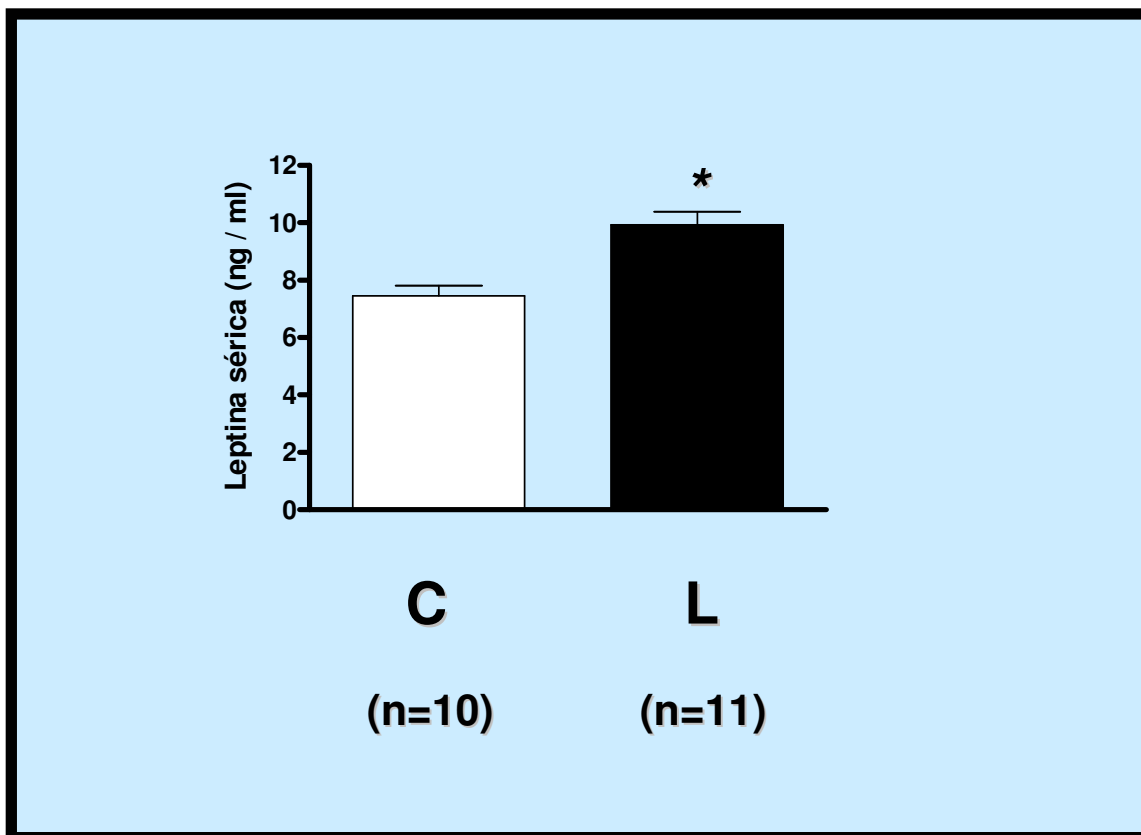


Figura 12 – Concentração sérica de TSH (A), T4 (B) e T3 (C) em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância * $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$.

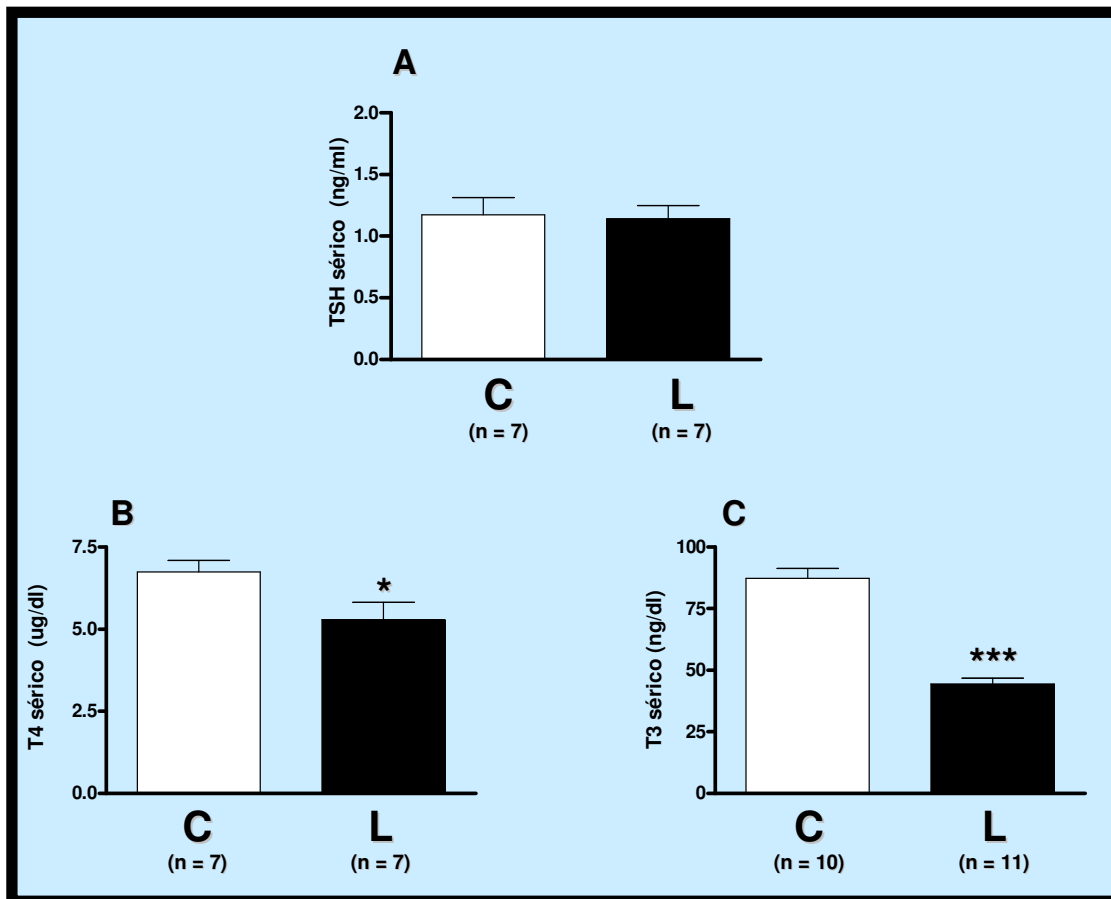
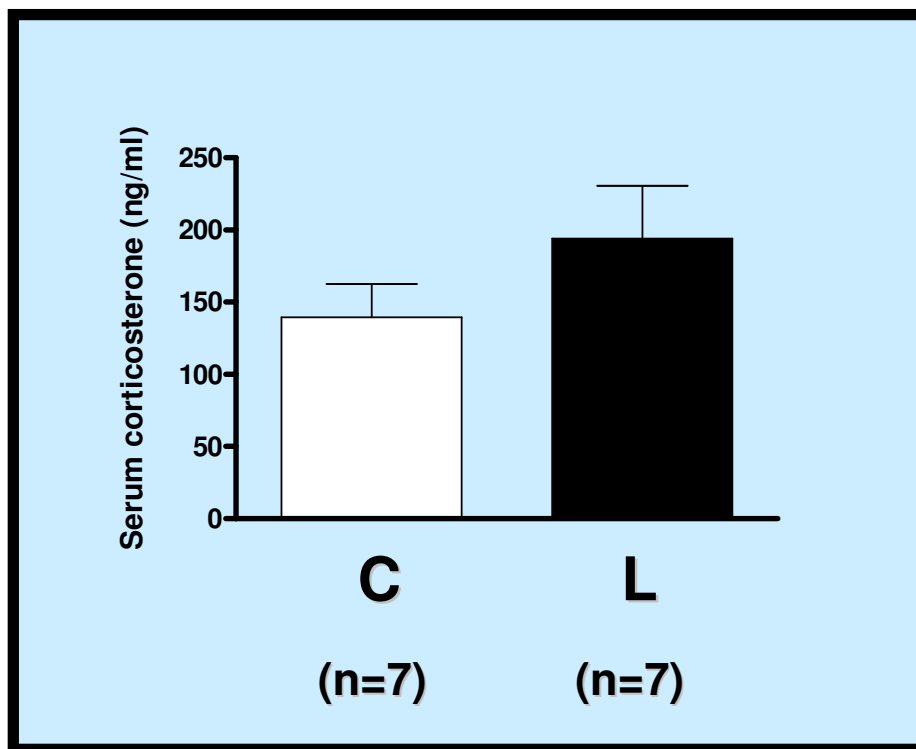


Figura 13 – Concentração sérica de corticosterona em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos.



4.1.3 – Desiodases –

A atividade da D1 não foi modificada com o tratamento de leptina por 10 dias em todos os tecidos analisados neste estudo: tireóide (**Figura 14 - A**), fígado (**Figura 14 - B**) e rim (**Figura 14 - C**).

A atividade da D2 no tecido adiposo marrom foi significativamente aumentada ($p < 0,05$) com o tratamento prolongado de leptina (**Figura 15 - C**), entretanto no hipotálamo (**Figura 15 - A**) e na hipófise (**Figura 15 - B**) não observamos modificações nas atividades enzimáticas.

Figura 14 – Atividade desiodase tipo 1 na tireóide (A), no fígado (B) e no rim (C) de ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos.

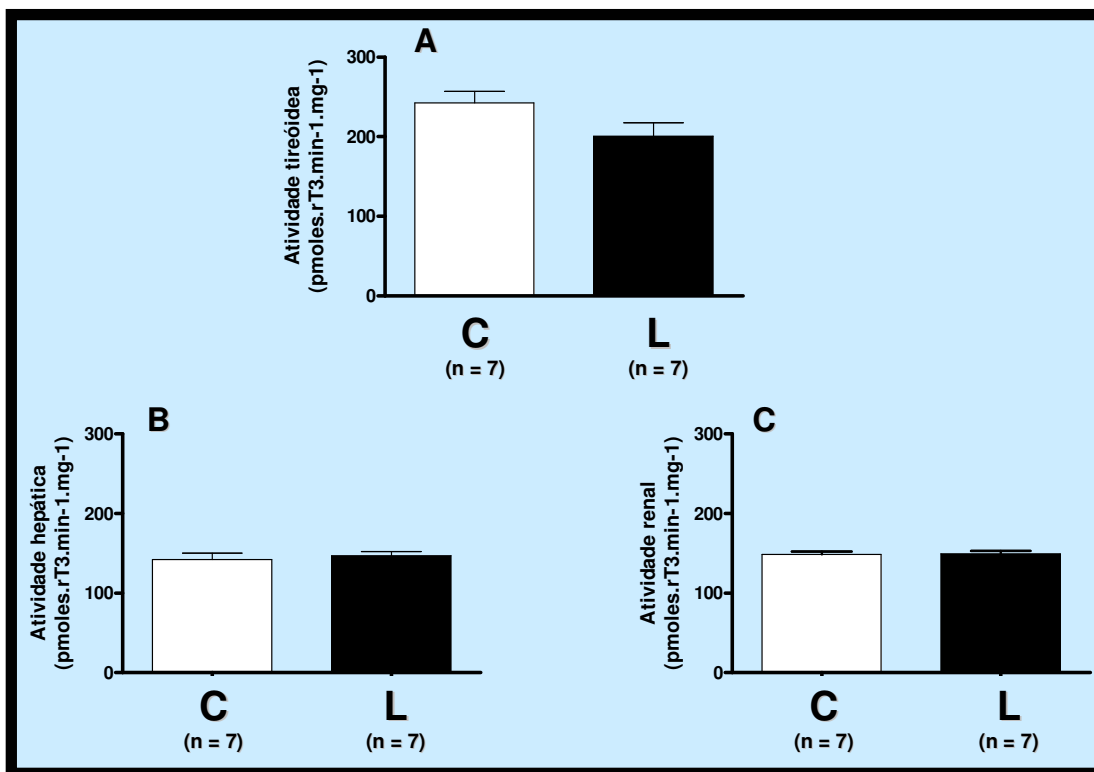
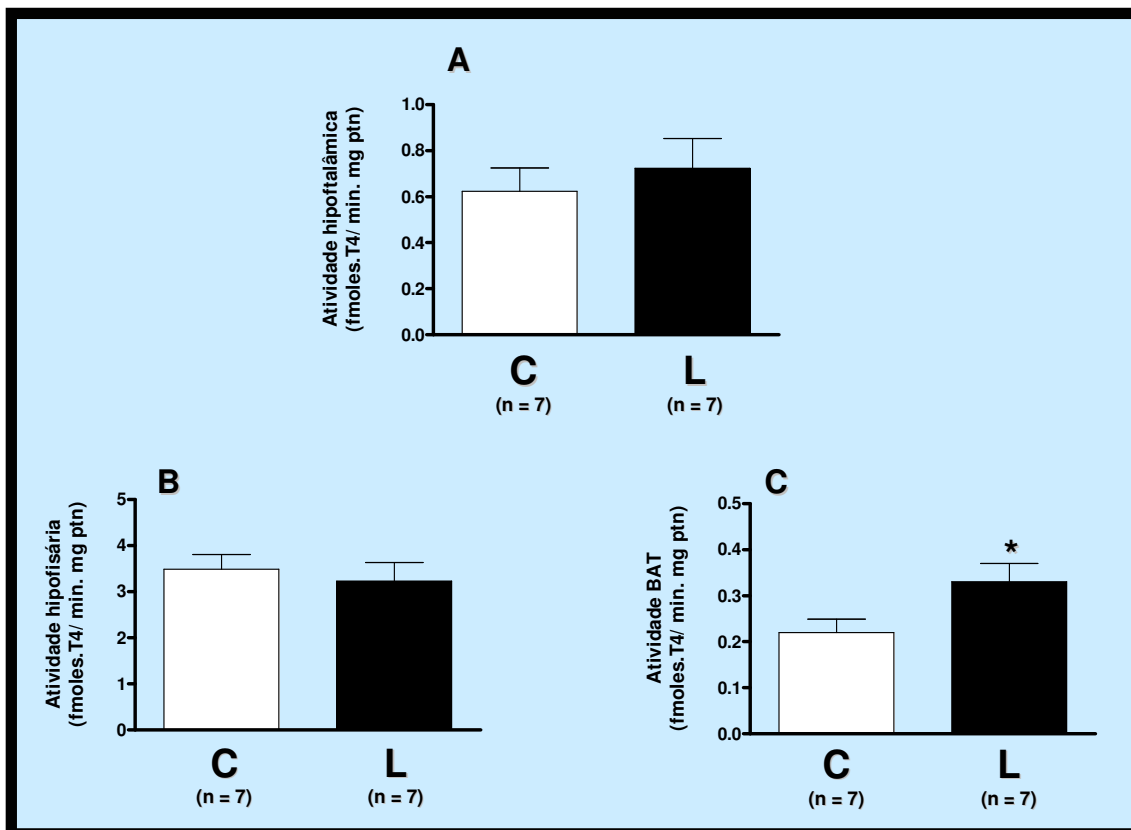


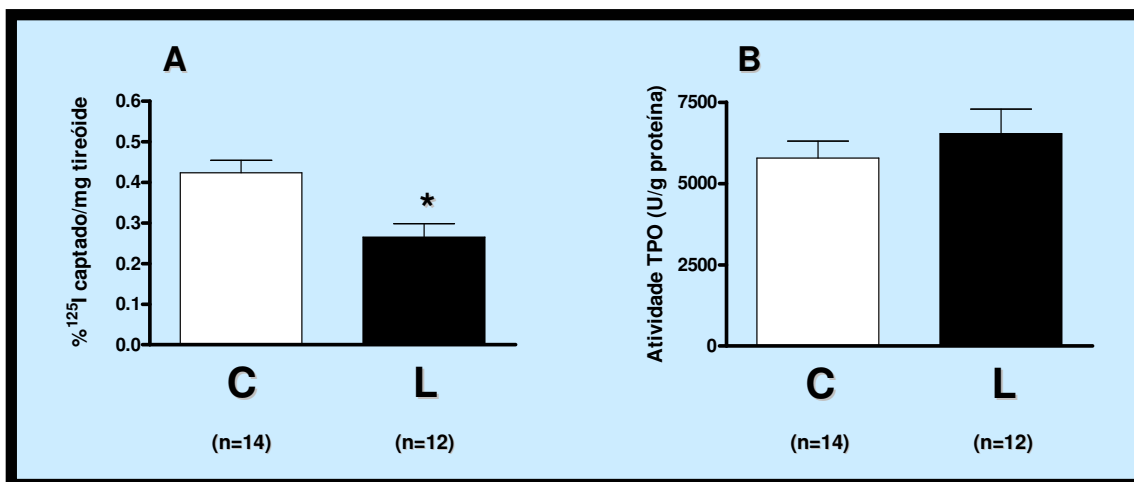
Figura 15 – Atividade desidase tipo 2 no hipotálamo (A), na hipófise (B) e no tecido adiposo marrom (C) de ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância $*p < 0,05$.



