

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RICARDO HENRIQUE DA COSTA E SOUSA

SOBRE O CONTROLE NEUROENDÓCRINO DA ATIVIDADE DA TIREÓIDE EM DIFERENTES
ESTADOS METABÓLICOS E O ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES Y CENTRAIS

Rio de Janeiro
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Ricardo Henrique da Costa e Sousa

Sobre o controle neuroendócrino da atividade da tireóide em diferentes estados metabólicos e o envolvimento de receptores Y centrais

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Carmen Cabanelas Pazos de Moura

Rio de Janeiro
2010

Costa-e-Sousa, Ricardo Henrique da C. e S.

Sobre o controle neuroendócrino da atividade da tireóide em diferentes estados metabólicos e o envolvimento de receptores Y centrais / Ricardo Henrique da Costa e Sousa. Rio de Janeiro, 2010.
ix, 95.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Fisiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

Orientadora: Carmen Cabanelas Pazos de Moura

Às mulheres que dão mais sentido à minha vida...

Dani e Lara

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Carmen pela confiança, apoio e ensinamentos. Foi um período ótimo!

À Profa. Tânia, por ter realizado a revisão deste trabalho.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPERJ, que nos forneceram suporte financeiro, permitindo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Cecília Heidin, Luís C. Reis e Patrícia F. Gardino, por terem participado da banca examinadora de meu projeto de tese e, portanto, terem contribuído para minha formação.

De forma semelhante, aos Professores Antonio C. Campos de Carvalho, Denise P. Carvalho e Emerson L. Olivares, que participaram da minha qualificação.

A todos do CEDERJ e do DCF com quem trabalhei simultaneamente ao desenvolvimento do doutorado e tanto me ensinaram.

Às meninas do LEM que participaram diretamente em alguma etapa deste trabalho: Adriana, Aline, Camila, Gabi, Karen, Norma principalmente àquela que mais trabalhou comigo, Luana.

À Profa. Patricia Lisboa pela realização do experimento de quantificação da atividade da 5' desidase tireoideana.

Aos amigos que encontrei nos congressos. Como foi bom pode conversar com vocês!!!

Aos familiares e amigos que estiveram ao meu lado durante estes últimos anos, em especial às minhas mãe e avó, Nadia e Dazinha.

RESUMO

Sobre o controle neuroendócrino da atividade da tireóide em diferentes estados metabólicos e o envolvimento de receptores Y.

Ricardo Henrique da Costa e Sousa rhcs@biof.ufrj.br

Objetivou-se investigar o papel de Y1 e Y5 no controle do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) durante o jejum, assim como a ativação deste eixo durante a realimentação. Foram realizadas 2 microinjeções diárias (3o. ventrículo) de antagonistas de receptores Y1 (BIBP3226; 10 nmoles/rato) ou Y5 (CGP71683; 15 nmoles/rato) por 3 dias, em ratos com livre acesso à ração, ou em jejum. Nos animais alimentados, o bloqueio de receptores Y5 centrais promoveu redução de 32% ($P=0,01$) no consumo alimentar total e quase 10% ($P<0,01$) na massa corporal. Houve redução na concentração de T4 ($P<0,0001$) e T3 ($P=0,033$) mas não ocorreu alteração na concentração de TSH. Já o bloqueio de receptores Y5 centrais durante o jejum acentuou a perda de massa corporal ($P=0,005$) e promoveu incremento de mais de 3 vezes na concentração sérica de T4 ($P<0,001$), sem alteração na concentração de TSH ou T3. Por outro lado, a administração única do antagonista de receptores Y5 após 72h de jejum promoveu incremento de cerca de 4 vezes na concentração sérica de TSH ($P<0,001$). O bloqueio de receptores Y1 centrais por 72h em animais com acesso à ração não modificou os parâmetros analisados. Quando o mesmo tratamento com o antagonista de receptores Y1 foi realizado em animais em jejum, houve discreto incremento na concentração sérica de T4 ($P=0,046$) e maior perda de massa corporal ($P=0,044$). Sobre a ativação do eixo HHT durante a realimentação, realizando coleta seriada de sangue, demonstrou-se que a secreção de TSH aumenta nas 3 primeiras horas de realimentação, havendo correlação entre a variação na concentração plasmática de TSH e o consumo de ração ($r=0,56$; $P=0,049$). Em outro experimento, no qual cada grupo sofreu eutanásia após um período de realimentação, foi observado que as concentrações de TSH e T3 apresentaram valor máximo por volta de 2h de realimentação ($P<0,01$), retornando aos valores de jejum após 6h. Já a concentração de T4 alcançou o valor máximo no grupo realimentado por 6h ($P<0,001$). A captação de iodeto estava aumentada com 1h de realimentação ($P<0,05$). As concentrações de leptina e corticosterona não sofreram modificação. Por outro lado, concentração sérica de PYY aumentou já na primeira hora ($P<0,05$). A administração de PYY₃₋₃₆ (0,1nmol/rato, icv) promoveu efeito inibitório sobre a secreção de TSH ($P<0,01$) e a incubação de adenohipófises isoladas de ratos em jejum com diferentes concentrações de PYY₃₋₃₆ não modificou a secreção de TSH. Em suma, foi demonstrado que os receptores Y5 centrais participam do controle da ingestão alimentar em condições basais e sua ativação durante o jejum contribui para a supressão do eixo HHT. Durante a realimentação ocorre rápida ativação do eixo HHT, simultaneamente ao incremento na concentração de PYY.

ABSTRACT

On the role of Y receptors in the neuroendocrine control of thyroid activity during fasting and refeeding.

Ricardo Henrique da Costa e Sousa rhcs@biof.ufrj.br

The present work investigated the possible role for central Y1 and Y5 receptors in the control of hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in both fed and fasted rats. It was also studied the refeeding-induced HPT axis activation and its relationship to peptide YY (PYY), an Y2 agonist. Twice daily central injections (3rd ventricle) of Y1 (BIBP3226; 10 nmoles/rat) or Y5 (CGP71683; 15 nmoles/rat) receptor antagonist were performed in fed or fasted rats for a 3 day period. Y5 receptor blockade in free fed rats reduced total food intake by 32% ($P=0,01$) and body mass by almost 10% ($P<0,01$). Serum T4 and T3 were reduced as well ($P<0,001$ and $P<0,033$, respectively), probably as a result of weight loss. However there were no changes in serum TSH, PYY or leptin. On the other hand, Y5 blockade during 72h fasting increased body mass lost and produced a 3-time rise in serum T4 ($P<0,001$). Nevertheless, there were no changes in serum TSH, T3, PYY or leptin. A new experiment, with a single dose of Y5 antagonist at the end of 72h fasting period, revealed a 4-time increase in serum TSH ($P<0,001$), suggesting that in the former experiment, serum TSH was reduced due to chronic treatment. Central Y1 receptor blockade in free fed rats did not change any evaluated parameter. However, Y1 blockade during fasting produced an increase in both body mass lost ($P=0,044$) and serum T4 ($P=0,046$), without changes in serum TSH or T3. Regarding refeeding-induced HPT axis activation, the present work clearly demonstrated that it is an early event. Through serial blood sample it was also demonstrated that TSH secretion is correlated to the amount of food intake in the first 3 hours ($r=0,56$; $P= 0,049$). In a different experiment one group was killed for each time point (fasted, 1, 2, 3, or 6h of refeeding). Body mass increased gradually up to 6th hour and serum glucose increased in the first hour, remaining still up to the 6th. Thus, it seems that rats keep eating during all refeeding period. Serum TSH and T3 peaked around 2 hours of refeeding ($P<0,01$), but returned to fasted values after 6 hours. On the other hand, serum T4 highest level was found after refeeding for 6h ($P<0,001$). Thyroid iodide uptake was also increased in the first hour ($P<0,05$), suggesting an increased NIS activity. Although both leptin and corticosterone are able to modulate HPT axis activity, those changes described here does not seem to be related to these hormones, since their serum levels have not changed. Since serum PYY increased in the first hour of refeeding ($P<0,05$), it is possible that Y2 receptor activation contributed to HPT axis activation. However, present data is puzzling, because central administration of PYY₃₋₃₆ has decreased serum TSH (0,1nmol/rat; $P<0,01$) and in pituitaries isolated from fasted rats, PYY₃₋₃₆ did not change TSH secretion. In conclusion, it was demonstrated for the first time that Y5 receptor activation contributes to fasting-induced HPT axis suppression. Present work also support an important role for this receptor on the basal control of food intake. Finally, refeeding induces a rapid increase in HPT activity that could be related to PYY secretion.