4.1.4 – Biossíntese hormonal tireóidea –

A administração prolongada de leptina causou diminuição significativa (**Figura 16 – A**) na atividade do NIS. No entanto, a atividade da TPO não foi influenciada por este tratamento (**Figura 16 – B**).

Figura 16 – Captação de radioiodo pelo NIS (A), e atividade da enzima TPO (B) em ratos controle (C) e tratados com leptina (L). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância * $p < 0,05$.



4.2 – **ESTUDO 2**: Efeito da reposição de leptina sobre a função tireóidea de ratos submetidos à restrição alimentar (40%)

(essa parte do estudo foi submetida à publicação, conforme anexo 1)

4.2.1 – **Composição corporal** –

Ao avaliarmos a massa corporal, observamos que a restrição alimentar de 40% por 25 dias foi eficaz na redução da massa corporal em ambos os grupos submetidos à restrição (R e RL) em relação ao grupo controle (C). Porém, não encontramos diferenças entre as perdas de massa corporal nos grupos restrição e restrição com leptina. Enquanto o grupo controle aumentou em $38,10 \pm 1,72$ g a massa corporal, o grupo R diminuiu em $30,40 \pm 2,20$ g. e o grupo RL em $33,13 \pm 2,47$ g (**Figura 17**).

A redução na massa total foi influenciada tanto pela redução de gordura retroperitoneal como epididimal, sem qualquer efeito exacerbado pela leptina administrada ao grupo em restrição (**Figura 18**).

Figura 17 – Massa corporal em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. A seta representa o 1º dia de administração de leptina. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,05$.

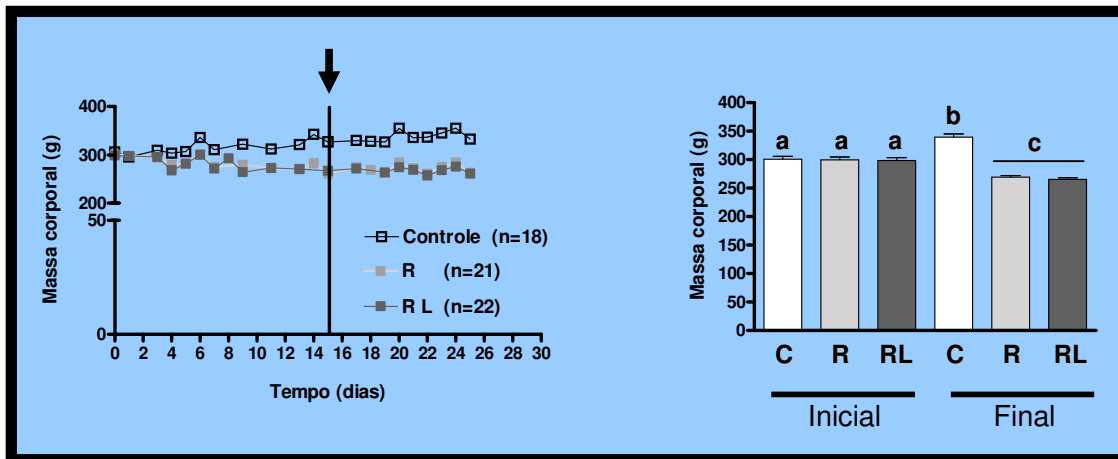
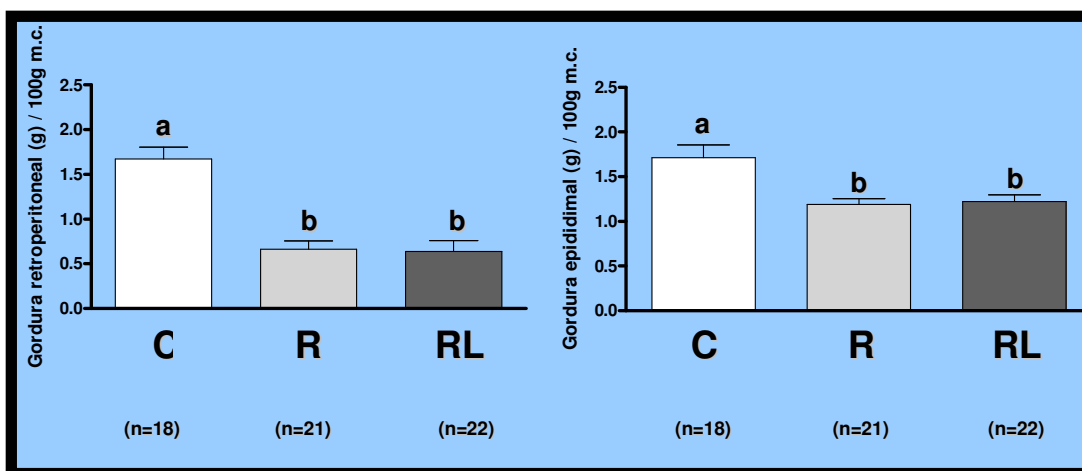


Figura 18 – Compartimentos de gorduras retroperitoneal (A) e epididimal (B) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,01$.



4.2.2 – Concentração sérica hormonal –

Após 25 dias de restrição alimentar de 40%, houve redução significativa nas concentrações séricas de leptina no grupo R. A reposição de leptina, durante os 10 últimos dias de restrição alimentar foi capaz de restaurar, aos níveis séricos do grupo controle, a concentração de leptina (**Figura 19**) como também a concentração sérica de TSH, que estava diminuída no grupo R (**Figura 20 – A**). No entanto, a leptina exógena não foi capaz de reverter a queda na concentração sérica de T4 (**Figura 20 – B**), apesar de ter amenizado a redução do T3 sérico determinada pela restrição alimentar. A restrição alimentar determinou redução de, aproximadamente, 53% do T3 sérico ($40,95 \pm 2,94$ ng/dl) em relação ao grupo controle ($87,30 \pm 4,04$ ng/dl) enquanto a concentração sérica do grupo em restrição com reposição de leptina ($61,59 \pm 2,51$ ng/dl) apresentou redução de apenas 29% do T3 sérico (**Figura 20 – C**).

A concentração sérica de corticosterona, após o período de 25 dias de restrição alimentar, aumentou significativamente no grupo R e permaneceu aumentada no grupo RL (**Figura 21**).

Figura 19 – Concentração sérica de leptina em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,001$.

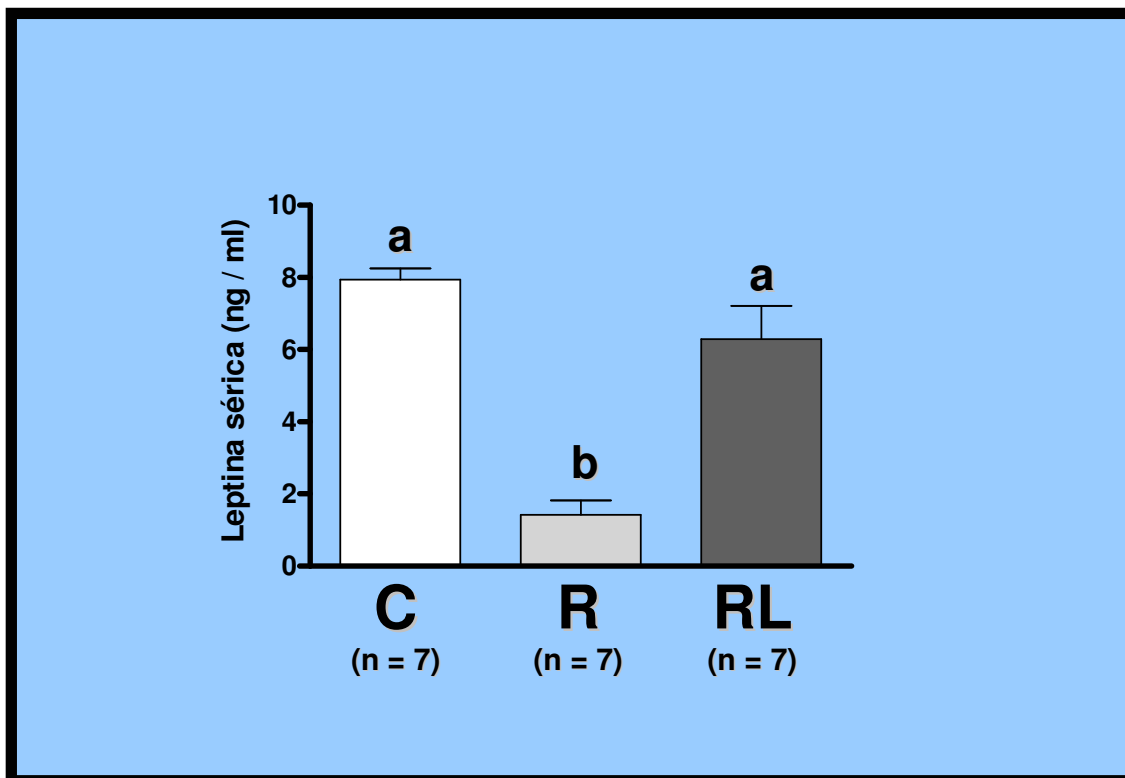


Figura 20 – Concentração sérica de TSH (A), T4 (B) e T3 (C) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância de pelo menos $p < 0,01$.

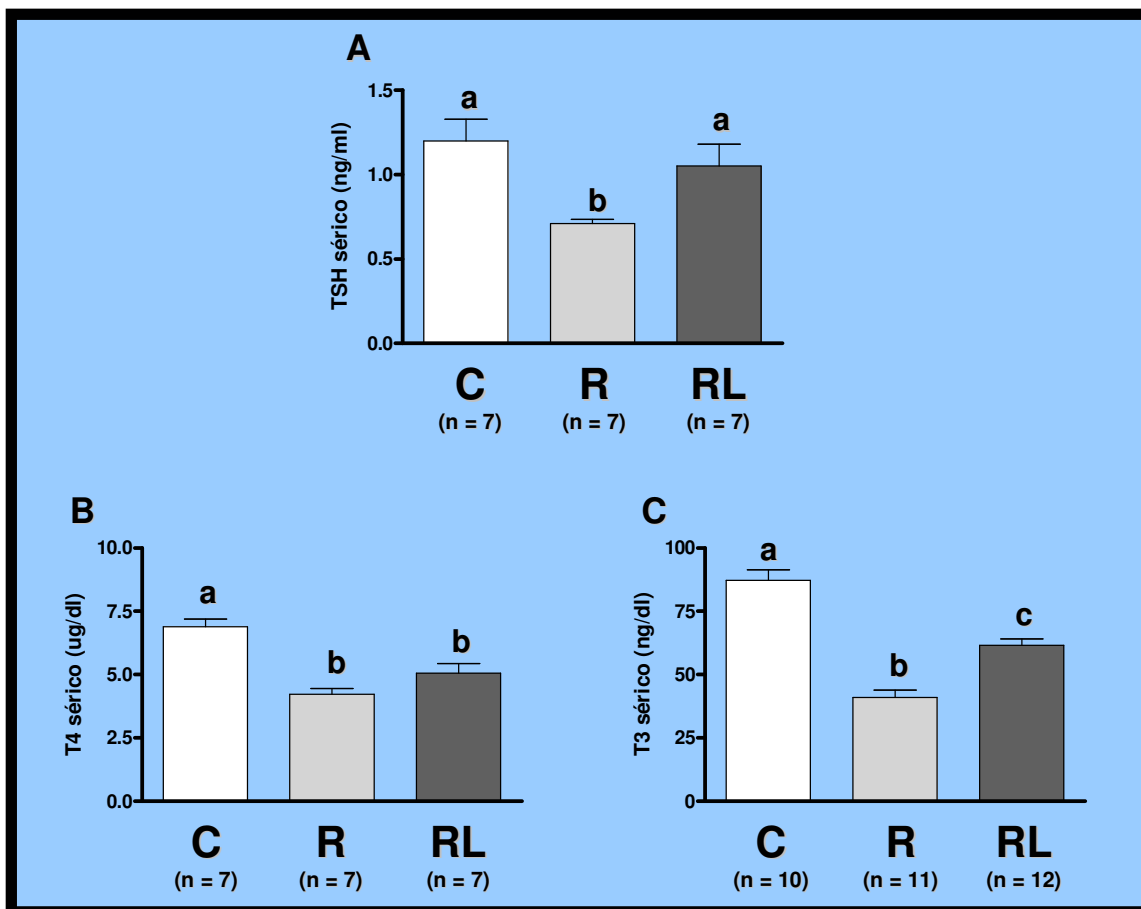
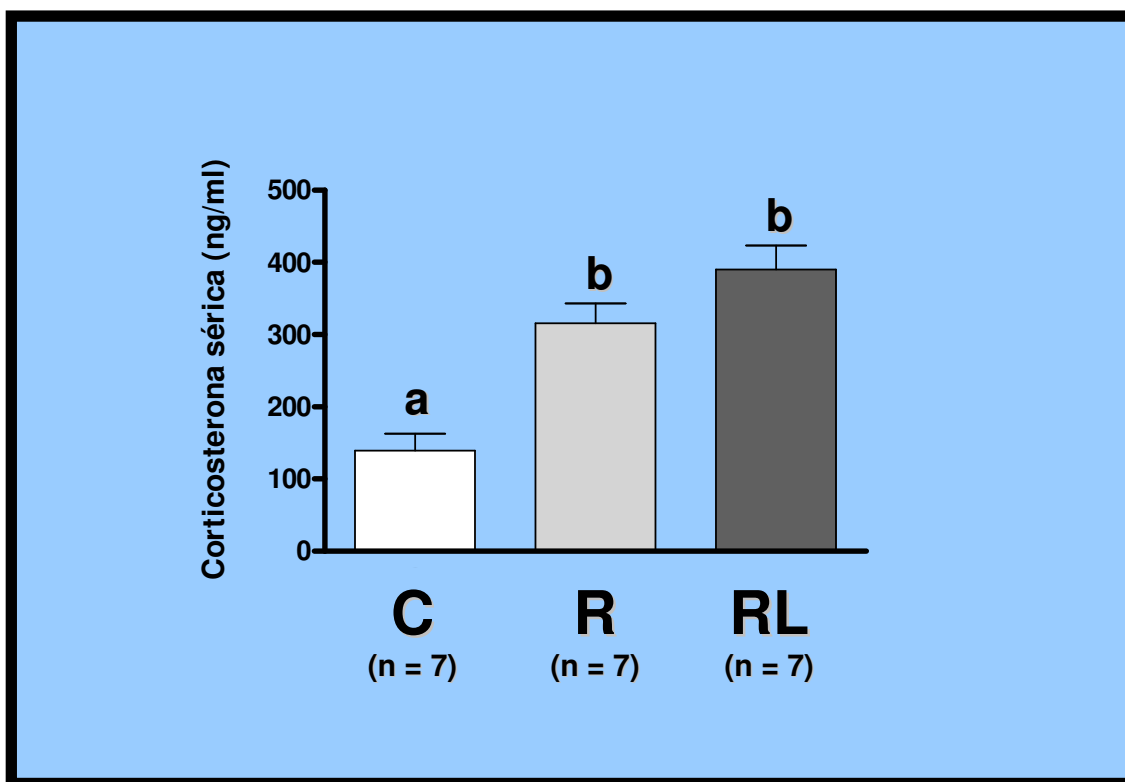


Figura 21 – Concentração sérica de corticosterona em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,05$.



4.2.3 – Desiodases –

A atividade da D1 na tireóide, no fígado e no rim foi significativamente reduzida nos animais em restrição alimentar (**Figura 22 – A, B e C**, respectivamente). A reposição de leptina ao grupo RL reverteu essa redução apenas no fígado e no rim (**Figura 22**), apesar das concentrações séricas de T4 e T3 terem permanecido diminuídas em relação ao grupo controle.

Após os 25 dias de restrição alimentar de 40% houve aumento na D2 hipotalâmica e redução na D2 do tecido adiposo marrom em ratos do grupo R (**Figura 23 – A e C**). A restauração da leptina sérica, no grupo RL, foi capaz de

restaurar a D2 tanto no hipotálamo como no tecido adiposo marrom (**Figura 23 – A e C**). Na hipófise, a atividade desta enzima não foi alterada com a restrição alimentar, porém a leptina exógena causou significativa redução da D2 neste tecido (**Figura 23 – B**).

Figura 22 – Atividade desidase tipo 1 na tireóide (A), no fígado (B) e no rim (C) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,05$.