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP:	Peptídeo relacionado ao <i>agouti</i>
ARC:	Núcleo arqueado do hipotálamo
D1:	iodotironina desiodase do tipo 1
D2:	iodotironina desiodase do tipo 2
CART:	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina
HHT:	Hipotálamo-hipófise-tireóide
MC4-R:	Receptor do tipo 4 para melanocortinas
α MSH:	Hormônio estimulante de melanócitos
NPY:	Neuropeptídeo Y
PYY:	Peptídeo YY
PVN:	Núcleo paraventricular do hipotálamo
TSH:	Tireotrofina
TR:	Receptores de hormônios tireoideanos
TRH:	Hormônio liberador de tireotrofina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Controle neuroendócrino da atividade da tireóide	12
1.2 Regulação da expressão do TRH	18
1.3 Disponibilidade de energia, atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) e o envolvimento de receptores Y	24
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Protocolos experimentais	34
3.1.1 Administração intracerebroventricular seriada de antagonistas de receptores Y1 e Y5 em ratos com livre acesso à ração, ou em jejum	34
3.1.2 Efeito agudo da administração intracerebroventricular de antagonista de receptores Y5 em ratos em jejum	35
3.1.3 Relação entre ingestão alimentar e secreção de TSH após 72 horas de jejum	35
3.1.4 Realimentação após 72 horas de jejum	36
3.1.5 Captação de ¹²⁵ I pela tireóide no jejum e na realimentação	36
3.1.6 Administração intracerebroventricular de PYY ₃₋₃₆ em ratos em jejum	37
3.1.7 Incubação de adenohipófises, isoladas de ratos em jejum, com PYY ₃₋₃₆	37
3.2 Estereotaxia	39
3.3 Implantação de cânula jugular	39
3.4 Radioimunoensaio	39
3.5 Atividade da 5' desidase tireoideana	40
3.6 Western blotting	41
3.7 Análise estatística	43

4 RESULTADOS	44
4.1 Efeitos do bloqueio de receptores Y1 ou Y5 centrais em animais com acesso à ração, ou em jejum	45
4.2 Efeito da realimentação sobre o eixo HHT e possíveis mediadores deste efeito	52
4.3 Efeitos central e hipofisário do PYY₃₋₃₆ sobre a secreção de TSH, em animais em jejum	58
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

A manutenção do meio interno em condições adequadas é vital para organismos pluricelulares, notoriamente para os vertebrados. Para que isso ocorra, é fundamental que haja meios de comunicação entre os diversos tecidos que compõe o organismo, possibilitando a integração da atividade destes, fundamental para o fenômeno homeostático.

Existem, basicamente, dois tipos de sinalização entre tecidos, uma ocorre através de moléculas sinalizadoras secretadas para o fluido extracelular e outra através de alterações bioelétricas de células especializadas. A primeira resulta da atividade de células endócrinas, enquanto a segunda, de células nervosas e, a princípio, representam mecanismos de sinalização independentes. Todavia, achados clínicos do final do século XIX e início de XX já sugeriam alguma relação entre o sistema nervoso e o sistema endócrino, como por exemplo, o relato de Erdheim em 1904 sobre um paciente com obesidade e desenvolvimento sexual inadequado, o qual possuía um tumor deformando o diencéfalo (*apud* Moreira e col., 2005). Adicionalmente dados experimentais do início do século XX demonstraram que esta distrofia adiposo-genital podia ser induzida através de lesões na base do encéfalo, sem afetar a hipófise (Aschner B. 1912 *apud* Moreira e col., 2005), sugerindo que, de alguma forma, o sistema nervoso central fosse importante para o funcionamento adequado do sistema endócrino.

Graças aos trabalhos pioneiros de Santiago Ramón y Cajal, no final do século XIX, descrevendo o trato hipotálamo-neuro-hipofisário e de Bernardo Houssay, na década de 30, descrevendo a circulação porta-hipofisária, o conceito da interação neuroendócrina, o controle da atividade hipofisária e, conseqüentemente, do sistema endócrino, por neurônios hipotalâmicos, evoluiu. Diversos trabalhos, principalmente na segunda metade do século passado, caracterizaram moléculas hipotalâmicas e

hipofisárias, assim como o efeito destas sobre os diversos tecidos endócrinos (ver Tepperman J., 1977a e Moreira e col., 2005).

Evidências da influência hipofisária sobre a atividade da glândula tireóide, fundamental para o processo de metamorfose em anfíbios, existem desde o início do século XX, quando se observou que girinos hipofisectomizados não sofriam metamorfose. Por outro lado, o tratamento destes com extratos de hipófise bovina induzia a metamorfose (ver Tepperman J. 1977b). Todavia, foi Eduard Uhlenhuth (1927) o primeiro a demonstrar que a hipófise anterior secreta uma substância capaz de estimular a glândula tireóide, a tireotrofina (TSH). Em 1966, Pastan e colaboradores evidenciaram que o TSH exerce seus efeitos através de sua interação com receptores presentes nas membranas plasmáticas das células tireoideanas.

1.1 Controle neuroendócrino da atividade da tireóide

Atualmente sabemos que o TSH é uma glicoproteína composta por duas sub-unidades codificadas por genes distintos, sendo a sub-unidade beta específica para o TSH. Sintetizado por células basófilas da adenohipófise, os tireotrofos, o TSH é o principal fator estimulador da atividade da glândula tireóide, sendo fundamental para o seu adequado desenvolvimento e funcionamento. Seu receptor está acoplado à proteína Gs e, portanto, sua ativação resulta em aumento na concentração citoplasmática de AMPc (Parmentier e col., 1989; Szkudlinski e col., 2002). Adicionalmente, pelo menos em humanos, o TSH também é capaz de estimular a síntese de trifosfato de inositol (Van Sande e col., 2006). Como consequência da ativação do receptor do TSH ocorre estimulação da síntese de diversas proteínas, como a tireoglobulina, o transportador de Na^+/I^- e a peroxidase tireoideana (TPO), entre

outras, promovendo desta forma, um aumento na síntese dos hormônios tireoideanos (ver Szkudlinski e col., 2002 e Yen P.M. 2001).

Desde a metade do século passado sabe-se que a secreção de TSH e, conseqüentemente, a atividade tireoideana são reguladas tanto por fatores centrais, como por periféricos (Greer MA, 1951; Greer & Erwin, 1956; Yamada T., 1959; Yamada & Greer, 1959; Campbell e col., 1960; D'Angelo & Snyder, 1963; Matsuda e col., 1963; Bowers e col., 1967). A regulação central ocorre principalmente por neurônios hipotalâmicos, os quais secretam um peptídeo, o hormônio liberador de tireorofina (TRH), que estimula a secreção de TSH pelos tireotrofos (Schreiber e col., 1961; 1962; 1963; Bowers e col., 1965; Schally e col., 1966a; 1966b; Redding & Schally, 1967). Por outro lado, os hormônios tireoideanos, através de retroalimentação negativa, inibem a síntese e a secreção tanto de TSH hipofisário, como de TRH hipotalâmico (Martin e col., 1970; Chin e col., 1985; Shupnik e col., 1985; Shupnik & Ridgway, 1985; Dyess e col., 1988; Taylor e col., 1990). Embora neurônios TRHérgicos sejam encontrados em diversas áreas do sistema nervoso central, os principais reguladores da secreção de TSH apresentam seus corpos celulares localizados nos núcleos paraventriculares do hipotálamo (PVN), particularmente, os neurônios parvocelulares da região medial destes núcleos (Aizawa & Greer, 1981; Lechan & Jackson, 1982; Dyess e col., 1988). Dyess e colaboradores (1988) demonstraram que o hipotireoidismo induz um incremento na marcação para o RNAm do proTRH, assim como para o próprio proTRH em neurônios parvocelulares da região medial do PVN, sendo este efeito revertido pela administração local de triiodotironina (T3). Reforçando estes dados, Koibuchi e colaboradores (1991) demonstraram que a tireoidectomia promove um aumento na expressão de Fos, um indicador de atividade neuronal, em neurônios parvocelulares do PVN medial marcados para TRH. Ainda, mostraram haver uma alta correlação entre o

número de neurônios positivos para Fos e a concentração plasmática de TSH. Dados mais recentes sugerem que o receptor para hormônios tireoideanos (TR) mais envolvido neste fenômeno de retroalimentação negativa seja do subtipo TR- β_2 , apesar da importante participação do subtipo TR- α na regulação da expressão do gene do TSH β (Abel e col., 1999; 2001; 2003).

Analisando estudos funcionais observamos que, embora ocorra retroalimentação negativa dos hormônios tireoideanos sobre a secreção de TSH diretamente na hipófise, a integridade dos neurônios TRHérgicos do PVN é fundamental para a adequada secreção de TSH. A lesão do PVN além de promover redução acentuada na concentração plasmática de TSH, compromete o seu incremento secundário à tireoidectomia e ao hipotireoidismo farmacológico (Martin e col., 1970; Taylor e col., 1990), sugerindo que o TRH seja fundamental para a adequada secreção hipofisária de TSH. Além disso, o TRH também apresenta importante papel na determinação da atividade biológica do TSH. Nikrodhanond e colaboradores (2006) demonstraram que a concentração plasmática de TSH de camundongos depletados do gene do proTRH apresenta-se ligeiramente elevada. Todavia, a concentração plasmática de T4 encontra-se reduzida nesses animais devido à redução na bioatividade do TSH. Ainda nesse trabalho, foi demonstrado que a concentração plasmática de TSH de camundongos depletados dos genes do TRH e do TR- β é muito inferior à dos depletados somente do TR- β (TR β KO), sugerindo que o incremento na concentração plasmática de TSH nos animais TR β KO resulte, principalmente, da elevada síntese e secreção de TRH.

Conhecemos dois tipos de receptores para o TRH, denominados TRH-R1 e TRH-R2, estando o TRH-R1 presente em humanos, ratos e camundongos e o TRH-R2 somente em ratos e camundongos (ver Sun e col., 2003). O TRH-R1 é encontrado na

adenohipófise e no hipotálamo, dentre outras regiões (Zabavnic e col., 1993 *apud* Zeng e col., 2007), e sua ausência os animais apresentam reduzida concentração plasmática de T4 e alterações comportamentais (Zeng e col., 2007). Já os animais depletados do gene do TRH-R2 não apresentam alteração no eixo HHT (Sun e col., 2009). Assim sendo, o receptor TRH-R1 parece ser o mediador dos efeitos neuroendócrinos do TRH. As ações do TRH sobre os tireotrofos dependem, pelo menos em parte, da ativação de proteína Gq, com conseqüente incremento na concentração citoplasmática do íon cálcio e ativação de proteína cinase C (Carr e col., 1991 *apud* Nunes MT, 2005).

Portanto, sob determinado ponto de vista, os neurônios TRHérgicos do PVN que se projetam à eminência média poderiam ser interpretados como um ponto inicial na regulação da atividade tireoideana, como um centro primordial de regulação da síntese e secreção de TSH. Todavia, se considerarmos o processamento central de informações viscero-sensoriais, esses neurônios podem ser interpretados como uma via final comum, para a qual confluem diversas eferências resultantes de estímulos provenientes tanto do meio externo, como do meio interno (Krulich e col., 1977; Szabo & Frohman, 1977; Ishikawa e col., 1984; Toni e col., 1990; Zoeller e col., 1990; Joseph-Bravo e col., 1998; Kalsbeek e col., 2000; Mihály e col., 2001; Everson & Nowak, 2002; Fekete e col., 2002b; Wittmann e col., 2002; Hollenberg A.N., 2008).

Outros importantes mecanismos capazes de influenciar a concentração de TRH na circulação porta-hipofisária relacionam-se à atividade de duas enzimas expressas pelos tanicitos: a desidase 2 (D2) e a piroglutamil peptidase II (PPII) (Fig.01). Como os neurônios TRHérgicos hipofisiotrópicos não expressam a D2 (Tu e col., 1997), os tanicitos representam a principal fonte de T3 para estes, sendo portanto fundamentais para o fenômeno de retroalimentação negativa. Assim sendo, alterações na atividade

desta enzima são capazes de modular a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HPT), como no caso de processos infecciosos, quando ocorre incremento na atividade de D2 hipotalâmica e supressão do eixo HPT (ver Fekete e col., 2007). Já a PPII é uma enzima capaz de degradar o TRH, encontrada próxima a sinapses e localizada na membrana plasmática, com seu sítio ativo voltado para a face extracelular (ver Joseph-Bravo e col. e 1998; Vella & Hollenberg, 2009). Sánchez e colaboradores (2009) demonstraram que esta enzima é expressa por tanicitos, sendo tanto a expressão, como a atividade, estimuladas pelo T4. Adicionalmente, esses autores demonstraram que a administração sistêmica de um inibidor da atividade da PPII não altera a concentração plasmática de TSH em condições basais. Por outro lado, esse mesmo procedimento promoveu incremento na concentração de TSH de animais expostos ao frio (Sánchez e col., 2009). Dessa forma, é provável que a expressão ou atividade da PPII sofra regulação em condições específicas, modificando a atividade do eixo HPT.

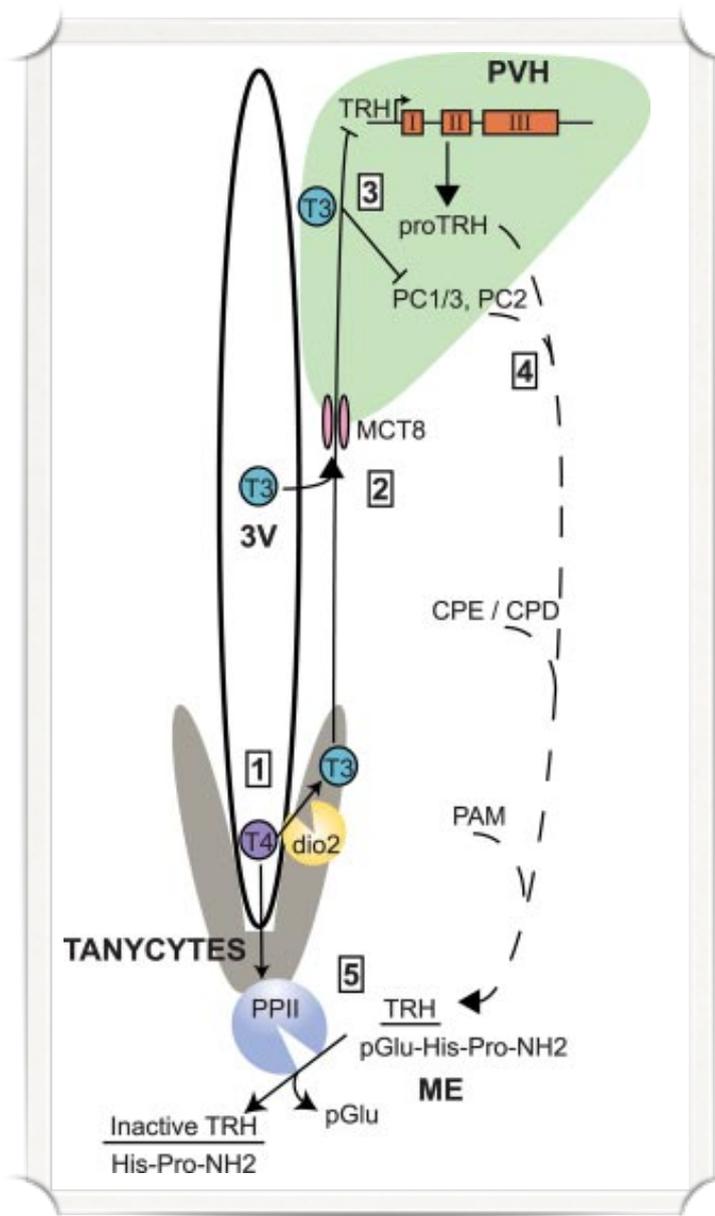


Figura 1: Representação esquemática do papel dos tanicitos no controle da síntese e degradação do TRH (Publicada por Vella & Hollenberg, 2009). 1: captação de T4 circulante pelos tanicitos e sua conversão a T3 por ação da D2 (dio2); 2: entrada de T3 nos neurônios TRHérgicos através do transportador MCT8; 3: efeito supressor do T3 sobre a síntese de TRH e das prohormônios convertases (PC1/3 e PC2); 4: processamento do proTRH ao longo do axônio, por diversas peptidases; 5: liberação do TRH na eminência média e sua degradação pela piroglutamil peptidase (PPII).

1.2 Regulação da expressão do TRH

Conforme discutido acima, o TRH apresenta um papel fundamental no controle da atividade tireoideana e, conseqüentemente, da concentração plasmática dos hormônios tireoideanos. Por outro lado, estes hormônios são capazes de regular, *in vivo*, a transcrição do gene do TRH especificamente no PVN (Sugrue e col., 2010). Todavia, pouco sabe-se sobre os mecanismos envolvidos no controle da expressão deste gene.

O TRH é um tripeptídeo produzido a partir da clivagem do proTRH, por ação das enzimas prohormônio convertase (PC1 e PC2), carboxipeptidase E e PAM (*peptidylglycine α -amidating monooxygenase*) (Schaner e col., 1997; Nillni E.A., 2010) que, por sua vez, tem a expressão inibida pela ação dos hormônios tireoideanos (Perello e col., 2006). Seu gene apresenta 3 exons, sendo a seqüência codificadora localizada no segundo (Lee e col., 1988), e seu promotor possui um sítio capaz de interagir tanto com homodímeros, como com heterodímeros de receptores de hormônios tireoideanos (Hollenberg e col., 1995). Em experimentos *in vitro*, o TR β 2 não ligado ao T3 é capaz de ativar o gene do TRH, sendo esse dado compatível com seu efeito *in vivo* (Langlois e col., 1997). Embora ainda não se tenha demonstrado essa interação *in vivo*, recentemente Sugrue e colaboradores (2010) demonstraram que os hormônios tireoideanos são capazes de suprimir a transcrição do gene do proTRH especificamente no PVN.