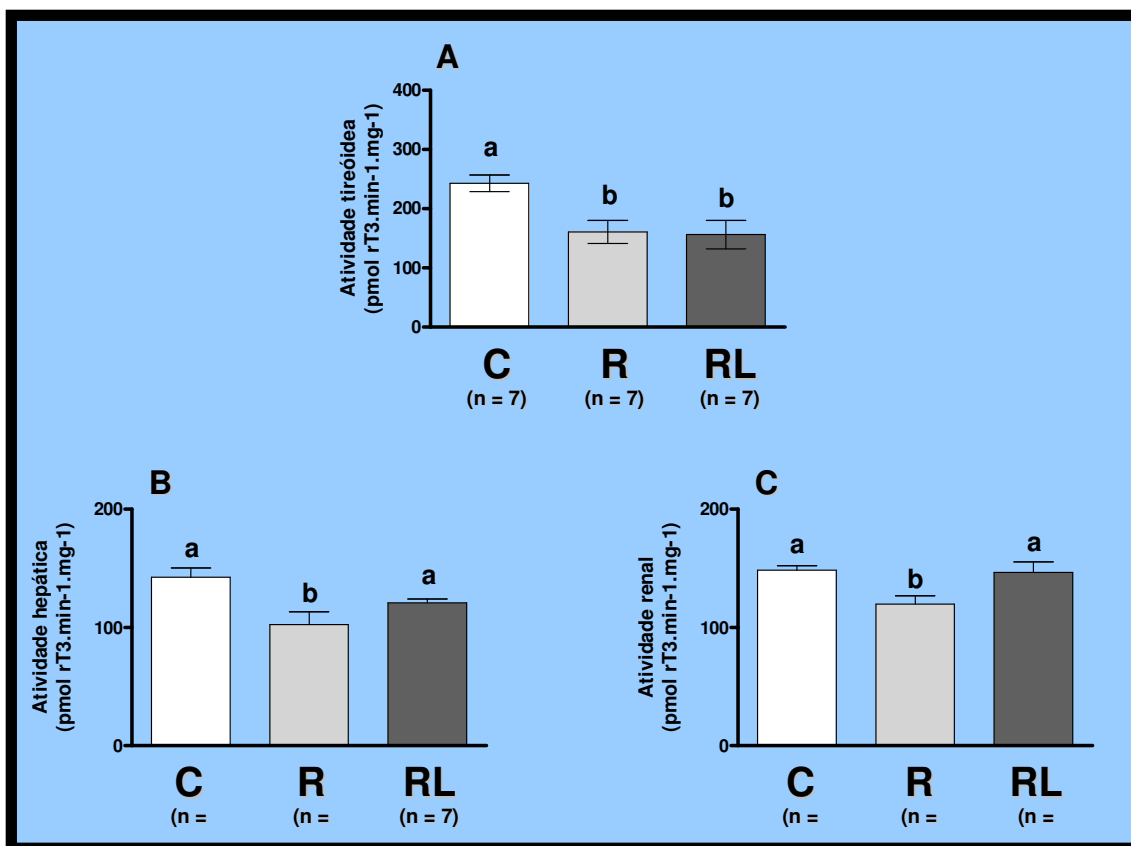
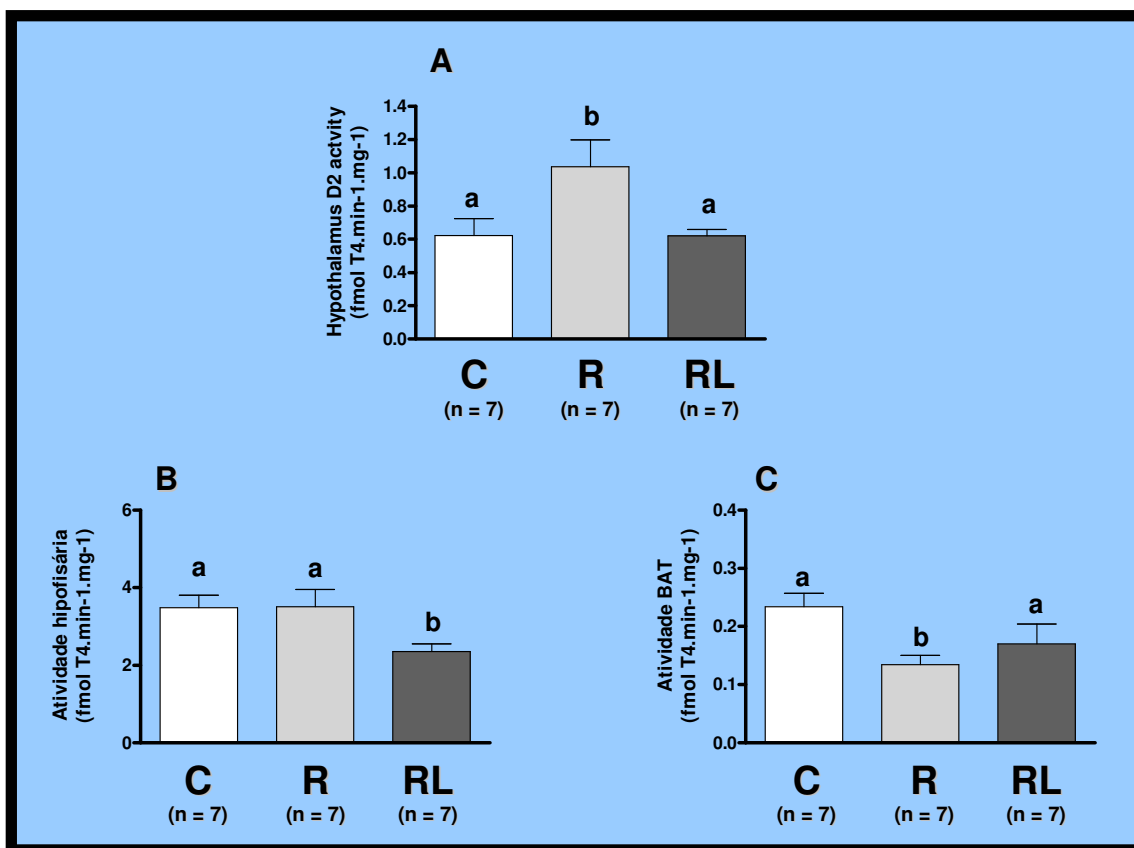


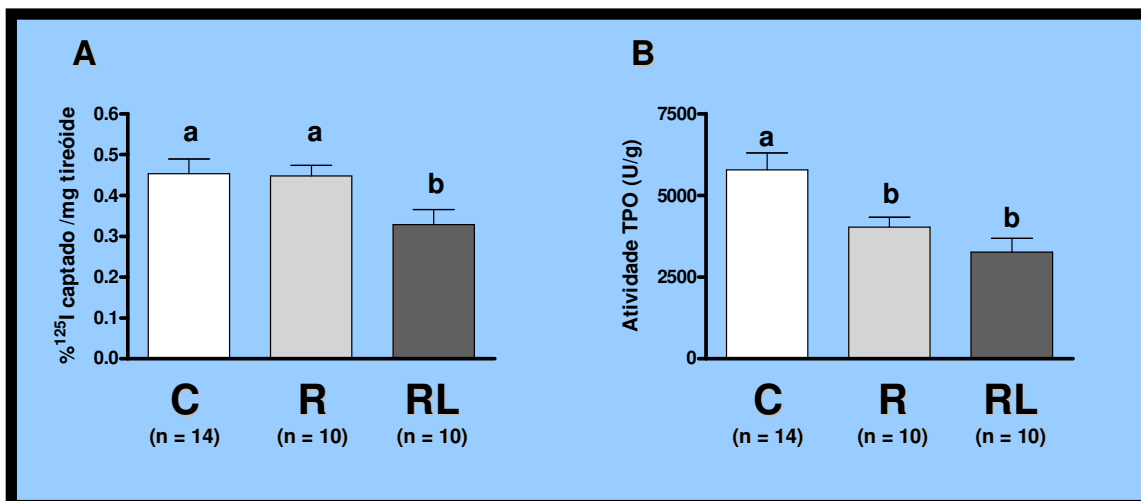
Figura 23 – Atividade desidase tipo 2 no hipotálamo (A), na hipófise (B) e no tecido adiposo marrom (C) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância $p < 0,05$.



4.2.4 – Biossíntese hormonal tireóidea –

A restrição alimentar prolongada não modificou a atividade do co-transportador de sódio e iodeto no grupo R em relação ao grupo C, entretanto a leptina administrada ao grupo RL causou diminuição significativa na atividade do NIS (**Figura 24 – A**). Já, a atividade da TPO foi influenciada pela restrição alimentar, sendo significativamente reduzida no grupo R em relação ao C e a leptina não restaurou a atividade desta enzima (**Figura 24 – B**).

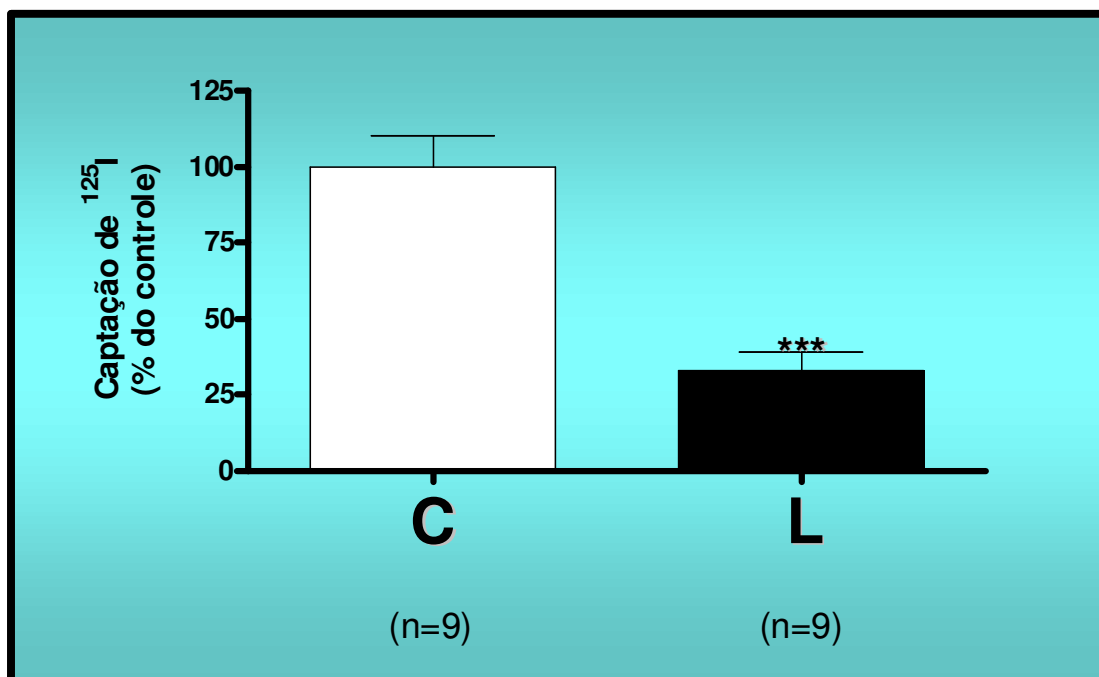
Figura 24 – Captação de radioiodo pelo NIS (A), e atividade da enzima TPO (B) em ratos controle (C), em restrição (R) e em restrição tratados com leptina (RL) por 10 dias. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. n = número total de ratos. Letras diferentes indicam diferenças significativas. Nível de significância de pelo menos $p < 0,05$.



4.3 – ESTUDO 3: Efeito da leptina em linhagem de célula de tireóide

O tratamento de células PCCL-3 com leptina recombinante de rato por 72 horas causou redução significativa na captação de radioiodo, que foi estimulada no por TSH em linhagem de células de tireócitos (**Figura 25**).

Figura 25 – Captação de radioiodo pelo NIS em células PCCL-3 tratadas com leptina por 72 horas. Os resultados estão expressos como percentual relativo ao controle. O asterisco indica resultado estatisticamente significativo. Nível de significância *** $p < 0,001$.



4.4 – RESUMO DOS RESULTADOS

Tabela 1 – Resumo dos resultados sobre a função tireóidea. Os dados estão comparados ao grupo controle.

FUNÇÕES AVALIADAS	RESTRIÇÃO	RESTRIÇÃO + LEPTINA	HIPERLEPTINEMIA
NIS	INALTERADA	DIMINUÍDA	DIMINUÍDA
TPO	DIMINUÍDA	DIMINUÍDA	INALTERADA
D1 (fígado)	DIMINUÍDA	RESTAURADA	INALTERADA
D1 (rím)	DIMINUÍDA	RESTAURADA	INALTERADA
D1 (tireóide)	DIMINUÍDA	DIMINUÍDA	INALTERADA
D2 (hipotálamo)	AUMENTADA	RESTAURADA	INALTERADA
D2 (hipófise)	INALTERADA	DIMINUÍDA	INALTERADA
D2 (tecido adiposo marrom)	DIMINUÍDA	RESTAURADA	AUMENTADA

Tabela 2 – Representação esquemática dos resultados dos hormônios séricos. Os dados estão comparados ao grupo controle.

HORMÔNIOS SÉRICOS	RESTRIÇÃO	RESTRIÇÃO + LEPTINA	HIPERLEPTINEMIA
Leptina	↓	↔	↑
Corticoesterona	↑	↑	↔
TSH	↓	↔	↔
T4	↓	↓	↓
T3	↓	↓	↓

5 – DISCUSSÃO

A regulação da ingestão e da massa corporal é bastante complexa, devido ao envolvimento de vários hormônios, neurotransmissores e peptídeos, modulando respostas tanto no SNC como em tecidos periféricos. A leptina e os hormônios tireóideos participam deste processo, desempenhando importante papel na regulação do balanço energético. No entanto, a inter-relação entre esses hormônios na regulação da manutenção da massa corporal ainda é pouco compreendida. No presente trabalho, avaliamos os efeitos da leptina sobre a função tireóidea de ratos alimentados e constatamos que a leptina foi eficaz na redução da ingestão alimentar, levando à conseqüente redução da massa corporal total e do conteúdo de gordura retroperitoneal, assim como também determinou redução nas concentrações séricas de T3 e T4.

Estes resultados podem ser interpretados de duas maneiras: **1)** a leptina determina redução sérica de T3 e T4 e por isso tem efeito inibitório sobre a ingestão alimentar, tendo em vista que ratos hipotireóideos têm significativa redução na ingestão alimentar (WESTENEND *et al*, 1993; ANDRADE, *dados não publicados do nosso laboratório*); ou **2)** o efeito inibitório da leptina sobre a ingestão alimentar leva à redução dos hormônios tireóideos, como ocorre durante a privação alimentar (AHIMA *et al*, 1996; LÉGRÁDI *et al*, 1997; ROSENBAUM *et al* 2002 & 2005; ARAUJO *et al*, 2008).

Já é sabido que a administração de leptina, em animais alimentados, suprime a expressão do neurotransmissor orexigênico NPY, no núcleo arqueado, explicando, em parte, a via pela qual a leptina exerce seu efeito inibitório sobre a ingestão alimentar (AHIMA *et al*, 1999). Por outro lado, Fekete *et al* (2001), demonstraram

que a administração intracerebroventricular de NPY por 4 dias suprime a expressão de TRH, diminuindo assim as concentrações séricas de TSH, T3 e T4. Neste estudo também houve aumento de leptina, porém os autores concluem que o efeito inibitório sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide é determinado pelo NPY e excluem a possibilidade da hiperleptinemia influenciar as concentrações séricas de T3 e T4 (FEKETE *et al*, 2001). Todavia, os resultados do nosso trabalho reforçam a relação entre a hiperleptinemia e a redução sérica de T3 e T4, independentemente da supressão do TRH, tendo em vista que a administração de leptina em animais alimentados suprime a expressão do NPY e não alterou o TSH sérico (AHIMA *et al*, 1999).

Já está bem caracterizado que a deficiência de leptina, durante a privação alimentar, está associada à diminuição da função tireóidea. No entanto, na situação inversa, ou seja, animais alimentados com hiperleptinemia, há redução das concentrações séricas de T3 e T4. Dessa forma, mais estudos são necessários para a melhor compreensão da relação leptina e eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Surpreendentemente, não observamos alteração na concentração sérica de TSH, apesar da redução na concentração plasmática de T3 e T4. Segundo Légrádi *et al*, (1997), a leptina estimula a secreção de TRH por mecanismos diretos e indiretos através da modulação de neurônios aferentes aos de TRH. A administração intracerebroventricular de leptina aumenta a expressão do gene do CRH no núcleo hipotalâmico paraventricular (SCHWARTZ *et al*, 1996). O aumento do CRH pode levar à inibição da liberação de TRH e conseqüentemente do TSH. Assim, no presente estudo, o aumento do TSH sérico, que deveria ocorrer em resposta à diminuição sérica dos hormônios tireóideos, pode ter sido atenuado pela menor liberação de TRH.

A ser válida esta possibilidade, deveríamos encontrar um aumento da corticosterona circulante, estimulada via hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), pelo CRH aumentado. Entretanto, não observamos aumento significativo nas concentrações séricas de corticosterona no grupo tratado com leptina, o que poderia ter explicado a não alteração do TSH sérico neste grupo. Por outro lado, o efeito inibitório da leptina sobre a produção de corticosterona, evidenciado em cultura primária de células adrenocorticais (BORNSTEIN *et al*, 1997; PRALONG *et al*, 1998), poderia estar limitando o efeito de um eventual aumento de ACTH.

Sabe-se que o “pool” plasmático de T3 e T4 é proveniente das etapas de síntese, secreção e metabolização periférica dos hormônios tireóideos, assim a influência da leptina sobre algumas dessas etapas poderia explicar a diminuição sérica destes hormônios. Ao avaliarmos a atividade das enzimas D1 e D2, após 10 dias de tratamento com leptina, só observamos modulação positiva da D2 no tecido adiposo marrom. Vale ressaltar que não avaliamos vias de metabolização inativadora, tais como a atividade da D3 e processos de sulfatação ou glicuronidação dos hormônios tireóideos que também poderiam estar envolvidos na diminuição sérica destes.

Inicialmente, foi proposto que a leptina atuasse essencialmente no SNC. Todavia, hoje já se sabe que os efeitos de dissipação de energia modulados pela ação da leptina têm alvos periféricos: a termogênese no tecido adiposo marrom e a utilização dos substratos oxidativos por todo o corpo (ASENSIO *et al*, 2008). Tendo em vista que o tecido adiposo marrom, em roedores, é o principal sítio de termogênese, o aumento da D2, encontrado neste trabalho, poderia representar um dos mecanismos pelos quais a leptina induz aumento no gasto energético. Uma vez que o aumento da atividade desta enzima leva ao aumento da conversão de T4 a T3

e este não estava aumentado na circulação, pode-se presumir que o T3 produzido no intracelular está sendo utilizado para aumentar o gasto energético. Corroborando nossos dados, já foi demonstrado que, em animais submetidos ao frio, há aumento da termogênese que é dependente do aumento da atividade da D2 no tecido adiposo marrom. Esta maior produção local de T3, no entanto, não altera as concentrações séricas de T3 (BIANCO & SILVA, 1987 & 1988).

Recentemente, foi demonstrado que os efeitos estimulatórios da leptina sobre o consumo de oxigênio e a expressão da UPC-1 e da D2 no tecido adiposo marrom requerem a expressão de β -adrenoceptores funcionais, enquanto os efeitos sobre a inibição da ingestão e sobre a utilização de gorduras (oxidação) acontecem mesmo em animais que não expressam as 3 isoformas (β_1 , β_2 , β_3) do receptor β (*β -less mice*) adrenérgico (ASENSIO *et al*, 2008).

Uma vez que somente a atividade da D2 no tecido adiposo marrom estava aumentada nos animais alimentados, a modulação das desidases tipos 1 e 2 pela leptina não explicaria a redução na concentração sérica de T4 e T3.

Finalmente, ao avaliarmos a função de duas proteínas importantes para a biossíntese dos hormônios tireóideos, NIS e TPO, observamos que a leptina exerceu efeito inibitório sobre a atividade do co-transportador de Na^+/I^- e não alterou a atividade da TPO. Assim, podemos sugerir que a hiperleptinemia moderada exerce efeito inibitório sobre a glândula tireóide, impedindo o transporte ativo do iodeto para o interior do tireócito realizado pelo NIS e, dessa forma, determinando, pelo menos em parte, a redução nas concentrações séricas de T3 e T4.

A partir de resultados obtidos anteriormente (ARAUJO *et al*, 2008), podemos afirmar que a privação energética de 40% por 30 dias, em ratos, determina redução da massa corporal, dos conteúdos de gordura retroperitoneal e epididimal e, ainda,

redução sérica dos hormônios tireóideos. No presente estudo, observamos que a leptina administrada, por 10 dias, a animais alimentados *ad libitum* determinou redução de 20% na ingestão alimentar, levando a redução de massa corporal, do conteúdo de gordura retroperitoneal e da concentração sérica dos hormônios tireóideos. Assim, a leptina exógena poderia estar causando redução sérica de T3 e T4, secundária à redução da ingestão alimentar. No entanto, Laws *et al*, 2007, que avaliaram os efeitos da restrição alimentar de 10%, 20%, 30% e 40% por 30 dias, em ratos, verificaram que houve redução das concentrações dos hormônios tireóideos, somente a partir da privação de 30% da ingestão. O que nos leva à sugerir que o efeito da leptina sobre a redução das concentrações séricas de T3 e T4, em animais alimentados, pode envolver um mecanismo distinto do que determina esta redução durante a restrição alimentar.

No presente estudo, a redução da massa corporal e dos compartimentos de gordura, nos animais submetidos à 40% de restrição alimentar (25 dias), foi bastante acentuada e não houve efeito adicional quando a leptina foi repostada por 10 dias, como esperado, tendo em vista que o tratamento com a mesma dose (0,2 µg/g m.c. 2 vezes por dia), durante o mesmo período, reduziu em apenas 20% a ingestão dos animais *ad libitum*. Outros estudos, comparando animais alimentados *ad libitum* com animais tratados com leptina em doses de 0,5 ug/g m.c./dia a 10 ug/dia, observaram redução na ingestão alimentar de 33% a 50%, evidenciando um efeito inibitório dose-dependente da leptina sobre a ingestão alimentar (BARZILAI *et al*, 1997; CETTOUR-ROSE *et al*, 2002; STEINBERG *et al*, 2002).

A análise dos resultados confirma achados anteriores do nosso grupo, demonstrando que 25 dias de restrição alimentar de 40% induzem redução na massa corporal, nos compartimentos de gordura retroperitoneal e epididimal, além

de diminuir as concentrações séricas de leptina, TSH, T3 e T4 (ARAÚJO *et al*, 2008). No trabalho anterior, a reposição de T4 restaurou as concentrações séricas de T3 e T4, sem modificação de leptina ou TSH séricos. No entanto, este T4 exógeno, diferentemente da leptina exógena, determinou redução de massa e gorduras corporais além daquela determinada pela restrição alimentar de 40% (ARAÚJO *et al*, 2008).

No presente estudo, os níveis séricos de TSH, diminuídos pela privação energética, foram restabelecidos após os 10 dias de reposição de leptina. No entanto, o T4 sérico permaneceu diminuído, enquanto o T3 sérico aumentou com a administração exógena de leptina. A concentração sérica de T3, durante a restrição alimentar, representa 47% da concentração do grupo controle, enquanto no grupo RL representa 71%, demonstrando que a reposição de leptina promove aumento expressivo no T3 sérico do grupo RL em relação ao grupo R. Esse resultado sugere que a leptina é capaz de aumentar a concentração plasmática de T3, estimulando a conversão de T4 para T3.

Nossos resultados diferem, em parte, dos estudos em seres humanos submetidos à restrição alimentar e repostos com leptina por 5 semanas, realizados por Rosenbaum *et al*, (2002 & 2005), os quais descrevem restauração das concentrações séricas tanto de T4 quanto de T3, sem modificação no TSH sérico. As diferenças, entre os estudos, podem estar relacionadas a inúmeros fatores, dentre eles a dose utilizada e o período de tratamento, além da provável diferença no efeito desse hormônio entre as espécies (humanos e roedores).

Todavia, estudos em roedores, avaliando o efeito da reposição de leptina durante o jejum (24-72h), situação que conhecidamente leva à redução na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, também são controversos. Pioneiramente,

Ahima *et al*, (1996) demonstraram que a diminuição de T4 observada após 48 de jejum era atenuada por uma única dose de leptina. Em 1999, Ahima *et al*, demonstraram que a administração de leptina por 2 semanas evita a queda de T4 determinada por 70 horas de jejum; no entanto, nenhum outro parâmetro da função tireóidea foi avaliado.

Todavia, Boelen *et al*, (2006) demonstraram que animais em jejum por 24h e repostos com leptina, neste período, não têm as concentrações séricas de T3 e T4 normalizados. Lujan *et al*, (2006) utilizando macacos *rhesus* submetidos à restrição alimentar prolongada, também não observaram normalização das concentrações de T3 após 16 semanas de tratamento com leptina.

Esses resultados conflitantes demonstram que diferentes abordagens metodológicas conduzem a resultados controversos sendo, portanto, necessários mais estudos para o melhor entendimento da influência da leptina sobre o eixo tireóideo durante a restrição alimentar.

Boelen *et al*, (2006) demonstraram que 24 horas de realimentação após o jejum foram suficientes para restaurar as concentrações séricas de leptina, entretanto, não houve normalização dos níveis de T3 e T4. Esses achados sugerem que a normalização dos níveis séricos de leptina nem sempre conduz à restauração das concentrações séricas dos hormônios tireóideos, indicando que outros sinais periféricos podem contribuir para a regulação dos hormônios tireóideos durante a privação energética.

De fato, durante a restrição alimentar, além da diminuição da leptina, os níveis séricos de corticosterona estão significativamente aumentados. Diversos trabalhos já demonstraram que os glicocorticóides estão envolvidos na regulação da função tireóidea além de diminuir a produção extratireóidea de T3 (JENNINGS &

FERGUNSON, 1984; BIANCO *et al*, 1987). Alguns autores descreveram, ainda, que a administração de leptina é capaz de reverter o aumento de corticosterona induzido pelo jejum (AHIMA *et al*, 1996; COPPOLA *et al*, 2005). Entretanto, no presente estudo, não observamos efeito da reposição de leptina sobre as concentrações séricas aumentadas de corticosterona em animais submetidos à restrição alimentar. Podemos sugerir que a capacidade da leptina em restaurar os níveis séricos dos hormônios tireóideos, em situações de privação energética, possa depender da normalização das concentrações séricas de corticosterona.

No entanto, apesar dos semelhantes níveis séricos de T4 (reduzido) e corticosterona (aumentado), entre os grupos R e RL, foi observada uma expressiva diferença nas concentrações séricas de T3, que podem ser atribuídas, em parte, à normalização da leptina.

De fato, no presente estudo, observamos que o tratamento com leptina restaurou a atividade da D1 hepática e renal, bem como da D2 no tecido adiposo marrom, o que pode ter contribuído para a diminuição da queda na concentração sérica de T3 induzida pela restrição alimentar. Esses achados estão de acordo com outros estudos que demonstraram importante efeito estimulatório da leptina sobre as atividades da D1 (LISBOA *et al*, 2003) e D2 (CETTOUR-ROSE *et al*, 2002) periféricas.

Entretanto, a diminuição na D1 tireóidea não foi restaurada pela reposição de leptina, apesar da normalização do TSH sérico, reforçando a hipótese de que, durante a restrição alimentar, outros parâmetros possam influenciar, diretamente, a atividade desta enzima na tireóide, como por exemplo, o aumento de corticosterona.

Coppola *et al* (2005), demonstraram que a combinação de baixas concentrações séricas de leptina com altas concentrações de corticosterona leva ao

aumento da atividade da D2 no hipotálamo. Esses autores sugerem que o aumento da D2 hipotalâmica pode estar relacionado com a diminuição na secreção de TRH, TSH e T3 durante a restrição alimentar. Nossos dados confirmam esses achados pois houve aumento da D2 hipotalâmica observado no grupo R (leptina sérica reduzida e corticosterona sérica aumentada). Esses resultados reforçam a noção de que o aumento da D2 hipotalâmica durante a restrição alimentar pode resultar em um aumento na concentração local de T3 que por sua vez diminui a expressão de TRH e, por conseqüência, de TSH (COPPOLA *et al*, 2005).

De acordo com os achados de Coppola *et al*, para a regulação de D2 hipotalâmica, a restauração da leptina, na presença de corticosterona sérica aumentada, possivelmente foi capaz de normalizar o TRH, secundariamente à normalização da D2 hipotalâmica. A normalização do TSH sérico, apesar de T4 e T3 diminuídos, pode ser devido à diminuição da D2 hipofisária em animais RL. Este fato resultaria em diminuição na produção de T3 intracelular, promovendo assim aumento na secreção de TSH.

É bem sabido que o TSH é o hormônio mais importante na estimulação de todas as etapas de biossíntese dos hormônios tireóideos, incluindo a captação de iodeto (FERREIRA *et al*, 2005; UYTTERSROT *et al*, 1997; GERARD *et al*, 1988). No entanto, apesar dos níveis séricos de TSH terem sido restaurados no grupo RL, houve inibição na captação de iodeto, enquanto no grupo R, cujo TSH sérico estava diminuído, a atividade do NIS não foi alterada. Esse fato sugere que a leptina possui efeito inibitório direto na regulação do transportador sódio-iodeto (NIS) *in vivo*, tanto durante restrição alimentar quanto em animais alimentados *ad libitum*.

Já foi demonstrado, anteriormente, que a leptina é capaz de inibir a captação de iodeto induzida por TSH tanto em tireóide de ratos adultos como em linhagem de

células de tireóide FRTL-5 (ISOZAKI *et al*, 2004; OLIVEIRA *et al*, 2007). Entretanto, o efeito inibitório da leptina sobre a função do NIS durante a restrição alimentar nunca havia sido descrito.

Estudos anteriores (HARRIS *et al*, 1978; MOURA *et al*, 1987; DE PEDRO *et al*, 2003; FERREIRA *et al*, 2005) demonstraram haver decréscimo no conteúdo tireóideo de iodo 1, 2 ou 4 horas após a administração de radioiodo em animais em jejum por 2 ou 5 dias. No presente trabalho, observamos que a restrição alimentar por 25 dias não promove diminuição na captação tireóidea de iodeto, sugerindo uma resposta adaptativa à prolongada situação de privação energética. Interessantemente, demonstramos que durante a restrição alimentar a diminuição da concentração sérica de TSH não interferiu na captação de iodeto pela tireóide.

A atividade da TPO está significativamente reduzida, durante a restrição alimentar, efeito possivelmente secundário à diminuição de TSH nesta condição. Entretanto, a normalização da concentração sérica de TSH pela leptina não foi capaz de normalizar a atividade da TPO.

Postulamos que a diminuição da atividade da TPO, que ocorre na restrição alimentar, leva à diminuição no conteúdo de iodo organificado que é um potente modulador negativo da captação de iodeto. Assim, conforme descrito por Ferreira *et al* 2005, a diminuição do iodo organificado intracelular aumentaria a captação de iodeto, independentemente da concentração sérica diminuída de TSH.

Resumidamente, durante a privação energética e na presença de leptina sérica normal, e corticosterona aumentada, a glândula tireóide parece ser profundamente afetada, independentemente da concentração de TSH. A diminuição dos níveis séricos de leptina, aparentemente, diminui a função tireóidea secundariamente à supressão do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. A normalização

dos níveis séricos de leptina em animais submetidos à restrição alimentar diminuiu a captação de iodeto, e não foi capaz de restaurar a D1 na tireóide, apesar da restauração do TSH sérico. Essas alterações na glândula tireóidea podem estar relacionadas com os níveis séricos elevados de corticosterona, o que deve ser melhor avaliado em estudos futuros.

A reposição de leptina restaura parcialmente o T3 sérico, diminuído durante a restrição alimentar prolongada, o que pode estar relacionado com a normalização das atividades das enzimas desidases tipo 1 no fígado e no rim e do tipo 2 no tecido adiposo marrom.

Com o intuito de desvendar os mecanismos relacionados à ação da leptina e da corticosterona sobre a glândula tireóide, iniciamos modelos de cultivo celular.

O TSH é o mais importante estimulador da captação de iodeto em tireócitos e esse efeito é dependente do aumento de AMPc. Esse fato foi demonstrado por Kogai *et al*, (1997), utilizando uma linhagem de células derivadas de tireóide murina (FRTL-5). Os autores cultivaram as células FRTL-5 durante 8 dias na ausência de TSH e posteriormente repuseram o TSH e observaram que após 24h da reposição a captação já havia aumentado, atingindo o ponto máximo em 72h após a reposição do TSH no meio de cultivo. Riedel *et al*, (2001) obtiveram resultados semelhantes com essa mesma linhagem de células ao avaliarem a expressão e localização subcelular do NIS. Após 3 dias de cultivo celular sem TSH a quantidade de NIS localizado na membrana havia diminuído significativamente, bem como a expressão do seu RNAm.