Os receptores de hormônios tireoideanos (TR) são receptores nucleares com sítios de interação com o DNA e com o T3, dentre outros. Embora haja TR em virtualmente todos os tecidos, a distribuição do TR β 2 na fase adulta é restrita à adenohipófise, ao ouvido interno, à retina e algumas áreas do hipotálamo, apresentando um papel fundamental no controle da expressão do TRH no PVN e,

consequentemente, na regulação da atividade tireoideana (Abel e col., 1999; 2001). Esses receptores podem se ligar aos elementos responsivos nas regiões promotoras de genes alvos na forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros e, mesmo na ausência do ligante (T3), são capazes de modular a transcrição gênica. Diversos estudos *in vitro* demonstraram que os TRs não ligados ao T3 podem reprimir a expressão basal de genes regulados positivamente pelo T3. Esses efeitos devem-se, pelo menos em parte, à interação do TR com o correpressor de receptores nucleares (NCoR) e o mediador silenciador de receptores retinóides e de HT (SMRT) (ver Yen P.M., 2001). Recentemente, Astapova e colaboradores (2008) demonstraram a relevância da interação entre TR e NCoR no controle de diversos genes hepáticos. Neste trabalho, foi desenvolvido um camundongo que expressa especificamente no fígado um NCoR mutante, incapaz de interagir com os TRs. Como resultado, observou-se aumento na expressão de genes regulados positivamente pelos hormônios tireoideanos (HT), sendo esse efeito marcante mesmo após a indução do hipotireoidismo nestes animais. Portanto, esse trabalho demonstrou *in vivo* que o efeito supressor dos TRs independente de ligante depende de sua interação com o NCoR, reforçando a relevância deste correpressor na modulação dos efeitos de receptores nucleares.

Por outro lado, pouco se sabe sobre o controle da expressão de genes regulados negativamente pelos HT, como o TRH. Tagami e colaboradores (1997) demonstraram *in vitro* (em ensaios de transfecção) que, na presença de TR β e NCoR, os promotores dos genes TRH, TSH β e TSH α são extremamente ativados, sendo esse efeito revertido pela adição de T3. Ainda, ao substituir o TR β normal por um mutante incapaz de interagir com o NCoR, essa estimulação não ocorre. Portanto, eles propuseram que a interação TR-NCoR exercesse efeito ativador sobre genes regulados negativamente e que, a adição de T3 dissociasse essa interação, resultando em supressão da expressão

gênica. Assim sendo, dependendo do promotor alvo, é possível que o NCoR atue junto aos TRs como um coativador. Já foram caracterizados diversos elementos responsivos aos hormônios tireoideanos tanto em promotores de genes regulados positivamente, como negativamente pelos HT e, em ambos casos, a ligação do TR ao DNA é fundamental para que ocorra a regulação (Shibusawa e col., 2003).

Além dos hormônios tireoideanos, diversos neurotransmissores são capazes de modular a expressão do TRH, notoriamente aqueles sintetizados em neurônios do núcleo arqueado (ARC). Este núcleo é um importante centro integrador da homeostase energética, participando tanto do controle da ingestão alimentar, como da regulação do eixo HHT (ver Lechan & Fekete 2006 e Hollenberg AN, 2008). Deste núcleo partem diversas eferências ao PVN, sendo a principal origem de neurônios produtores de neuropeptídeo Y (NPY) que realizam sinapse com neurônios TRHérgico do núcleo paraventricular (Toni e col., 1990; Légrádi & Lechan, 1998). Ainda, neurônios do ARC produtores de melanocortina (α MSH), via ativação de receptores melanocortinérgicos MC4), também são capazes de influenciar os neurônios TRHérgicos do PVN, tanto diretamente, como indiretamente através do núcleo dorsomedial do hipotálamo (Singru e col., 2005; Lechan & Fekete, 2006a). Outro neurotransmissor sintetizado no ARC e encontrado em terminais sinápticos em contato com neurônios TRHérgicos é o peptídeo relacionado ao agouti (AgRP), um antagonista endógeno de receptores melanocortinérgicos MC4 (Légrádi & Lechan. 1999). Portanto, esses 3 neurotransmissores são os principais moduladores do eixo HHT, provenientes do núcleo arqueado. Enquanto a administração de NPY e AgRP inibe, a α MSH estimula a expressão de TRH no PVN (Kim e col., 2000; Fekete e col., 2001; Fekete e col., 2002c; Lechan & Fekete 2006). A α MSH ativa receptores acoplados à proteína Gs, já o NPY pode interagir com receptores acoplados à proteína Gi (Herzog e col., 1992 *apud*

Sarkar & Lechan, 2003). Portanto, modulam de forma oposta a síntese de AMPc. Dessa forma, a sinalização do α MSH resulta ativação de proteína quinase A (PKA), enquanto o NPY inibe esta ativação. Como consequência da ativação da PKA, ocorre aumento na fosforilação da proteína ligadora ao elemento responsivo ao AMPc (CREB) (Sarkar & Lechan, 2003), que pode interagir com o elemento responsivo ao AMPc (CRE), presente no promotor do gene do TRH, induzindo sua transcrição (Harris e col., 2001).

Neurônios produtores de α MSH também sintetizam outro neurotransmissor, o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) (Elias e col., 1998), capaz de estimular a expressão de pré-proTRH no PVN de ratos em jejum (Fekete e col., 2000b). Esse neurotransmissor é amplamente encontrado em terminais pré-sinápticos no PVN, além de ser co-expresso com o pré-proTRH (Broberg, C., 1999; Fekete e col., 2000b). Além disso, projeções caudais ao PVN também utilizam o CART como neurotransmissor, como por exemplo neurônios catecolaminérgicos das áreas C1-3, responsáveis por cerca de 50% da inervação (contendo CART) dos neurônios TRHérgicos hipofisiotrópicos do PVN (Fekete e col., 2004b; Wittmann e col., 2004). Portanto, como é proposto um papel estimulatório para esses neurônios catecolaminérgicos durante a exposição ao frio, é possível que o CART também contribua para a ativação do eixo HHT nesta condição (ver Nillni, E.A., 2010).

Um importante modulador humoral da atividade desses neurônios do ARC é a leptina, um hormônio sintetizado principalmente no tecido adiposo, capaz de inibir neurônios que expressam NPY, estimular aqueles produtores de α MSH e, também, de influenciar a atividade do eixo HHT (ver Hollenberg AN, 2008). Adicionalmente, o receptor para leptina ObR-b é encontrado no PVN e, em culturas primárias de neurônios hipotalâmicos, ocorre secreção de TRH em resposta à leptina (Elmqvist e col., 1998; Nillni e col., 2000). Ainda, a leptina aumenta a atividade da luciferase em

células transfectadas com o promotor do TRH e o ObR-b (Nillni e col., 2000). De fato, há um elemento responsivo à STAT-3 no promotor do TRH (Harris e col., 2001). Ainda, *in vivo*, a administração de leptina estimula a expressão do RNAm do supressor da sinalização de citocinas (SOCS-3; um marcador da ação direta da leptina) em neurônios do PVN que expressam o TRH (Harris e col., 2001). Reforçando esses dados, Huo e colaboradores (2004) demonstraram que a administração sistêmica de leptina induz rápida (<45 minutos) fosforilação da STAT-3, uma proteína da cascata de sinalização da leptina, em cerca de 40% dos neurônios TRHérgicos do PVN, sendo este efeito específico, já que este efeito não foi verificado em neurônios TRHérgicos localizados em outros núcleos hipotalâmicos. Portanto, a leptina é capaz de estimular a expressão do TRH tanto diretamente no PVN, como indiretamente através de seus efeitos no núcleo arqueado. Todavia, evidências sugerem a existência de duas subpopulações de neurônios TRHérgicos no PVN, sendo uma sensível às ações diretas, e outra às indiretas (Fig.02). Perello e colaboradores (2006) avaliaram a fosforilação de STAT-3 (ação direta) e da CREB (ação indireta) após administração intracerebroventricular de leptina. Seus resultados mostram que a leptina induz a fosforilação da STAT-3 em cerca de 28% e 37% dos neurônios TRHérgicos do PVN medial e posterior, respectivamente, e somente em 4% dos neurônios TRHérgicos do PVN anterior. Por outro lado, a fosforilação de CREB ocorreu, respectivamente, em 92%, 66% e 18% dos neurônios TRHérgicos do PVN anterior, medial e posterior, principalmente em neurônios periventriculares. Ainda, a leptina estimulou a síntese de TRH no PVN (todo o núcleo) e a utilização de um antagonista de receptores melanocortinérgicos reduziu, parcialmente, esse efeito. (Perello e col., 2006). Assim sendo, considerando a localização dos neurônios afetados (ver Lechan & Fekete,

2006b), os efeitos indiretos da leptina parecem ter maior relevância para sua ação sobre o eixo HHT.