Em nosso protocolo de cultivo celular, incubamos por 48h as células PCCL-3 em meio de cultura sem TSH. Assim como nas FRTL-5, nas PCCL-3 houve diminuição da expressão do NIS na ausência de TSH por 48h. Após esse período,

incubamos as células em meio de cultivo contendo TSH na presença ou ausência de leptina por 72h. Como demonstrado por Kogai *et al* (1997), nesse tempo e na presença de TSH a captação de iodeto está restabelecida. Assim sendo, as células que foram tratadas apenas com TSH não apresentaram comprometimento na captação de radioiodo. Porém, quando incubamos as células na presença de TSH e leptina, as células PCCL-3 não captaram o radioiodo, sugerindo que a expressão do NIS e/ou sua translocação para a membrana plasmática tenham sido inibidas pela leptina. Dessa forma, demonstramos que a leptina tem ação direta sobre as células PCCL-3, impedindo a ação do TSH sobre o NIS. Estes resultados estão de acordo com dados prévios de Isozaki *et al* (2004), que utilizaram, no entanto, as células FRTL-5 e são coerentes com nossos resultados *in vivo*. Esses autores demonstraram que o efeito inibitório da leptina sobre a captação de iodeto, induzida por TSH, é independente da produção de AMPc e é determinada pela supressão do RNAm do NIS, também induzido por TSH. Além disso, eles demonstraram que a leptina inibe a expressão de RNAm da tireoglobulina, outra etapa importante para a biossíntese hormonal e que é estimulada por TSH.

Considerando esses dados, podemos concluir que a leptina exerce ação direta sobre os tireócitos, inibindo o NIS e sobrepondo-se ao efeito estimulatório do TSH, independentemente da corticosterona. Entretanto, mais estudos são necessários para se esclarecer a via de sinalização ativada ou bloqueada pela leptina no tireócito.

Em conclusão, além do papel na regulação central do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, a leptina exerce efeito periférico direto tanto sobre a glândula tireóide quanto sobre a atividade das desidases em diversos tecidos. Algumas das

alterações detectadas durante a restrição alimentar também podem estar relacionadas com as elevadas concentrações séricas de corticosterona.

6 – CONCLUSÃO

A restrição alimentar diminui a função tireóidea por mecanismos centrais e periféricos relacionados à diminuição nas concentrações séricas de leptina e, possivelmente, aumento de corticosterona.

A captação tireóidea de iodeto é negativamente regulada pela leptina de maneira independente da condição alimentar do animal, através de efeitos diretos sobre o tireócito, sobrepujando a ação estimuladora do TSH sobre esta etapa da biossíntese hormonal.

A normalização da concentração sérica de TSH durante a restrição alimentar não foi suficiente para aumentar o T4, pois as etapas da biossíntese hormonal afetadas pela restrição alimentar não foram restauradas pela administração de leptina por 10 dias, o que pode estar relacionado aos níveis séricos elevados de corticosterona, uma vez que a hiperleptinemia não causou diminuição de tireoperoxidase ou da D1 tireóidea nos animais alimentados que têm corticosterona sérica normal.

A leptina exerce papel regulador sobre as atividades desidases do tipo 1 hepática e renal pois, mesmo com T4 e T3 séricos diminuídos, tanto na restrição alimentar quanto nos animais alimentados, essas enzimas têm atividades semelhantes a dos animais controle.

Da mesma forma, as desidases do tipo 2 hipotalâmica, hipofisária e do tecido adiposo marrom, têm a leptina como principal modulador, durante a restrição alimentar, pois há regulação tecido-específica, em resposta à normalização de leptina, mesmo com T4 e T3 diminuídos e corticosterona elevada.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahima RS & Flier JS. (2000) Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 413-437.

Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK & Flier JS. (1999) Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinol.* 140: 4923-4931.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E & Flier JS. (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 382: 250-252.

Ahima RS, Saper CB, Flier JS & Elmquist JK. (2000) Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinol.* 21: 263-307.

Araujo RL, Andrade BM, Figueiredo AS, Silva ML, Marassi MP, Pereira VS, Bouskela E & Carvalho DP. (2008) Low replacement doses of thyroxine during food restriction restores type 1 deiodinase activity in rats and promotes body protein loss. *J. Endocrinol.* 1: 119-125.

Arnold S, Gloglia F & Kadenbach B. (1998) 3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP. *Eur. J. Biochem.* 252: 325-330.

Asensio CS, Arsenijevic D, Lehr L, Giacobino J-P, Muzzin P & Rohner-Jeanraud F. (2008) Effects of leptin on energy metabolism in b-less mice *Int. J. Obes.* 32: 936–942.

Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M & Rossetti L. (1997) Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J. Clin. Invest.* 100: 3105-3110.

Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW & Larsen PR. (1991) Selenocysteine confers the biochemical properties of the type I iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* 266: 14155-14158.

Bianco AC. (2000) Hormônios tireóideos, UCPs e termogênese. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 44: 281-289.

Bianco AC & Kim BW. (2006) Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest.* 116: 2571-2579.

Bianco AC & Kimura ET. (1999) Fisiologia da Glândula Tireóide. Em: Aires, MM (editor) *Fisiologia*. Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro, cap. 69, p. 812-828.

Bianco AC & Silva JE. (1987) Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 79: 295-300.

Bianco AC & Silva JE. (1988) Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *Am. J. Physiol.* 255: E496-E503.

Bianco AC, Nunes MT, Hell NS & Maciel RM. (1987) The role of glucocorticoids in the stress-induced reduction of extrathyroidal 3,5,3'-triiodothyronine generation in rats. *Endocrinol.* 120:1033-1038.

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ & Larsen PR. (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23: 38-89.

Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B & Flier JS. (1997) Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 3686- 3695.

Boden G, Chen X, Mozzoli M & Ryan I. (1996) Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 3419-3423.

Boelen A, Kwakkel J, Vos XG, Wiersinga WM & Fliers E. (2006) Differential effects of leptin and refeeding on the fasting-induced decrease of pituitary type 2 deiodinase and thyroid hormone receptor beta2 mRNA expression in mice. *J. Endocrinol.* 190: 537-544.

Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M & Scherbaum WA. (1997) Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes.* 46: 1235-1238.

Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Cabanelas A, Lisboa PC, Moura EG & Pazos-Moura CC. (2006) Leptin acute modulation of the 5'-deiodinase activities in hypothalamus, pituitary and brown adipose tissue of fed rats. *Horm. Metab. Res.* 38: 481-485.

Capen C. (1996) Anatomy. In: Braverman, LE & Utiger, RD (editors). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.* (7^a ed). Lippincott-Raven, Nova Iorque, cap. 3, p. 19-46.

Carvalho DP, Rego KGM & Rosenthal D. (1994) Thyroid peroxidase in dysmorphogenetic goiters with organification and thyroglobulin defects. *Thyroid.* 4: 421-426.

Carvalho DP. (2003) Modulation of uterine iodothyronine deiodinases – A Critical Event for Fetal Development? *Endocrinol.* 144: 4250-4252.

Cettour-Rose P, Burger AG, Meier CA, Visser TJ & Rohner-Jeanrenaud F. (2002) Central stimulatory effect of leptin on T3 production is mediated by brown adipose tissue type II deiodinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 83: E980-E987.

Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD & Mantzoros CS. (2003) The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J. Clin. Invest.* 111: 1409-1421.

Chazenbalk G, Magnusson RP & Rapoport B. (1987) Thyrotropin stimulation of cultured thyroid cells increases steady state levels of the messenger ribonucleic acid for thyroid peroxidase. *Mol. Endocrinol.* 1: 913-917.

Clement K, Vaisse C, Lahlous N, Cabrol S & Pelloux V. (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 392: 398-401.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A & Stephens TW. (1996) Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334: 292-295.

Coppola A, Meli R & Diano S. (2005) Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinol.* 146: 2827-2833.

Croteau W, Whittemore SL, Scheneider MJ & St Germain DL. (1995) Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. *J. Biol. Chem.* 270: 16569-16575.

Cusin I, Rouru J, Visser T, Burger AG, Rohner-Jeanrenaud F. (2000) Involvement of thyroid hormones in the effect of intracerebroventricular leptin infusion on uncoupling protein-3 expression in rat muscle. *Diabetes.* 49:1101- 1105.

Dai G, Levy O & Carrasco N. (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 379: 485-460.

Davidson RT, Arias EB & Cartee GD. (2002) Calorie restriction increases muscle insulin action but not IRS-1, IRS-2, or phosphotyrosine-PI 3-kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282: 270-76.

De Pedro N, Delgado MJ, Gancedo B & Alonso-Bedate M. (2003) Changes in glucose, glycogen, thyroid activity and hypothalamic catecholamines in tench by starvation and refeeding. *J. Comp. Physiol.* 173: 475-481.

Diekman MJ, Romijn JA, Endert E, Sauerwein H & Wiersinga WM. (1998) Thyroid hormones modulate serum leptin levels: observations in thyrotoxic and hypothyroid women. *Thyroid.* 8:1081-1086.

Dohan O, Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS & Carrasco N. (2003) The sodium/iodide symporter (nis): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr. Rev.* 24: 48-77.

Dumont JE & Vassar G. (2001) Thyroid regulatory factors. In: DeGroot LJ & Jameson JI (editors) *Endocrinology*. Saunders Company, p. 1301-1319.

Elmqvist JK, Bjorbaek C, Ahima RS & Flier JS. (1998). Distributions of leptin receptor isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 395: 535-547.

Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey F & Morreale-Escobar G. (1997) Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology.* 138: 4485-4488.

Eskandari S, Loo DDF, Dai G, Levy O, Wright EM & Carrasco N. (1997) Thyroid Na^+/I^- Symporter – Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J. Biol. Chem.* 272: 27230-27238.

Faggioni R, Feingold KR & Grunfeld C. (2001) Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB. J.*15: 2565-2571.

Fekete C, Kelly J, Mihály E, Sarkar S, Rand WM, Légrádi G, Emerson CH & Lechan RM. (2001) Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinol.* 142: 2606-2613.

Ferreira AC, Lima LP, Araujo RL, Müller G, Rocha RP, Rosenthal D & Carvalho DP. (2005) Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotrophin and iodine. *J. Endocrinol.* 1: 69-76.

Filetti S, Bidart S-M, Arturi F, Caillou B, Russo D & Schlumberger M. (1999) Sodium/Iodide symporter: a key transporter system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* 144: 443-457.

Flier JS. (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell.* 116: 337-50.

Fusco A, Berlingiero MT, Di Fiore PP, Portella G, Grieco M & Vecchio G. (1987) One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 7: 3365-3370.

Galaz CF, Agullo TF, Perez C, Fermín Y, Peralta S, Arribas C, Andres A, Carrascosa JM & Ros M. (2002) Long-term food restriction prevents ageing-associated central leptin resistance in Wistar rats. *Diabetol.* 45: 997-1003.

Gazdag AC, Dumke CL, Kahn R & Cartee GD. (1999) Calorie restriction increases insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle from IRS-1 knockout mice. *Diabetes* 48: 1930-1936.

Gerard CM, Lefort A, Libert F, Christophe D, Dumont JE & Vassart G. (1988) Transcriptional regulation of the thyroperoxydase gene by thyrotropin and forskolin. *Mol Cell Endocrinol* 60: 239-242.

Germain DL & Galton VA. (1997) The deiodinase family of selenoproteínas. *Thyroid.* 7: 655-668.

Goglia F. (2005) Biological effects of 3,5-diiodothyronine (T2). *Biochemistry (Mosc).* 70: 164-172.

Goglia F, Lanni A, Barth J & Kadenbach B. (1994) Interaction of diiodothyronines with isolated cytochrome c oxidase. *FEBS Lett.* 346: 295-298.

Grozovsky R, Morales MM & Carvalho DP. (2007) Biphasic modulation of insulin receptor substrate-1 during goitrogenesis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40: 679-686.

Hakansson ML & Meister B. (1998) Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* 68: 420-427.

Halaas J, Gajiwala K, Maffei M, Cohen S & Chait B. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* 269: 543-546.

Hamilton BS, Paglia D, Kwan AYM & Dietel M. (1995) Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat. Med.* 1: 953- 56.

Harris AR, Fang SL, Azizi F, Lipworth L, Vagenakis AG & Barverman LE. (1978) Effect of starvation on hypothalamic-pituitary-thyroid function in the rat. *Metabolism.* 27: 1074-1083.

Hoggard N, Hunter L, Duncan J, Williams LM, Trayhurn P & Mercer JG. (1997) Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 11073-11078.

Horst C, Rokos H & Seitz HJ. (1989) Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-diiodo-L-thyronine. *Biochem. J.* 261: 945-950.

Isozaki O, Tsushima T, Nozoe Y, Miyakawa M & Takano K. (2004) Leptin regulation of the thyroids: negative regulation on thyroid hormone levels in euthyroid subjects and inhibitory effects on iodide uptake and Na⁺/I⁻ symporter mRNA expression in rat FRTL-5 cells. *Endocr. J.* 4: 415-423.

Jennings AS & Ferguson DC. (1984) Effect of dexamethasone on triiodothyronine production in the perfused rat liver and kidney. *Endocrinol.* 114: 31-36.

Jim L, Burguera BG, Couce ME, Scheithauer BW, Lamson J & Eberhardt NL. (1999) Leptin and leptin receptor expression in the normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role of leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol. Metab.* 84: 2903-11.

Jim L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY & Kulig E. (2000) Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinol.* 141: 333-339.

Kaminsky SM, Levy O, Salvador C, Dai G & Carrasco N. (1994) Na⁺/I⁻ symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I⁻transporting cultured thyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 3789-3793.

Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A & Onaya T. (1997) Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinol.* 138: 2227-2232.

Köhrle J. (1999) Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151: 103-119.

Köhrle J, Hesch RD & Leonard JL. (1991) Intracellular Pathways of iodothyronine Metabolism. *In:* Braverman, LE. & Utiger, RD (editors). *The Thyroid - A Fundamental and Clinical Text.* (6^a ed). Philadelphia, p. 144-189.

Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ & Henry R. (1996) Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes.* 45: 699-701.

Krotkiewski M. (2002) Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur. J. Pharmacol.* 440: 85-98.

Larsen PR, Davies TF, Schlumberger MJ & Hay ID. (2002) Thyroid Physiology and Diagnostic Evaluation of Patients with Thyroid Disorders. *In:* Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S & Polonsky KS (editors) *Williams Textbook of Endocrinology.* (10^a ed). W B Saunders Company, Philadelphia, cap. 10, p. 331-573.

Laws SC, Stoker TE, Ferrell JM, Hotchkiss MG & Cooper RL. (2007) Effects of altered food intake during pubertal development in male and female wistar rats. *Toxicol. Sci.* 100: 194-202.

Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS & Lechan RM. (1997) Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 138: 2569-2576.

Leonard JL & Visser TJ. (1986) Biochemistry of deiodination. In: Hennemann, G (editor). *Thyroid Hormone Metabolism* (8^a ed). Dekker, New York, p. 189-230.

Leonhardt U, Ritzel U, Schäfer G, Becker W & Ramadori G. (1998) Serum leptin levels in hypo- and hyperthyroidism. *J. Endocrinol.* 157: 75-79.

Lisboa PC, Oliveira KJ, Cabanelas A, Ortiga-Carvalho TM & Pazos-Moura CC. (2003) Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284: E1172-E1176.

Lujan ME, Krzemien AA, Reid RL & Van Vugt DA. (2006) Effect of leptin administration on ovulation in food-restricted rhesus monkeys. *Neuroendocrinol.* 84:103-114.

Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW & Larsen PR. (2005) Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J. Clin. Invest.* 115: 2524-2588.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K & Matsumoto T. (1997) Nonadipose production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.* 3:1029-1033.

Montague CT, Farooqui S, Whitehead JP, Soos MA & Rau H. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early onset obesity in humans. *Nature.* 387: 903-908.

Moreira DG, Marassi MP, Côrrea da Costa VM, Carvalho DP & Rosenthal D. (2005) Effects of ageing and pharmacological hypothyroidism on pituitary-thyroid axis of Dutch-Miranda and Wistar rats. *Exp. Gerontol.* 40: 330-334.

Moreno M, Lanni A, Lombardi A & Goglia F. (1997) How the thyroid controls metabolism in rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *J. Physiol.* 505: 529-538.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.

Moura EG, Ramos CF, Nascimento CC, Rosenthal D & Breitenbach MM. (1987) Thyroid function in fasting rats: variations in ^{131}I uptake and transient decrease in peroxidase activity. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20: 407-410.

Moura EG, Rosenthal D & Carvalho-Guimarães DP. (1989) Thyroid peroxidase activity in human nodular goiters. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22: 31-39.

Moura EG, Santos RS, Lisboa PC, Alves SB, Bonomo IT, Fagundes AT, Oliveira E & Passos MC. (2008) Thyroid function and body weight programming by neonatal hyperthyroidism in rats - the role of leptin and deiodinase activities. *Horm. Metab. Res.* 40: 1-7.

Nakashima T & Taurog A. (1978) Improved assay procedures for thyroid peroxidase; applications to normal and adenomatous human thyroid tissue. *Clin. Chimica Acta.* 83: 129-140.