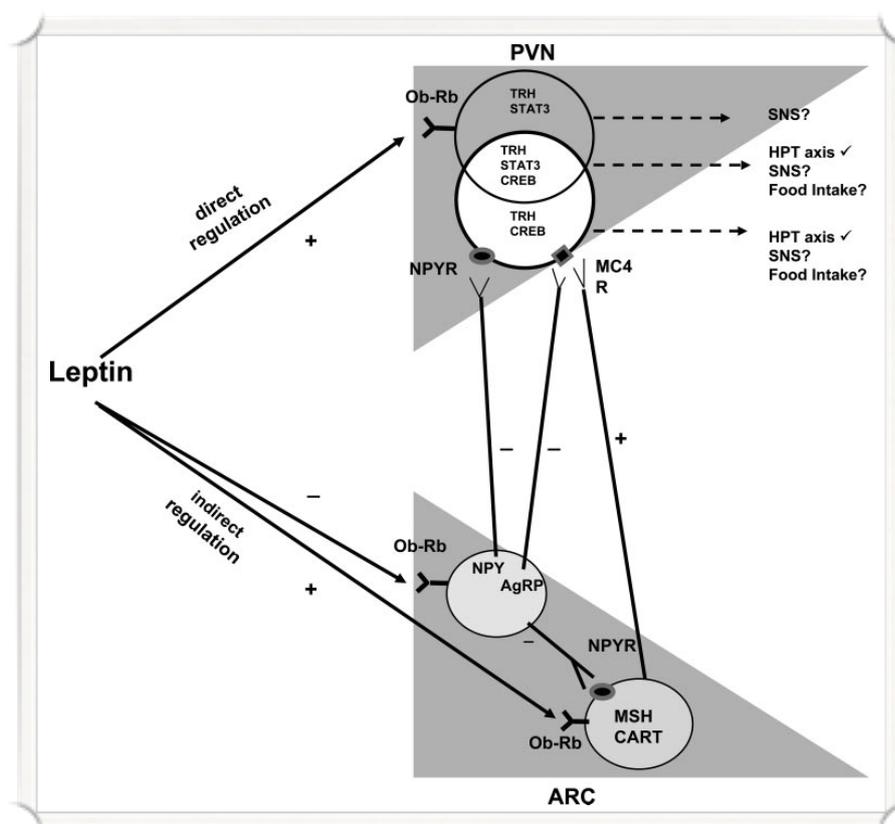


Figura 2: Esquema proposto, representativo das vias direta e indiretas através das quais a leptina pode modular a expressão do TRH e destacando as subpopulações de neurônios TRHérgicos do PVN, assim como os possíveis envolvimentos funcionais: controle do sistema nervoso simpático (SNS), eixo HHT ou ingestão alimentar (Publicada por Perello e col., 2006).

1.3 Disponibilidade de energia, atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) e o envolvimento de receptores Y

Sabemos, há várias décadas, que a restrição alimentar promove decréscimo na concentração plasmática de hormônios tireoideanos (Grossie & Turner, 1962 *apud* Connors e col., 1985; Croxson e col., 1977), pelo menos em parte, devido à redução na secreção de T4 (Kinlaw e col., 1985; Yen e col., 1994). Durante o jejum, o metabolismo intratireoideano sofre modificações e o percentual de iodo organificado como mono e diiodotirosina (MIT e DIT) aumenta, simultaneamente à redução como T4 e T3 (Harris e col., 1978). Após 72 horas de jejum em ratos, a atividade da tireoperoxidase encontra-se reduzida, sendo este fenômeno revertido pela administração diária de TSH (Moura e col., 1987). De forma semelhante, a atividade da 5' desidase tireoideana também sofre redução com o jejum prolongado (48 e 72h) e a administração de TSH restabelece esta atividade (Wu S.Y., 1990). Embora esses autores também tenham demonstrado redução na atividade de D1 hepática, Yen e colaboradores (1994) demonstraram que o percentual de conversão periférica de T4 a T3 aumenta mais de 80% após 4 dias de jejum. Portanto, a interpretação desses dados não é simples, sendo provável que a conversão periférica de T4 a T3 aumente durante o jejum em algum tecido e diminua em outros.

Connors e colaboradores (1985) mostraram que o conteúdo de TSH em hipófises de ratos em jejum (6 dias) é menor e demonstraram não haver alteração no volume de distribuição ou na depuração plasmática do TSH durante o jejum. A concentração plasmática de TSH também sofre redução durante o jejum, o que sugeriria a hipoatividade hipofisária, mas a resposta secretora de TSH à administração de TRH continua adequada (Campbell e col., 1977; Harris e col., 1978), indicando que a redução na atividade hipofisária deva ser secundária à reduzida secreção de TRH.

Reforçando esta hipótese, ocorre decréscimo na concentração plasmática de TRH (Mori e col., 1988), na concentração de TRH na circulação porta-hipofisária e na expressão de pré-proTRH no PVN durante a privação alimentar (Blake e col., 1991). Ainda, a restrição alimentar aumenta os sítios disponíveis para ligação do TRH em tireotrofos. Já, o conteúdo nuclear de T₃ (em extrato de hipófise) sofre redução proporcional à restrição alimentar (Rodriguez e col., 1991). Portanto, embora possa haver diferenças nos mecanismos de supressão da secreção de TSH entre o jejum e a restrição alimentar, esses dados não apoiam a hipótese desta supressão ocorrer pela ação repressora do T₃ em tireotrofos. Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade de sua ação sobre a síntese de TRH, já que ocorre incremento na atividade da desidase do tipo 2 no hipotálamo mediobasal de ratos em jejum (Diano e col., 1998). Todavia, essa hipótese é pouco provável, visto que os animais depletados do gene do TR β ₂, quando em jejum, apresentam redução da expressão de TRH no PVN proporcional aos controles e intensa redução na concentração plasmática de T₄ (Abel e col., 2001).

Apesar dos mecanismos centrais envolvidos na redução da atividade de neurônios TRHérgicos do PVN no jejum ainda não estarem elucidados, sabe-se que a administração de leptina restabelece a expressão de pré-proTRH no PVN e a concentração plasmática de T₃ e T₄ (Légrádi e col., 1997), o que não ocorre com a administração de insulina ou glicose (Fekete e col., 2006). Seoane e colaboradores (2000) demonstraram que a concentração plasmática de leptina encontra-se reduzida no jejum, assim como a concentração de TSH e a amplitude de seus pulsos de secreção. Nesse mesmo trabalho, foi evidenciado que a administração intracerebroventricular de leptina estimula a secreção de TSH nos animais em jejum, embora não restabeleça seu padrão pulsátil de secreção. Esse efeito da leptina sobre a secreção de TSH também ocorre após sua administração sistêmica em ratos

alimentados (Ortiga-Carvalho e col., 2002). Entretanto, a incubação de adenohipófises com leptina resulta em supressão dose-dependente da secreção de TSH, o que, provavelmente, representa um papel fisiológico da leptina produzida localmente (adenohipófise) e atuando de forma parácrina (Ortiga-Carvalho e col., 2002).

Conforme discutido anteriormente, esse efeito estimulante da leptina sobre o eixo HHT pode envolver tanto sua ação direta sobre os neurônios TRHérgicos do PVN, como sua ação indireta, através de seus efeitos no núcleo arqueado. De fato, a lesão deste núcleo (através da administração neonatal de glutamato monossódico) impede a queda na expressão do pré-proTRH no PVN e nas concentrações séricas de TSH e T4 decorrentes do jejum (Légrádi e col., 1998). Por outro lado, as concentrações de TSH e T4 dos animais lesionados, mas com livre acesso à ração, já era inferior aos controles intactos, o que não ocorreu com expressão do pré-proTRH. Portanto, aparentemente, essa supressão observada nos animais alimentados não estaria relacionada ao comprometimento da expressão do proTRH. Embora esses dados reforcem a importância do núcleo arqueado como mediador da supressão do eixo HHT durante o jejum, devido ao protocolo utilizado, não devemos excluir o possível comprometimento de outras estruturas encefálicas (Lemkey-Johnston & Reynolds, 1974).

Tanto em humanos, como em roedores, existem terminais sinápticos contendo NPY, AgRP e α MSH, em contato com neurônios TRHérgicos do PVN (Toni e col., 1990; Légrádi e col., 1999; Fekete e col., 2000a; Mihály e col., 2000). Portanto, através de suas ações sobre os neurônios do núcleo arqueado que sintetizam esses neurotransmissores, a leptina é capaz de influenciar a atividade dos neurônios TRHérgicos do PVN. Afinal, esses 3 neurotransmissores são capazes de influenciar o eixo HHT.

O AgRP é um antagonista endógeno de receptores MC3-R e MC4-R que, por sua vez, são ativados pelo α MSH. Todavia, os efeitos do AgRP sobre o eixo HHT são abolidos pela depleção do MC4-R (Fekete e col., 2004a), sugerindo que este seja o principal receptor de melanocortina envolvido na regulação do eixo HHT. A administração intracerebroventricular de AgRP promove redução na expressão do pré-proTRH (Fekete e col., 2002c), na concentração plasmática de TSH em ratos alimentados, mas não modifica a de ratos em jejum (Kim e col., 2000). Por outro lado, a administração de α MSH não altera a concentração plasmática de TSH em animais alimentados, mas promove incremento deste parâmetro quando os animais estão em jejum (Kim e col., 2000), assim como aumento na expressão do pré-proTRH (Fekete e col., 2000a). Nesse mesmo trabalho demonstrou-se que a administração de AgRP diretamente no PVN também promove redução na concentração plasmática de TSH e T4, sendo este efeito independente do efeito do AgRP sobre o consumo alimentar. Assim sendo, esses dados sugerem que, em animais alimentados, ocorra ativação de receptores MC4 em neurônios TRHérgicos hipofisiotrópicos do PVN, contribuindo para a manutenção da atividade do eixo HHT. Já durante o jejum, como o AgRP não modificou a secreção de TSH, é provável que haja liberação endógena deste peptídeo suficiente para bloquear os receptores MC4. De fato, durante as primeiras horas de jejum ocorre um intenso incremento na expressão hipotalâmica de AgRP (Mizuno & Mobbs, 1999; Palou e col., 2009). Kim e colaboradores (2000) também demonstraram que a incubação de explantes de hipotálamo de ratos em jejum com leptina promove aumento na secreção de α MSH e de TRH, sendo este efeito sobre a secreção de TRH bloqueado pela incubação com AgRP. Portanto, o efeito estimulante da leptina sobre a atividade do eixo HHT durante o jejum deve envolver a liberação de α MSH no PVN e,

consequentemente, ativação de receptores MC4-R em neurônios TRHérgico, resultando em liberação de TRH na eminência média.

A principal origem de neurônios NPYérgicos que realizam sinapse com TRHérgicos do PVN é o núcleo arqueado (Légrádi & Lechan, 1998) e, assim como o AgRP, a expressão hipotalâmica do NPY sofre incremento durante o jejum (Beck e col., 1990; Palou e col., 2009). A administração central de NPY também reduz a expressão de pré-proTRH no PVN, as concentrações plasmáticas de TSH, T4 e T3, sendo esses efeitos independentes da alteração na ingestão de alimento (Fekete e col., 2001). A NPY apresenta afinidade pelos receptores Y1, Y2 e Y5, todos ele acoplados à proteína Gi. Entretanto, em neurônios TRHérgicos do PVN, só foi demonstrada a presença do receptor Y1 (Broberger e col., 1999), embora o Y5 também seja expresso no hipotálamo (Campbell e col., 2001; Wolak e col., 2003). Por outro lado, estudos funcionais, sugerem que tanto o receptor Y1, como o Y5 seja mediador dos efeitos do NPY . A administração central de agonistas específicos para os receptores Y1 ou Y5, em animais alimentados, reproduz os efeitos do NPY, ou seja, redução na expressão do pré-proTRH e na concentração plasmática dos hormônios tireoideanos (Fekete e col., 2002a). Assim sendo, é possível que a redução na concentração plasmática de leptina durante o jejum contribua para o incremento na neurotransmissão NPYérgica no PVN, levando à inibição da expressão do proTRH e supressão do eixo HHT. Portanto, considerando essa hipótese, a redução na secreção de TSH durante o jejum seria, em grande parte, resultante do aumento na neurotransmissão NPYérgica no PVN e ativação de receptores Y1 e Y5. Todavia, isso ainda não foi demonstrado.

Além da leptina, outro hormônio relacionado ao estado metabólico e capaz de influenciar neurônios do núcleo arqueado é o PYY₃₋₃₆. Produzido principalmente pelas células L do íleo distal e do cólon, esse hormônio é secretado com a chegada de

alimento no intestino delgado e esse mecanismo de secreção envolve reflexos neurais (Fu-Cheng e co., 1997). Através de sua interação com receptores Y2, o PYY₃₋₃₆ é capaz de inibir o consumo alimentar, pelo menos em parte, através de seu efeito inibitório sobre neurônios do arqueado que sintetizam NPY (Batterham e col., 2002; Acuna-Goycolea & van den Pol, 2005). Assim como a leptina, esse hormônio também é capaz de estimular a secreção de TSH em ratos em jejum, mas apresenta efeito inibitório sobre a secreção de TSH por adenohipófises isoladas de ratos alimentados (Oliveira e col., 2006). Portanto, é possível que a redução na sua concentração plasmática durante jejum também contribua para a supressão da atividade do eixo HHT. Entretanto, os mecanismos envolvidos em seu efeito sobre a secreção de TSH ainda não foram elucidados.

Embora haja estudos investigando os mecanismos através dos quais ocorre a redução na atividade tireoideana durante o jejum, faltam investigações sobre os mecanismos envolvidos no restabelecimento da atividade desta glândula durante a “realimentação”. É possível que dependa da recuperação das reservas energéticas e da concentração plasmática de leptina, mas não podemos descartar a possibilidade da participação de hormônios do trato gastrointestinal, como o PYY₃₋₃₆.

Rothwell e colaboradores (1982) demonstraram que, após 72h de jejum, a realimentação com uma dieta rica em carboidratos promove incremento na concentração sérica de T3 durante as primeiras 3 horas de realimentação. Na mesma época, Hugues e colaboradores (1983) demonstraram um rápido incremento na concentração sérica de TSH, já na primeira hora de realimentação, sendo este bloqueado pela administração sistêmica de anticorpos contra o TRH. Todavia, recentemente, Sánchez e colaboradores (2008) propuseram que a atividade do eixo HHT só seria restabelecida após 24 horas de realimentação. Neste trabalho, o primeiro

tempo de realimentação estudado foi 4 horas, mas eles só evidenciaram incremento na expressão de pré-proTRH e de TSH plasmático após 24 horas. Portanto, a literatura ainda é controversa sobre o controle do eixo HHT durante a realimentação e carece de informações sobre os mecanismos envolvidos neste fenômeno.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal investigar o papel de receptores Y1 e Y5 centrais na supressão da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) durante o jejum, assim como mecanismos envolvidos na ativação deste eixo durante a realimentação.

Para tanto, através da utilização de antagonistas de receptores Y1 ou Y5, visamos estudar o efeito do bloqueio, no sistema nervoso central, destes receptores sobre as concentrações séricas de tireotrofina, tiroxina e triiodotironina, no jejum. Também objetivamos verificar o efeitos destes bloqueios sobre o comportamento alimentar e concentrações dos mesmo hormônios em animais com livre acesso a ração.

Visamos realizar uma análise temporal da ativação do eixo HHT durante a realimentação, através da investigação de alguns parâmetros da atividade tireoideana (captação de iodeto e atividade da 5' desiodase) e da quantificação das concentrações séricas de tireotrofina e hormônios tireoideanos em diferentes tempos de realimentação. Adicionalmente, investigamos o possível envolvimento de mediadores capazes de influenciar o eixo HHT - como leptina, PYY₃₋₃₆ e glicocorticóides - neste fenômeno.

Por fim, investigamos o efeito do PYY₃₋₃₆ sobre a secreção de TSH por adenohipófises isoladas de ratos em jejum ou após sua administração central.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Protocolos experimentais

Em todos os protocolos experimentais foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando cerca de 320g em média e mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, com luzes acesas as 7:00 horas. No período anterior ao início dos protocolos, o acesso à ração e água era livre e eram agrupados 4 ou 5 animais por gaiola. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA/CCS/UFRJ (Comissão de ética para utilização de animais em experimentação científica do centro de ciências da saúde) e estão esquematizados na figura 3.

3.1.1 Administração seriada intracerebroventricular de antagonistas de receptores Y1 e Y5 em ratos com livre acesso à ração, ou em jejum

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica (conforme descrito a seguir) para implantação de uma cânula guia no 3o. ventrículo e, após um período de 7 a 10 dias teve início os experimentos. Nestes, foram testados os efeitos da administração intracerebroventricular (icv) dos antagonistas de receptores Y1 (BIBP3226; Tocris) ou Y5 (CGP71683; Tocris) em ratos com livre acesso à ração, ou em jejum. Portanto, foram formados 4 grupos experimentais (Y1-alimentado, Y1-jejum, Y5-alimentado e Y5-jejum) e seus respectivos grupos controle (veículo) com, pelo menos, 10 animais em cada. Foram realizadas 6 microinjeções de 10 nmoles/rato de BIBP (em 2uL de água), 15 nmoles/rato de CGP (em 2uL de DMSO 30%) ou seus respectivos controles (Fig. 3 A e B). As primeiras, 3^{as} e 5^{as} microinjeções ocorreram 1 hora antes do início do período escuro, enquanto as 2^{as}, 4^{as} e 6^{as} microinjeções foram realizadas 1 hora após o início do período claro e os animais sofreram eutanásia, por decapitação, 1 hora após a

última microinjeção. O sangue foi coletado, centrifugado a 1800 x g por 20 minutos e o soro obtido foi armazenado a -20°C para posterior realização do radioimunoensaio.