Nowak KW, Kaczmarek P, Mackowiak P, Ziolkowska A, Albertin G, Ginda WJ, Trejter M, Nussdorfer GG & Malendowicz LK. (2002) Rat thyroid gland expresses the long form of leptin receptors, and leptin stimulates the function of the gland in euthyroid non-fasted animals. *Int. J. Mol. Med.* 9:31-34.

O'Reilly I & Murphy MP. (1992) Studies on the rapid stimulation of mitochondrial respiration by thyroid hormones. *Acta. Endocrinol. (Copenh.)* 127: 542-546.

Olivares EL, Marassi MP, Fortunato RS, da Silva AC, Costa-e-Sousa RH, Araújo IG, Mattos EC, Masuda MO, Mulcahey MA, Huang SA, Bianco AC & Carvalho DP. (2007) Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats a time course study. *Endocrinol.* 148: 4786-4792.

Oliveira E, Teixeira Silva Fagundes A, Teixeira Bonomo I, Curty FH, Fonseca Passos MC, de Moura EG & Lisboa PC. (2007) Acute and chronic leptin effect upon in vivo and in vitro rat thyroid iodide uptake. *Life Sci.* 81:1241-1246.

Ortiga TMR. (1992) Secreção in vivo de tireotrofina basal pós TRH de adenohipófises de ratos hipo e hipertireóideos. Monografia apresentada no Instituto de Biologia (UERJ) para obtenção de grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Rio de Janeiro.

Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Soares BA & Pazos-Moura CC. (2002) The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: in vivo and in vitro studies. *J. Endocrinol.* 174: 121-125.

Peralta S, Carrascosa JM, Gallardo N, Ros M & Arribas C. (2002) Ageing increases SOCS-3 expression in rat hypothalamus: effects on food restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 425-428.

Pereira da Silva M, Torsoni MA, Nourani HV, Augusto VD, Souza CT & Gasparetti AL. (2003) Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology.* 144: 4831-4840.

Pinkney JH, Goodrick SJ, Katz J, Johnson AB, Lightman SL, Coppack SW & Mohamed-Ali V. (1998) Leptin and the pituitary-thyroid axis: a comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 49: 583-588.

Pohl V, Abramowicz M, Vassart G, Dumont JE & Roger PP. (1993) Thyroperoxidase mRNA in quiescent and proliferating thyroid epithelial cells: expression and subcellular localization studied by *in situ* hybridization. *Eur. J. Cell. Biol.* 62: 94-104.

Pommier J. (1978) Solubilization, purification, propriétés moléculaires et mécanisme d'action de la peroxidase thyroïdienne. *In*: Hornek R & Nunez J (editors). *Méthodologie Experimentale en Physiologie et Physiopathologie Thyroïdienne*. INSERM, Paris, p. 137-148.

Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B & Gaillard RC. (1998) Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinol.* 139: 4264-4268.

Raspe E & Dumont JE. (1991) Robert Feulgen Lecture 1991. Control and role of major signalling cascades of the thyrocyte. *Prog. Histochem. Cytochem.* 26: 1-29.

Rich TP, Huang SA, Schmechel SC, Mariash CN, Anderson GW & Ingbar DH. (2008) Expression of type 3 iodothyronine deiodinase (D3) in acute lung injury (ALI) human tissue. *Short communication during 79th Annual Meeting of the American Thyroid Association.* Chicago – Illinois, October 1-5, 2008.

Riedel C, Levy O & Carrasco N. (2001) Post-transcriptional Regulation of the Sodium/Iodide Symporter by Thyrotropin. *J. Biol. Chem.* 276: 21458-21463.

Rosenbaum M, Goldsmith R, Bloomfield D, Magnano A, Weimer L, Heymsfield S, Gallagher D, Mayer L, Murphy E & Leibel RL. (2005) Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *J. Clin. Invest.* 115: 3579-3586.

Rosenbaum M, Murphy E, Heymsfield SB, Matthews DE & Leibel RL. (2002) Low dose leptin administration reverses effects of sustained weight-reduction on energy expenditure and circulating concentrations of thyroid hormones. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2391-2394.

Ross MH, Reith EJ & Romrell LJ. (1993) Glândulas Endócrinas. Em: Ross, MH & Rowrell, LJ (editores). *Histologia Texto e Atlas* (2ª ed). Editorial Médica Panamericana, São Paulo, cap. 20, p. 573-577.

Sader S, Nian M & Liu P. (2003) Leptin a novel link between obesity, diabetes, cardiovascular risk, and ventricular hypertrophy. *Circulation.* 108: 644-646.

Saladin R, Devos P, Guerre-Millo M, Leturge A & Girard J. (1995) Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature.* 377: 527-529.

Salih MA, Herbert DC & Kalu DN. (1993) Evaluation of the molecular and cellular basis for the modulation of thyroid c-cell hormones by aging and food restriction. *Mech. Ageing Dev.* 70: 1-21.

Scanlon MF. (2001) Thyrotropin-releasing hormone and thyroid-stimulating hormone. In: DeGroot, LJ (editor). *Endocrinology* (4ª ed). Saunders Company, p. 1279-1289.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P & Baskin DG. (1996) Identification of targets of leptin action in the rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 98: 1101-1106.

Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr. D, Seeley RJ & Baskin DG. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature.* 404: 661-671.

Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC & Karniski LP. (1999) The Pendred Syndrom Gene Encodes a Chloride-iodide Transport Protein. *Nature genetics*. 21: 400-443.

Seoane LM, Carro E, Tovar S, Casanueva FF & Dieguez C. (2000) Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regul. Pept.* 25: 25-29.

Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL & Jhiang SM. (1996) Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226: 339-345.

Steinberg GR, Dyck DJ, Calles-Escandon J, Tandon NN, Luiken JJ, Glatz JF & Bonen A. (2002) Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 277:8854-8860.

Tartaglia LA. (1997) The leptin receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 6093-6096.

Taurog A. (2000) Hormone Synthesis: Thyroid Iodine Metabolism. In: Braverman LE & Utiger RD (editors). *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text* (8th ed). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, cap. 4, p. 61-85.

Thomas T & Burguera B. (2002) Is leptin the link between fat and bone mass? *J. Bone Miner. Res.* 17: 1563-1569.

Umemoto Y, Tsuji K, Yang FC, Ebihara Y, Kaneko A & Furukawa S. (1997) Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 90: 3438-3443.

Uyttensprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE & Miot F. (1997) Moderate doses of iodide *in vivo* inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 131: 195-203.

Valcavi R, Zini M, Peino R, Casanueva FF & Dieguez C. (1997) Influence of thyroid status on serum immunoreactive leptin levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 1632-1634.

Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R & Ain KB. (1999) Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻ symporter gene methylation status. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 2449-2457.

Virion A, Michot JL, Deme D, Kaniewski & Pommier J. (1984) NADPH-Dependent H₂O₂ Generation and Peroxidase Activity in Thyroid Particulate Fraction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 36: 95-105.

Westenend PJ, Schröder-van der Elst JP, Van der Heide D, Weening JJ. (1993) Hypothyroidism retards progressive glomerulosclerosis in the rat by a reduction in food intake. *Nephrol. Dial. Transplant.* 8: 1344-1349.

Winnicki M, Phillips BG, Accurso V, Van De Borne P, Shamsuzzaman A & Patil K. (2001) Independent association between plasma leptin levels and heart rate in heart transplant recipients. *Circulation.* 104: 384-386.

Yen PM. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* 81: 1097-1126.

Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K & Saruta T. (1998) Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 48:299-302.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L & Friedman JM. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372: 425-432.

ANEXO 1

Title Page

TISSUE-ESPECIFIC DEIODINASE REGULATION DURING FOOD RESTRICTION
AND LOW REPLACEMENT DOSE OF LEPTIN IN RATS

Araujo RL, Andrade BM, Silva ML, Ferreira ACF, Carvalho DP.

Laboratório de Fisiologia Endócrina Doris Rosenthal, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. Email: rlaraujo@biof.ufrj.br

Running title: DEIODINASE REGULATION BY LEPTIN DURING FOOD RESTRICTION

Contact information:

Denise Pires de Carvalho

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

CCS-Bloco G- Cidade Universitária, Ilha do Fundão

Rio de Janeiro, 21949-900, Brasil

tel : 55 21 25626552 / 25907147

fax : 55 21 22808193

email : dencarv@biof.ufrj.br

Abstract

The relationship between thyroid function and leptin has been extensively studied; however the mechanisms underlying the changes in thyroid hormone economy that occur during caloric deprivation remain elusive. Our goal was to evaluate the thyroid function of rats submitted to 40% food restriction after chronic leptin replacement. Caloric restriction for 25 days led to significantly reduced serum leptin, TSH, T4, T3 and increased serum corticosterone, while liver, kidney and thyroid type 1 deiodinase (D1) and brown adipose tissue type 2 deiodinase (D2) activities were decreased, and hypothalamic D2 was significantly increased. Interestingly, thyroid iodide uptake was unchanged by caloric restriction, but thyroperoxidase activity was significantly reduced. Leptin replacement for the last 10 days of caloric restriction normalized serum leptin and TSH levels, but serum T4 and T3 levels, and thyroid D1 and TPO activities were not reestablished. Also, a negative effect of leptin administration on NIS function was detected. Liver and kidney D1 and hypothalamic and BAT D2 were normalized by leptin, while pituitary D2 was significantly decreased. In conclusion, a tissue-specific modulation of deiodinases might be implicated in the normalization of thyroid function during leptin replacement in food-restricted rats. Although leptin restores the hypothalamus-pituitary axis during food restriction, it exerts a direct negative effect on the thyroid gland, thus normalization of serum thyroid hormones might depend on changes in deiodinase activities and the long-term thyroid stimulation by TSH to counterbalance the direct negative effects of leptin on the thyroid gland.

Key words: hypothalamus, pituitary, thyroid, caloric deprivation, thyrotropin.

Introduction

Moderate reduction in caloric intake promotes well-known systemic effects such as body and fat mass reduction; however homeostatic mechanisms impair further weight loss after longer periods of food restriction (36,37). Studies in rodents suggest that the reduction in serum leptin levels that occur during weight loss signals to the central nervous system leading to decreased energy expenditure (1,2,3,5). This rapid fall in serum leptin in response to starvation also suppresses immunity, reproductive and thyroid functions through central mechanisms (1,16,19,21,42).

It is well documented that food restriction exerts profound effects on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis, resulting in low plasma thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) levels that seem to be secondary to decreased thyrotropin-releasing hormone (TRH) and thyroid-stimulating hormone (TSH) secretion (4,27,34). The relationship between thyroid hormones and leptin has extensively been studied over the past few years, however many results are still conflicting, and some aspects have not been investigated so far. Apart from the central effects of leptin, decreased serum thyroid hormone during caloric deprivation could also be related to reduced liver type 1 deiodinase (D1) activity, as previously suggested (10,15). However, we have recently shown that low replacement doses of T4 during food restriction restores serum T3 and liver D1 activity, suggesting that decreased liver D1 is a consequence rather than the cause of reduced serum T3 during food restriction (6). Apart from the central effects of leptin on the hypothalamic-pituitary axis, a possible direct effect of this hormone on the thyroid gland or tissue specific deiodinases modulation during food restriction might also occur.

Recently, elegant studies in humans submitted to 8 weeks of food restriction showed that low dose of leptin replacement reversed the effects of sustained weight-reduction on the circulating concentrations of thyroid hormones, without normalizing TSH (37,38). These observations might be explained by a direct stimulatory effect of leptin on the thyroid gland or on the peripheral metabolism of T4 and T3. Instead of possible stimulation of the thyroid by leptin, recent studies have shown its direct negative effects on the ability of thyrocytes to uptake iodide (25, 33)

The transport of iodide is a fundamental step in thyroid hormone biosynthesis and is catalyzed by the Na^+/I^- symporter (NIS), an intrinsic membrane protein localized at the

basolateral membrane of thyrocytes (18). Leptin directly inhibits iodide uptake induced by TSH in FRTL-5 cells (25) and in the thyroids from fed adult rats (33). Thyroid peroxidase (TPO) is a key enzyme in thyroid hormone biosynthesis that catalyzes iodide oxidation, organification and the coupling of iodothyrosines to produce T3 and T4 (40). Thus, leptin might also directly modulate both NIS function and TPO activity during caloric restriction. It remains to be determined whether direct effects of leptin on the thyroid gland and on peripheral deiodinases activities might participate on the normalization of serum thyroid hormone levels during caloric restriction.

So, our aim was to evaluate thyroid function, and type 1 and type 2 deiodinases in food-restricted rats treated with replacement doses of leptin in order to determine whether leptin normalization could exert direct actions on the thyroid or on the peripheral metabolism of T4 and T3.

Materials and Methods

Animals

Adult male Wistar rats were housed at controlled temperature (23°C) with daily exposure to a 12h light-dark cycle and free access to water and standard rat chow. This investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No.85-23, revised 1996) and was approved by the Institutional Committee for Evaluation of Animal Use in Research (CAUAP). All animals were individually housed for one week acclimation period and baseline control food intake was assessed.

25 days of food restriction

Food intake was assessed over 7 days for each rat by offering food ad libitum and weighing the quantity of chow consumed. After this period, the ad libitum (control - C) group had free access to food, and the food-restricted (R) group received 60% of their individual baseline intake for 25 days, so that food was 40% restricted. During the period of food restriction the rats were weighed every two days.

Leptin treatment

Fifteen days after the beginning of food restriction, food-restricted (R) rats were randomly assigned to receive chronic leptin treatment by two daily subcutaneous (s.c.) injections (recombinant rat leptin, National Institute of Diabetes & Digestive & Kidney Diseases - NIDDK) or phosphate buffer saline (PBS buffer pH 7.4). A leptin (L) dose of 10 µg / 100 g body mass was administered for the last ten days of food restriction, every 8:00 am and 17:00 pm. After the experimental period (25 days), the animals were sacrificed by decapitation and blood was collected from the trunk. The animals were sacrificed 3 hours after the last leptin administration. Serum was obtained after centrifugation of blood at 1,500 g for 20 minutes, and stored at -20°C until specific radioimmunoassay to determine serum TSH, T3, T4, corticosterone and leptin. Liver and kidney tissue samples and thyroids

were dissected out and stored at -70°C until processing for D1 activity. Hypothalamus, pituitary and brown adipose tissue (BAT) were dissected out and stored at -70°C until processing for D2 activity.

Iodide uptake – NIS activity

We have previously demonstrated that the measurement of radioiodide uptake 15 min after ^{125}I -NaI administration (short-term iodide uptake) reflects iodide transport through the sodium-iodide symporter without the influence of in vivo thyroid iodine organification activity (20). Thus, in order to evaluate the in vivo NIS function using thyroid radioiodine uptake measurements, the animals received $\text{Na-}^{125}\text{I}$ (250,000 cpm, i.p., Amersham, Buckinghamshire, England) 15 min before decapitation. The thyroids were removed and weighed. The radioactivity of the thyroid glands was measured using a gamma counter (LKB) and expressed as percentage of total ^{125}I injected per mg of thyroid.

Thyroperoxidase preparation and activity

TPO extraction from rat thyroids was performed as previously described (22, 30). Rat thyroids were minced and homogenized in 0.5 ml 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.2, containing 1 mM KI, using an Ultra-Turrax homogenizer (Staufen, Germany). The homogenate was centrifuged at 100,000 g, 4°C for 1 h. The pellet was suspended in 0.5 ml digitonin (1%, w/v) and incubated at 4°C for 24 h to solubilize TPO. The digitonin-treated suspension was centrifuged at 100,000 g, 4°C for 1 h, and the supernatant containing solubilized TPO was used for the assays. Protein content was determined by the method of Bradford (13).

The TPO iodide-oxidation activity was measured as previously described (14, 30, 31, 32, 35). The assay mixture contained: 1.0 ml of freshly prepared 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 24 mM KI and 11 mM glucose, and increasing amounts of solubilized TPO. The final volume was adjusted to 2.0 ml with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, and the reaction was started by the addition of 10 μl of 0.1% glucose oxidase (Boehringer Grade I). The increase in absorbance at 353 nm (tri-iodide production) was registered for 4 min on a Hitachi spectrophotometer (U-3300). The $\Delta A_{353\text{nm}}/\text{min}$ was determined from the linear portion of the reaction curve and related to protein concentration. One unit of activity corresponds to $\Delta A_{353\text{nm}}/\text{min} = 1.0$.

Serum leptin, corticosterone, TSH and total T₃ and T₄

Serum leptin concentrations were measured using a specific radioimmunoassay (RIA) for rat leptin obtained from the Linco Research Company (St. Charles, Missouri 63304 USA). The kit uses ¹²⁵I-labeled rat leptin and a rat leptin antiserum to determine the level of serum leptin by the double antibody/PEG technique. Intra- and interassay coefficients of variation were 3.3-6.8% and 4.1-2.0% respectively, and the sensitivity was 0.5 ng/ml using 100µl sample size.