Em todos os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas individuais e, quando o acesso à ração era livre, o consumo alimentar era medido na instante anterior à microinjeção. Já para os experimentos em jejum, a ração foi retirada cerca de 10 horas antes da primeira microinjeção.

3.1.2 Efeito agudo da administração intracerebroventricular de antagonista de receptores Y5 em ratos em jejum

Para identificar possível diferença entre o efeito da administração crônica de CGP e seu efeito agudo, dois grupos de ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica e, após uma semana, ficaram em jejum por 72 horas. Ao término desse período foi realizada a administração intracerebroventricular de veículo ou CGP (15 nmoles/rato) e, após uma hora os animais foram eutanasiados por decapitação sendo o sangue coletado e processado conforme descrito anteriormente (Fig.3 C).

3.1.3 Relação entre ingestão alimentar e secreção de TSH após 72 horas de jejum

Com o objetivo de investigar a secreção de TSH durante a realimentação e sua possível relação com a ingestão alimentar, após 72h de jejum os animais foram divididos em 2 grupos, um permanecendo em jejum e o outro sendo realimentado por 6h. No dia anterior à realimentação os animais foram submetidos à cirurgia para implantação de cânula jugular, através da qual foram obtidas as amostras de sangue para quantificar a concentração plasmática de TSH. Essas amostras foram coletadas, em ambos os grupos, em 3 instantes: 72h de jejum (exatamente antes da realimentação), 3 e 6h após o início da realimentação. Os resultados foram expressos como a variação

percentual da concentração de TSH em relação ao seu valor inicial (72h de jejum) (Fig. 3 D). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais após a cirurgia para implantação de cânula jugular e o consumo de alimento durante a realimentação foi medido nos diferentes tempos, antes da coleta de sangue pela cânula jugular.

3.1.4 Realimentação após 72 horas de jejum

Para esta abordagem experimental os animais foram divididos em 5 grupos (jejum ou realimentados por 1h, 2h, 3h ou 6h), cada um contando, pelo menos, 10 animais. Após 72 horas de jejum um grupo sofreu eutanásia, enquanto os demais foram realimentados por 1, 2, 3 ou 6 horas e sofreram eutanásia logo após o término deste período (Fig. 3 E). Os animais foram mortos por decapitação.

O sangue foi coletado e processado conforme descrito anteriormente para posterior realização de radioimunoensaio. Adicionalmente também coletou-se a tireóide (utilizada para quantificar a atividade da desidase do tipo 1) e o hipotálamo mediobasal (no qual se quantificou a expressão de um receptor para leptina, o ObR-b).

3.1.5 Captação de ^{125}I pela tireóide no jejum e na realimentação

Em um novo experimento os animais também foram submetidos às 72 horas de jejum e dois grupos foram formados: um sofreu eutanásia ainda em jejum e o outro foi realimentado por 1 hora. Em ambos os grupos os animais receberam 325000 DPM (i.p.) de ^{125}I 15 minutos antes da eutanásia (Ferreira e col., 2005), que foi realizada por anestesia inalatória profunda e punção cardíaca (Fig. 3 F). Coletou-se o sangue e a tireóide e foram medidas a radiação emitida (CPM) em 1mL de plasma e total da tireóide. Para o cálculo da captação de iodeto foi utilizada a relação: $[(\text{CPM}/\text{mg})_{\text{TIR}} / (\text{CPM}/\text{mL})_{\text{Plasma}}]$.

3.1.6 Administração intracerebroventricular de PYY₃₋₃₆ em ratos em jejum

Entre 7 e 10 dias após a cirurgia estereotáxica para implantação de cânula guia no 3o ventrículo, os animais foram submetidos a 72 horas de jejum e divididos em 3 grupos contendo, pelo menos, 8 animais cada. Os animais receberam 0,1 nmol ou 0,01 de PYY₃₋₃₆ (Tocris) e o grupo controle 2uL de solução salina. A eutanásia ocorreu por decapitação 15 minutos após a administração icv e o sangue foi coletado e processado conforme descrito (Fig.3 G).

3.1.7 Incubação de adenohipófises, isoladas de ratos em jejum, com PYY₃₋₃₆

Após 72 horas de jejum, os ratos foram sacrificados por decapitação e as hipófises retiradas. Estas foram dissecadas, retirando-se a neurohipófise e separando cada hemi-adenohipófise para incubação em meio adequado (Krebs-Ringer bicarbonato, 37°C, 95%O₂ e 5%CO₂) (da Veiga e col., 2008). Após um período de 30 minutos (pré-incubação), o meio foi substituído por meio fresco, contendo ou não PYY₃₋₃₆ em diferentes concentrações (10⁻¹⁰, 10⁻⁸ ou 10⁻⁶ M). Após um período de 2 horas foram coletadas amostras do meio para dosagem de TSH (Fig.3 H).

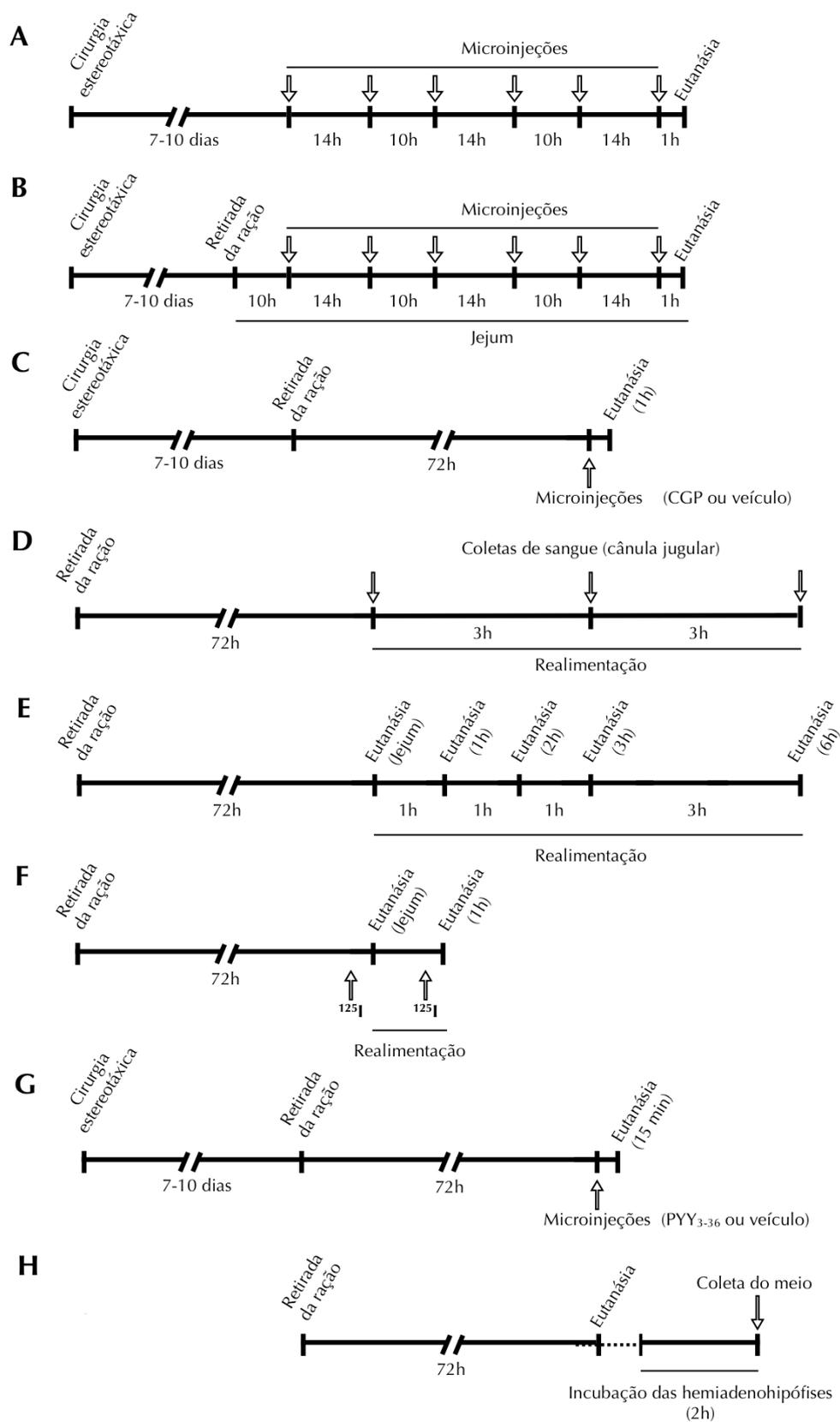


Figura 3: Representação esquemática dos protocolos experimentais

3.2 Estereotaxia

Os ratos foram anestesiados (quetamina 80mg/Kg e xilazina 8mg/Kg, i.p.) e posicionados no aparelho estereotáxico para implantação da cânula guia no 3o. ventrículo. A extremidade inferior desta cânula (16 mm de comprimento e 0,6 mm de diâmetro externo) foi posicionada 0,6 mm posterior ao bregma e 8,0 mm inferior à superfície do crânio (da Veiga e col., 2008). A verificação do posicionamento da cânula foi feita pela observação do deslocamento de uma coluna de líquido conectada a esta, confirmando sua localização no interior do 3o. ventrículo. Após o término da cirurgia, os animais receberam uma dose profilática de antibiótico (Pentabiótico veterinário - Fort Dodge; 1mL/Kg, i.m.).