Serum corticosterone concentrations were measured using the ImmuChem™ ¹²⁵I RIA obtained from MP Biomedicals, LCC (Orangeburg, NY 10962 USA). The kit is specifically designed for use in laboratory mice and rats and contained ¹²⁵I-labeled corticosterone and rabbit corticosterone antiserum to determine the levels of serum corticosterone by the double antibody/PEG technique. Intra- and interassay coefficients of variation were 4.4-10.3% and 6.5-7.1% respectively, and the sensitivity was 7.7 ng/ml using 100µl sample size.

Serum TSH levels were evaluated by a specific RIA obtained from the National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases (NIDDK – Bethesda, EUA), and expressed in terms of the reference preparation 2 (RP-2). Intra- and interassay coefficients of variation were 7.7 and 6.5%, respectively, and the sensitivity was 0.63 ng/ml.

Serum total T₃ and T₄ concentrations were measured using commercial radioimmunoassay kits (T₃: DLS – 3100 Active®, sensitivity of 4.3 ng/dl, inter- and intra assay coefficients of variation varied from 4.2 to 6.0% and from 5 to 6.5%, respectively; T₄: DLS – 3200 Active®, sensitivity of 0.4 µg/dl, inter- and intra assay coefficients of variation varied from 7.1 to 7.4% and 2.9 to 5.1%, respectively TX, EUA), based on the presence of specific antibodies adhered to the internal surface of propylene tubes.

All the procedures were carried out following the recommendations of the kits.

Type 1 iodothyronine deiodinase activity

Liver, kidney and thyroid type 1 deiodinases were evaluated as previously described (8,22). In short, tissue (liver or kidney) samples of 25 mg or each thyroid were homogenized in 1ml 0.1 M sodium phosphate buffer containing 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose and 10 mM dithiothreitol, pH 6.9. Homogenates (30 µg of protein from liver or kidney and 15 µg of protein from thyroids) were incubated in duplicate for 1 hour at 37°C

(water bath) with 1 μM rT3 (Sigma, USA), equal volumes of [^{125}I] rT3 (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) previously purified using sephadex LH-20, and 10 mM dithiothreitol (USB) in 100 mM potassium phosphate buffer containing 1 mM EDTA, pH 6.9, in a reaction volume of 300 μl . Blank incubations were carried out in the absence of protein. The reaction was stopped after incubation at 4°C followed by the addition of 100 μl fetal bovine serum (Cultilab, BR) and 200 μl trichloroacetic acid (50%, v/v). The samples were centrifuged at 8,000 g for 3 min and the supernatant was collected for measurement of ^{125}I liberated during the deiodination reaction. Protein concentration in the homogenates was measured by the Bradford method (Bradford, 1976), after incubation of homogenates with NaOH (2.5N). The specific enzyme activity was expressed as picomoles of rT3 deiodinated / min•mg⁻¹ of protein.

Type 2 iodothyronine deiodinase activity

One pituitary gland, hypothalamic tissue surrounding the third ventricle or 25 mg of BAT was homogenized in 0.1 M sodium phosphate buffer containing 1 mM EDTA, 0.25 M sucrose and 10 mM dithiothreitol, pH 6.9. Homogenates (50 μg of protein from pituitary or 100 μg of protein from hypothalamus and 150 μg of protein from BAT) were incubated in triplicate, 3 hours at 37°C with 1 nM [^{125}I] T4 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences), 1 mM PTU and 20 mM dithiothreitol (USB) in 100 mM potassium phosphate buffer containing 1 mM EDTA, pH 6.9, in a reaction volume of 300 μL , as previously described (8, 23). Blank incubations were carried out in the presence of T4 in excess (100 μM). The reaction was stopped at 4°C in an ice bath with the addition of 100 μL fetal bovine serum (Cultilab, BR) and 200 μL trichloroacetic acid (50%, v/v) followed by vigorous agitation. The samples were centrifuged at 8,000 g for 3 min and the supernatant was collected for measurement of ^{125}I liberated during the deiodination reaction. Protein concentration was measured by the method of Bradford (Bradford, 1976), after incubation of homogenates with NaOH (2.5N). The specific enzyme activity was expressed as picomoles of T4 deiodinated / min•mg⁻¹ of protein.

Statistical Analyses

Results were expressed as mean \pm SEM. Body mass, fat content, serum total T₃, T₄, corticosterone and leptin concentrations, and deiodinase activities, were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Bonferroni multiple comparison tests. The results of serum TSH, NIS function and TPO activity were analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison tests. Statistical analyses were performed using the Graphpad Prism software (version 4, Graphpad Software, inc., San Diego, USA). Statistical analyses were done using the software Graphpad Prism (version 4, Graphpad Software, Inc., San Diego, CA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Body composition – mass and fat contents

After 25 days of food restriction (R), final body mass was significantly reduced compared with the C group (Table 1, $p < 0.01$), and the low dose of leptin administered during the last 10 days of food restriction did not produce any further body mass change (Table 1). Retroperitoneal and epididymal fat pads were significantly lower in R compared with C groups (Table 1, $p < 0.01$), and no further reduction in these fat compartments were observed with leptin treatment (Table 1).

Serum leptin, corticosterone, TSH, total T₃ and T₄

Serum leptin concentration was significantly reduced (Table 2, $p < 0.01$) after 25 days of food restriction and the dose of leptin administered was able to restore its concentration to the serum levels found in control animals (Table2).

Serum corticosterone concentrations were significantly increased (Table 2, $p < 0.01$) after 25 days of food restriction, and remained high in the leptin-treated group (RL) (Table 2).

Serum TSH, T₄ and T₃ concentrations were significantly reduced after 25 days of food restriction (Table 2, $p < 0.01$). Leptin replacement was able to restore serum TSH concentrations in the RL group. However, leptin replacement was not effective to normalize serum T₄ levels that remained significantly decreased in RL group (Table 2). On the other hand, the change in serum T₃ induced by prolonged food restriction was partially reversed by leptin. Serum T₃ decreased from 83.88 ± 11.15 to 42.12 ± 3.73 ng/dl in food restricted rats (Table 2, $p < 0.01$), while leptin treatment for 10 days partially restored serum T₃ to 56.58 ± 4.33 (Table 2, $p < 0.05$).

Type 1 iodothyronine deiodinase activity

Liver type 1 iodothyronine deiodinase activity was significantly reduced after 25 days of food restriction (Figure 1A, $p < 0.01$). Leptin replacement normalized liver and kidney D1 activities, although serum T₄ and T₃ remained low (Figure 1A and B).

However, thyroid D1 activity remained reduced in leptin-treated animals, although serum TSH was normal (Figure 1C).

Type 2 iodothyronine deiodinase activity

Hypothalamic type 2 iodothyronine deiodinase activity was significantly increased after 25 days of food restriction (Figure 2A, $p < 0.05$), and leptin treatment normalized D2 activity in food-restricted animals (Figure 2A). The increase in hypothalamic D2 found during food restriction might be implicated in a higher local generation of T3 and thus decreased TRH secretion.

Pituitary D2 activity was not changed by food restriction but leptin administration to food-restricted animals led to a significant reduction in pituitary D2 activity (Figure 2B, $p < 0.05$). Pituitary D2 reduction produced by leptin treatment in food-restricted rats might explain, at least in part, the normalization of serum TSH, which might be secondary to decreased local production of T3 in the thyrotroph.

D2 activity in brown adipose tissue was significantly reduced after 25 days of food restriction (Figure 2C, $p < 0.05$), whereas serum T4 was decreased, and the replacement dose of leptin restored D2 activity in the RL group (Figure 2C), showing that during caloric restriction leptin corresponds to the major regulator of BAT D2.

Iodide uptake – NIS activity

Food restriction did not alter thyroid iodide uptake (Figure 3A), even in the presence of reduced serum TSH. A significant decrease in thyroid iodide uptake was detected in leptin-treated rats (Figure 3A, $p < 0.05$), showing that leptin exerts a direct negative effect on NIS function *in vivo*, regardless of normal serum TSH.

Thyropoxidase activity (TPO)

TPO was significantly decreased after 25 days of food restriction (Figure 3B, $p < 0.01$) and leptin replacement to the RL group did not restore TPO activity (Figure 3B). These data show that restoration of serum TSH is not sufficient to normalize TPO in food-restricted animals treated with leptin.

Discussion

We show herein that 25 days of 40% food restriction leads to reduction in body mass, retroperitoneal and epididymal fat compartments, serum leptin, TSH, T4 and T3, with increased corticosterone, just as previously reported (Araujo et al 2008). Interestingly, the replacement of leptin did not lead to further body mass and fat compartment loss in rats. Others studies that compared ad libitum fed controls with ad libitum fed leptin-treated animals observed that leptin (0.5 ug/g b.w./day to 10 ug/day) significantly reduced food intake (33%-50%), and as a consequence, was able to determine body and fat mass loss (7,15,39). In the present work, we administered a lower dose of leptin (0.2ug/g/day) that was just able to normalize serum leptin in food-restricted animals. Boozer et al. (12) evaluated the effect of low-dose of leptin in the treatment of diet-induced obesity and observed that this strategy was not efficient to determined further weight and fat loss. So, it is important to emphasize here that the expected effects of exogenous leptin (decrease in food intake and increase in energy expenditure) largely depend on the dose used. The purpose of the current study was to further characterize the thyroid alterations induced by caloric restriction and to determine the effect of leptin replacement under these circumstances.

10 days of leptin replacement to food-restricted animals did not normalize serum T4 concentrations; however serum T3 were significantly increased by exogenous leptin administration. Since serum T3 concentrations decreased 50% by food restriction, and leptin replacement led to an increment of 17%, without changes in serum T4, we hypothesize that the mechanism related to normalization of serum T3 by leptin during food restriction can also be related to changes in the peripheral metabolism of T4, apart from the known effects of leptin in the hypothalamic-pituitary axis. These results differ from others (37,39), which described significant increments in both serum T3 and T4 after leptin administration to humans, without significant changes in circulating TSH, however there could be differences due to the dose used and the period of time of leptin treatment, apart from possible species-specific differences related to leptin effects. Studies evaluating the effects of exogenous leptin on the decreased thyroid economy during short term-fasting in animals (24 to 72h) are conflicting. In 1996, it was shown (1) that serum thyroxine decreased within 48 hours of fasting, and a single intraperitoneal dose of leptin could attenuate the fall in thyroxine, but did not restore it to the control levels. Chronic leptin

treatment could also prevent the fall in T4 determined by 70 hours of fasting (3). On the other hand, other studies (11) have shown that leptin (20 ug/0.5 ml, twice a day) did not restore the decreased serum T3 and T4 in 24h-fasted mice, despite serum leptin normalization. Lujan et al (29), using rhesus monkey submitted to prolonged dietary regimen also observed that leptin infusion for 16 weeks did not restore serum T3. These conflicting data show that different approaches lead to controversial results. So, further studies are needed in order to understand the influence of leptin on thyroid axis during fasting and food restriction, which correspond to quite different physiological conditions. Boelen et al. (11) showed that refeeding after 24 hours of fasting in mice resulted in markedly increase in serum leptin levels, which were not different compared with control mice; however it did not result in a complete recovery of serum T4 and T3 levels. These results indicate that normalization of leptin levels do not always parallel restoration of serum thyroid hormone levels, suggesting that other peripheral signals may play a role in the regulation of thyroid gland economy during caloric deprivation.

During food restriction, in addition to decreased leptin, serum corticosterone is significantly higher (9,26). Some authors found that leptin administration is able to reverse the increased serum corticosterone (1,17), however in the present study serum corticosterone remained elevated in leptin-treated rats. We can hypothesize that the ability of leptin to restore serum thyroid hormones, during a situation of negative energy balance might depend on the concerted normalization of serum corticosterone levels, which did not occur in the present study.

So, considering that in our experimental model the difference between R and RL groups corresponds to serum leptin levels, with sustained decreased serum T4, T3 and increased serum corticosterone, we can infer that the changes in deiodinase activities were mainly secondary to leptin normalization. Herein, the fall in serum T3 concentrations determined by food restriction was diminished in RL group compared with R group and we observed that leptin was able to restore D1 activity in liver and kidney, as well as D2 in brown adipose tissue, which might contribute to the increase in serum T3 observed in the RL group. Our data is in accordance with reports that show an important stimulatory effect of leptin on peripheral D1 and D2 activities (15,28). However, decreased D1 in the thyroid was not restored by leptin replacement, regardless of normal serum TSH, suggesting that leptin might directly influence thyroid D1 activity, just as observed for NIS function. Thus, during food restriction decreased serum TSH might be related to decreased thyroid D1, such as observed for TPO. However, neither TPO nor thyroid D1 were normalized by

leptin replacement, probably due to a direct effect of leptin that was not counterbalanced by TSH in the period of time analyzed herein.

A previous study (17) showed that the combination of low serum leptin and high serum corticosterone leads to increased hypothalamic D2 activity, which might indirectly decrease TSH secretion and serum T3 during food restriction. Our data are in agreement with this work, since the increased D2 activity found in the R group was normalized by leptin administration, notwithstanding the fact that serum corticosteroid remained elevated. These results are consistent with the notion that increased hypothalamic D2 activity during food deprivation might result in elevated local T3 production, that in turn decrease TRH expression and as a consequence serum TSH (17).

We hypothesize that leptin is able to restore serum TSH during food restriction possibly through the decrease in hypothalamic and pituitary D2 activity in RL animals. This might result in diminished local T3 production, causing a local hypothyroidism that could increase both TRH and TSH secretion.

It is well known that serum TSH is the most important stimulator of all steps of thyroid hormones biosynthesis, including iodide uptake (20,41,24). Despite the restored serum TSH in RL group, we observed that iodide uptake was inhibited, while in R group NIS function was not altered, showing a direct negative effect of leptin on NIS regulation. Interestingly, we show that during food restriction serum TSH might not be so important for the regulation of thyroid iodide uptake. The inhibitory effect of leptin on iodide uptake induced by TSH has already been shown in FRTL-5 cells and in the thyroids of adult rats (25,33). However, the inhibitory effect of leptin on NIS function in vivo during food restriction has never been described.

In summary, during negative energy balance, independent of serum TSH the thyroid gland seems to be directly affected. Decreased serum leptin levels contribute to the suppression of the hypothalamic-pituitary axis; however the direct effect of leptin on the thyroid per se seems to be mainly inhibitory. Despite the fact that a replacement dose of leptin was able to restore serum TSH, leptin normalization in the serum of food-restricted animals caused impaired thyroid iodide uptake and was not effective in restoring thyroid D1 and TPO activities. It remains to be elucidated whether increased serum corticosterone might play a role in the thyroid gland physiology under these circumstances. On the other hand, leptin positively regulates liver and kidney D1 and BAT D2, which might be related to the increase in serum T3 in leptin treated food-restricted animals.

In conclusion, apart from its central action regulating the hypothalamic-pituitary-thyroid axis, leptin exerts direct peripheral effects on both the thyroid gland and deiodinase activities.

Acknowledgements

We are grateful for the technical assistance of Norma Lima de Araújo Faria, Advaldo Nunes Bezerra and Wagner Nunes Bezerra.

Grants

This work was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX/FAPERJ), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Renata L. Araujo, Bruno M. Andrade and Monique L. Silva were recipients of fellowships from CNPq. Wagner Nunes Bezerra was recipient of fellowship from FAPERJ.

References

1. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250–252, 1996.
2. Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. *J Clin Invest* 101: 1020-1027, 1998.
3. Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS. Distinct physiologic and neural responses to decrease leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* 140: 4923-4931, 1999.
4. Ahima RS. Leptin and neuroendocrinology of fasting. *Frontiers in Hormone Research* 26: 42-56, 2000.
5. Ahima RS. Brain adipocytokine action and metabolism regulation. *Diabetes* 55: S145-154, 2006.
6. Araujo RL, Andrade BM, Figueiredo AS, Silva ML, Marassi MP, Pereira VS, Bouskela E, Carvalho DP. Low replacement doses of thyroxine during food restriction restores type 1 deiodinase activity in rats and promotes body protein loss. *J Endocrinol.*1:119-125, 2008.
7. Barzilai N, Wang J, Massilon D, Vuguin P, Hawkins M, Rossetti L. Leptin selectively decreases visceral adiposity and enhances insulin action. *J Clin Invest.* 12: 3105-3110, 1997.
8. Berry MJ, Banu L, Larsen PR. Selenocysteine confers the biochemical properties of the type 1 iodothyronine deiodinase. *J Biol Chem* 266: 14155-14158, 1991.

9. Bianco AC, Nunes MT, Hell NS, Maciel RM. The role of glucocorticoids in the stress-induced reduction of extrathyroidal 3,5,3'-triiodothyronine generation in rats. *Endocrinology* 120:1033-1038, 1987.
10. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 23: 38-89, 2002.
11. Boelen A, Kwakkel J, Vos XG, Wiersinga WM, Fliers E. Differential effects of leptin and refeeding on the fasting-induced decrease of pituitary type 2 deiodinase and thyroid hormone receptor beta2 mRNA expression in mice. *J Endocrinol.* 2: 537-544, 2006.
12. Boozer CN, Leibel RL, Love RJ, Cha MC, Aronne LJ. Synergy of sibutramine and low-dose leptin in treatment of diet-induced obesity in rats. *Metabolism.* 50: 889-93, 2001.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.
14. Carvalho DP, Rego KGM, Rosenthal D. Thyroid peroxidase in dysmorphogenetic goiters with organification and thyroglobulin defects. *Thyroid* 4: 421-426, 1994.
15. Cettour-Rose P, Burger AG, Meier CA, Visser TJ, Rohner-Jeanrenaud F. Central stimulatory effect of leptin on T3 production is mediated by brown adipose tissue type II deiodinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 5: E980-7, 2002.
16. Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J. Clin. Invest.* 111: 1409-1421, 2003.

17. Coppola A, Meli R, Diano S. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic type 2 in fasted rats. *Endocrinology* 146: 2827-2833, 2005.
18. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and Characterization of the Thyroid Iodide Transporter. *Nature* 379: 485-460, 1996.
19. Farooqi IS, Matarase G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb S, Perna F, Fontana S, Lechler R, DePaoli A, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J. Clin. Invest.* 110: 1093-1103, 2002.
20. Ferreira ACF, Lima LP, Araújo RL, Müller G, Rocha RP, Rosenthal D, Carvalho DP. Rapid regulation of the thyroid sodium-iodide symporter (NIS) activity by thyrotropin, iodine and fasting. *J Endocrinol* 184: 69-76, 2005.
21. Flier JS. What's in a name? In search of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1407-1413, 1998.
22. Fortunato RS, Marassi MP, Chaves EA, Nascimento JH, Rosenthal D, Carvalho DP. Chronic administration of anabolic androgenic steroid alters murine thyroid function. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 38: 256-261, 2006.
23. Fortunato RS, Ignácio DL, Padron AS, Peçanha R, Marassi MP, Rosenthal D, Werneck-de-Castro JPS, Carvalho DP. The effect of acute exercise session on thyroid hormone economy in rats. *Revista* vol: pag, 2008.
24. Gerard CM, Lefort A, Libert F, Christophe D, Dumont JE, Vassart G. Transcriptional regulation of the thyroperoxydase gene by thyrotropin and forskolin. *Mol Cell Endocrinol* 60: 239-242, 1988.
25. Isozaki O, Tsushima T, Nozoe Y, Miyakawa M, Takano K. Leptin regulation of the thyroids: negative regulation on thyroid hormone levels in euthyroid subjects and

- inhibitory effects on iodide uptake and Na⁺/I⁻ symporter mRNA expression in rat FRTL-5 cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 5: 1407-13, 2004.
26. Jennings AS, Ferguson DC. Effect of dexamethasone on triiodothyronine production in the perfused rat liver and kidney. *Endocrinology* 114:31-36, 1984.
 27. Krotkiewski M. Thyroid hormones and treatment of obesity. *International Journal of Obesity* 24: S116–S119, 2000.
 28. Lisboa PC, Oliveira KJ, Cabanelas A, Ortiga-Carvalho TM, Pazos-Moura CC. Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284: E1172-1176, 2003.
 29. Lujan ME, Krzemien AA, Reid RL, Van Vugt DA. Effect of leptin administration on ovulation in food-restricted rhesus monkeys. *Neuroendocrinology.* 84:103-114, 2006.
 30. Moura EG, Ramos CF, Nascimento CC, Rosenthal D, Breitenbach MM. Thyroid function in fasting rats: variations in ¹³¹I uptake and transient decrease in peroxidase activity. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research,* 20: 407-410, 1987.
 31. Moura EG, Rosenthal D, Carvalho-Guimarães DP. Thyroid peroxidase activity in human nodular goiters. *Braz J Med Biol Res* 22: 31-39, 1989.
 32. Nakashima T, Taurog A. Improved assay procedures for thyroid peroxidase; applications to normal and adenomatous human thyroid tissue. *Clin Chim Acta* 83: 129-140, 1978.
 33. Oliveira E, Fagundes ATS, Bonomo IT, Curty FH, Passos MCF, de Moura EG, Lisboa PC. Acute and chronic leptin effect upon in vivo and in vitro rat thyroid iodide uptake. *Life Sci.* 15: 1241-6, 2007.
 34. Orban Z, Bornstein SR, Chrousos GP. The interaction between leptin and the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Horm Metab Res.* 30: 231-5, 1998.

35. Pommier J. Solubilization, purification, propriétés moléculaires et mécanisme d'action de la peroxidase thyroïdienne. In: *Méthodologie Experimentale en Physiologie et Physiopathologie Thyroïdienne*, pp 137-148. edited by Hornek R, Nunez J. Paris: INSERM, 1978.
36. Ravucin E, Burnand B, Schutz Y, Jéquier E. Energy expenditure before and during energy restriction in obese. *Am J Clin Nutrition* 41: 753-759, 1985.
37. Rosenbaum M, Murphy EM, Heymsfield SB, Matthews DE, Leibel RL. Low dose leptin administration reverses effects of sustained weight-reduction on energy expenditure and circulating concentrations of thyroid hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2391–2394, 2002.
38. Rosenbaum M, Goldsmith R, Bloomfield D, Magnano A, Weimer L, Heymsfield S, Gallagher D, Mayer L, Murphy E, Leibel RL. Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *J Clin Invest.*115: 3579-86, 2005.
39. Steinberg GR, Dyck DJ, Calles-Escandon J, Tandon NN, Luiken JJ, Glatz JF, Bonen A. Chronic leptin administration decreases fatty acid uptake and fatty acid transporters in rat skeletal muscle. *J Biol Chem.* 11: 8854-8860, 2002.
40. Taurog AM. Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Braverman LE , Utiger RD, editors. *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text.* (8a ed.). Lippincott-Raven, New York, pp 85-91, 2000.
41. Uyttensprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE & Miot F. Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol* 131: 195-203, 1997.

42. Welt C.K, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith BS, DePaoli AM. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Eng J Me.* 351: 987–997, 2004.

Figures Legends

FIGURE 1 – Type 1 iodothyronine deiodinase (D1) activity in Control (C), Food Restricted (R) and Food Restricted with leptin replacement 10 μ g/100g body mass twice a day (RL) for 10 days. A: Liver D1 (C, n=7; R, n=7; RL, n=7); B: Kidney D1 (C, n=7; R, n=7; RL, n=7) C: Thyroid D1 (C, n=7; R, n=7; RL, n=7). Results are shown as mean \pm SEM. * P < 0.05 or ** P < 0.01 versus control.

FIGURE 2 – Type 2 iodothyronine deiodinase (D2) activity in Control (C), Food Restricted (R) and Food Restricted with leptin replacement 10 μ g/100g body mass twice a day (RL) for 10 days. A: Hypothalamic D2 (C, n=5; R, n=6; RL, n=7); B: Pituitary D2 (C, n=6; R, n=6; RL, n=7). C: Brown Adipose Tissue D2 (C, n=7; R, n=7; RL, n=7); Results are shown as mean \pm SEM. * P < 0.05 versus control.

FIGURE 3 – Thyroid function in Control (C), Food Restricted (R) and Food Restricted with leptin replacement 10 μ g/100g body mass twice a day (RL) for 10 days. A: NIS function (C; n=5 R; n= 5 RL ; n= 5) B: Tireoperoxidase activity (C; n=18 R; n= 21 RL ; n= 10). Results are shown as mean \pm SEM. * P < 0.05 or ** P < 0.01 versus control.

Table 1 – Body mass and fat compartments in Wistar rats: control (C), food-restricted (RL) or food-restricted replaced with leptin (RL).

	BM <i>initial</i>	BM <i>final</i>	Retroperitoneal fat	Epididymal fat
Control (C)	300 ± 4.97	339 ± 5.90	1.67 ± 0.13	1.71 ± 0.14
Food Restriction (R)	299 ± 4.92	269 ± 2.92**	0.66 ± 0.09**	0.23 ± 0.06**
Food Restriction + Leptin (RL)	298 ± 5.34	265 ± 3.03**	0.63 ± 0.12**	0.30 ± 0.07**

Results are expressed as mean ± SEM of at least 10 animals per group. Fat compartments are expressed as g/100g of body mass. BM = body mass in g. Leptin was replaced for the last 10 days of food restriction (10 □g / 100 g body mass twice a day). ** p < 0.01 vs control.

Table 2 – Serum leptin, TSH, T4, T3 and corticosterone in Wistar rats: control (C), food-restricted (RL) or food-restricted replaced with leptin (RL)

	Leptin (ng/ml)	TSH (ng/ml)	T4 (µg/dl)	T3 (ng/dl)	Corticosterone (ng/ml)
Control (C)	7.45 ± 0.34	1.20 ± 0.12	6.88 ± 0.31	87.30 ± 4.04	139.4 ± 23.15
Food Restriction (R)	1.85 ± 0.30**	0.71 ± 0.02**	4.21 ± 0.23**	40.95 ± 2.94**	315.6 ± 27.6**
Food Restriction + Leptin (RL)	6.45 ± 0.05	1.05 ± 0.12	5.06 ± 0.37**	61.59 ± 2.51**#	390.1 ± 33.26**

Results are expressed as mean ± SEM of at least 7 animals per group. Leptin was replaced for the last 10 days of food restriction (10 □g / 100 g body mass twice a day). ** p < 0.01 vs control; # p < 0.01 vs food restriction.

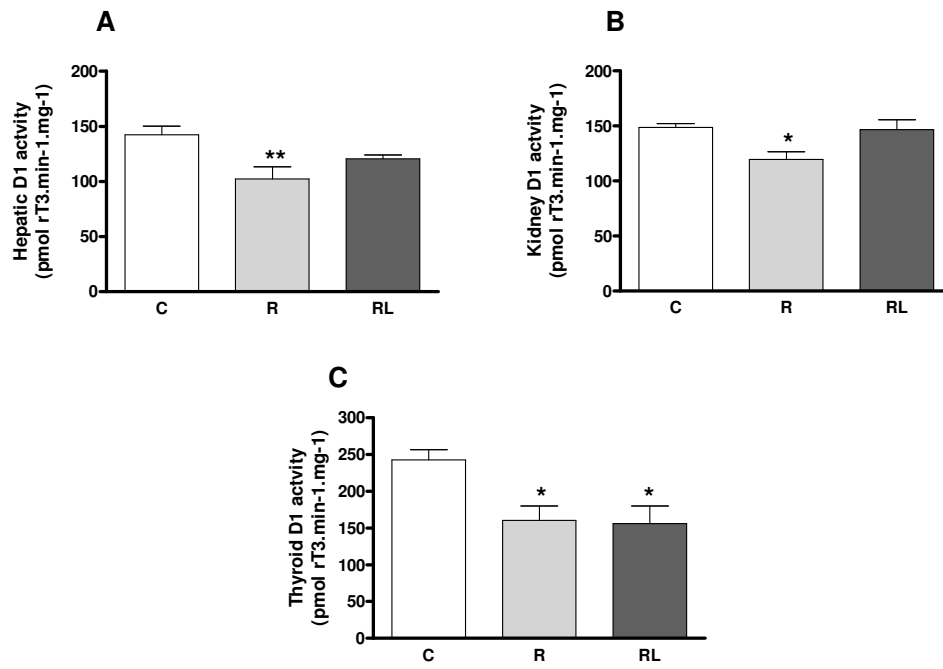


FIGURE 1 – Type 1 iodothyronine deiodinase (D1) activity in Control (C), Food Restricted (R) and Food Restricted with leptin replacement 10 μ g/100g body mass twice a day (RL) Wistar rats. **A:** D1 Hepatic (C, n=7; R, n=7; RL, n=7); **B:** D1 Kidney (C, n=7; R, n=7; RL, n=7) **C:** D1 Thyroid (C, n=7; R, n=7; RL, n=7). Results are shown as mean \pm SE. * P < 0.05 versus control or ** P < 0.01 versus control.

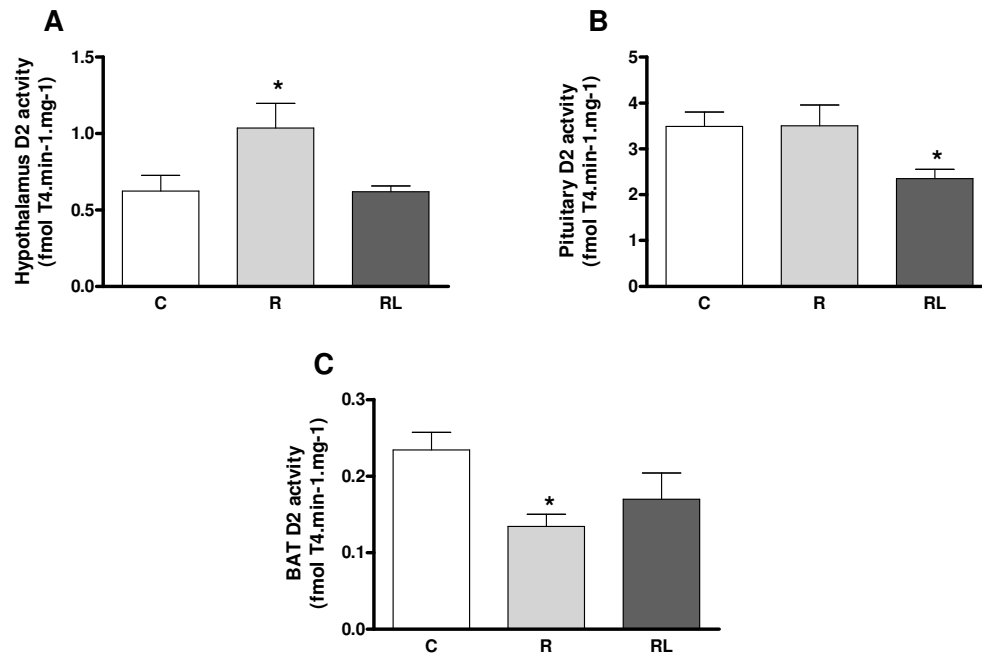


FIGURE 2 – Type 2 iodothyronine deiodinase (D2) activity in Control (C), Food Restricted (R) and Food Restricted with leptin replacement 10 μ g/100g body mass twice a day (RL) Wistar rats. **A:** D2 Hypotalamic (C, n=5; R, n=6; RL, n=7); **B:** D2 Pituitary (C, n=6; R, n=6; RL, n=7). **C:** D2 Brown Adipose Tissue –BAT– (C, n=7; R, n=7; RL, n=7); Results are shown as mean \pm SE. * P < 0.05 versus control.

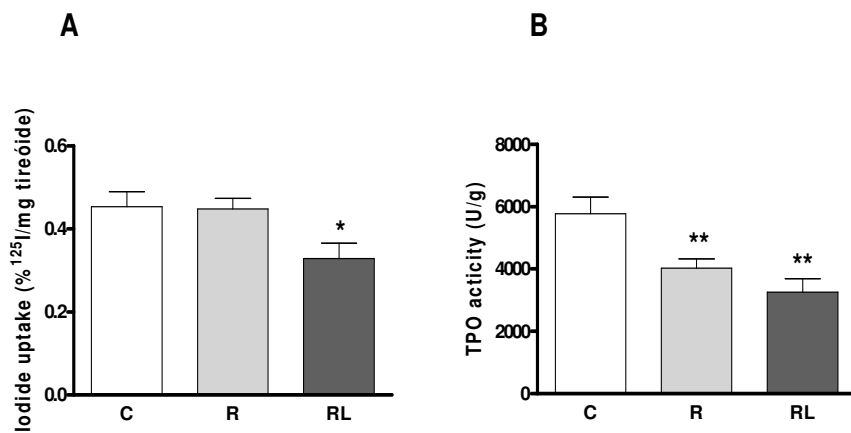


FIGURE 3 – Thyroid function in Control (C), Food Restricted (R) and Food Restricted with leptin replacement 10 μ g/100g body mass twice a day (RL) Wistar rats. **A:** Iodide uptake during 15 minutes (C; n=5 R; n= 5 RL ; n= 5) **B:** Tireoperoxidase activity (C; n=18 R; n= 21 RL ; n= 10). Results are shown as mean \pm SE. * P < 0.05 versus control or ** P< 0. 01 versus control.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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