3.3 Implantação de cânula jugular

Objetivando a coleta de sangue seriada, foi implantada uma cânula de *silastic*, através da veia jugular direita, no átrio direito. Para tanto, os animais foram anestesiados (quetamina 80mg/Kg e xilazina 8mg/Kg, i.p.) e, através de uma incisão na pele, localizou-se a veia jugular. Utilizando uma agulha como guia, a cânula foi introduzida na veia e inserida até o átrio direito. A outra extremidade da cânula foi exteriorizada na região entre as escápulas (da Veiga e col., 2008).

3.4 Radioimunoensaio

As amostras ou os padrões foram incubados durante duas horas com o anticorpo (IgG de coelho) contra TSH (*National Hormone and Peptide Program*; Torrance, CA, USA). Após este período foi adicionado o TSH ligado ao radioisótopo (¹²⁵I) e, passadas 24 horas, os complexos antígenos-anticorpos foram precipitados pela adição de IgG de cabra contra IgG de coelho e 5% de polietilenoglicol, seguida de centrifugação (1800 x

g, 30 minutos). Após desprezar o sobrenadante, a radioatividade foi determinada em um cintilador de fase sólida (Ortiga-Carvalho e col., 1996). Para a mensuração das concentrações séricas de T4, T3, PYY, corticosterona e leptina foram utilizados *kits* comerciais (*MP Biomedicals* para T4 e T3 e *LINCO Research* para os demais).

3.5 Atividade da 5' desiodase tireoideana

A atividade da 5'-desiodases foi verificada através de ensaio *in vitro* quantificando a radioatividade proveniente da liberação de ^{125}I da reação de conversão do rT_3 marcado com ^{125}I na presença do agente redutor *Dithiothreitol* (DTT), conforme descrito em trabalhos anteriores do nosso grupo (Pazos-Moura e cols., 1991; Lisboa e cols., 2003).

As tireóides foram homogeneizadas em tampão tris-HCl pH6,8 (50mM de Tris, 10mM de DTT e 1mM de EDTA). O T_3 reverso marcado com ^{125}I (1,07mCi/g; PerkinElmer Life Sciences – Massachusetts, Estados Unidos) foi utilizado como traçador do ensaio. Este foi purificado imediatamente antes de seu uso nos ensaios por eletroforese em papel (Whatman®, GE Healthcare UK Limited – Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando acetato de amônio a 0,05M como tampão. Sua extração do papel foi realizada por eluição com tampão 1M de KH_2PO_4 e 10mM de EDTA (pH6,9) e solução 0,04N de NaOH com consecutiva lavagem com água destilada.

Os ensaios enzimáticos foram realizados a 37°C na presença de 50µl de ^{125}I rT_3 purificado e em tampão 100mM de KH_2PO_4 contendo 1mM de EDTA (pH6,9) utilizando condições apropriadas para cada enzima.

A atividade da 5' desiodase tireoideana foi avaliada em 50-150 μ g de proteína do homogenato da amostra na presença de 10mM de DTT (Sigma Aldrich – Missouri, Estados Unidos) e 1,5 μ M de rT₃ durante 30 minutos. A reação foi parada com a adição de solução 10mM de PTU contendo albumina de soro bovino (BSA) a 8% (Sigma Aldrich) e solução de ácido tricloroacético (TCA) a 20% gelado (Vetec).

O sobrenadante obtido após centrifugação a 350xg/10min foi aplicado em coluna (Bio rad) com resina de troca catiônica (Dowex 50WX2 -200 – Acros organics – Geel, Bélgica). A coluna foi eluída com solução de ácido acético a 10% (Vetec) e o eluato obtido contendo o ¹²⁵I livre foi quantificado em contador gama. A atividade enzimática foi expressa como massa de rT₃ desiodado por hora por miligrama de proteína.

Os ensaios foram testados quanto à linearidade da reação dentro da faixa protéica utilizada. O percentual de desiodação do tubo branco foi menor que 3%.

3.6 Western blotting

Os hipotálamos foram homogeneizados para extração de proteína total em tampão de lise (pH 7,4) em volume total de 250 μ l contendo: 10 mM de EDTA, 1 mM de MgCl₂, 50 nM de HEPES, TritonX-100 1%. No momento do processamento dos tecidos, foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases na proporção de 2 μ l/1mL de solução. Após homogeneização, o homogenato foi centrifugado a 13000 x g durante 5 minutos e o sobrenadante armazenado a -20° C para posteriores análises. A quantificação de proteína total do homogenato foi feita através do método de Bradford.

Após quantificação, as amostras protéicas foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE). Foi padronizada a utilização de 40 μ g de proteína.

Após separação, as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF, em sistema úmido (Biorad) (300mA durante 2 horas).

A membrana, contendo as amostras protéicas, foi incubada com solução tampão TBS (20 mM Tris, 0,5 NaCl) contendo leite desnatado (Molico) 5%, sob agitação constante por 60 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada *overnight* e sob agitação constante, com anticorpo específico para reconhecimento do receptor de leptina (Ob-R; *Santa Cruz Biotechnology Mouse Monoclonal Ig-G*). Utilizamos a técnica de coloração da membrana com Vermelho de Ponceau como controle interno. O anticorpo para ObR foi diluído em tampão TBS-BSA 2% na diluição de 1:500. Após o período de incubação foram realizadas 4 lavagens sucessivas de 5 minutos com TBS-T 0,05%, e a membrana foi então incubada sob agitação constante durante 3 horas com o segundo anticorpo anti-mouse biotilado (*Santa Cruz Biotechnology Anti-mouse Ig-G*) diluído em tampão TBS-BSA 1%, na diluição de 1:10.000. Após este período de incubação, foram realizadas mais 4 lavagens de 5 minutos em TBS-T 0,05%. Posteriormente a membrana passou por mais 1 hora de incubação com estreptavidina (*Invitrogen Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate*) diluída em tampão TBS (1:120.000), e após isso foram realizadas mais 5 lavagens de 5 minutos com TBST-T 0,05% para então procedermos a revelação.

A membrana foi então banhada uniformemente durante 5 minutos com aproximadamente 1,5 mL de solução comercial do método de luminescência não radioativa de detecção de antígenos específicos imobilizados (*ECL Western Blotting System – Amersham Biosciences*). Após isso, a membrana foi colocada em um cassete onde o filme foi exposto por aproximadamente 1 minuto para a detecção do sinal imunorreativo. A análise densitométrica foi realizada utilizando-se o software Kodak 1D v3.5.4.

3.7 Análise estatística

As médias dos parâmetros analisados nos grupos submetidos aos diferentes tratamentos foram sempre comparadas com as médias dos grupos controles, administrados com o veículo correspondente ao do tratamento, seguindo o mesmo protocolo experimental e realizado simultaneamente. Para a comparação entre as médias de mais de dois grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, exceto para a concentração sérica de TSH que, por não apresentar uma distribuição normal, utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo de *Dunn*. Para comparação das médias de dois grupos foi utilizado o teste *t*, exceto para a concentração sérica de TSH, quando foi utilizado o teste de *Mann Whitney*. Todos os dados estão expressos como a média \pm o erro padrão da média.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do bloqueio de receptores Y1 ou Y5 centrais em animais com acesso à ração, ou em jejum

A administração icv seriada de um antagonista de receptores Y5 (CGP71683; 15 nmoles/rato, 2 vezes ao dia por 72h) reduziu o consumo de alimento total (durante as 72h) em cerca de 32% ($P=0,014$), sendo esse efeito mais marcante durante o primeiro período escuro (Fig.4 A e B). Esse procedimento também promoveu perda de massa corporal de quase 10% ($P<0,001$) (Fig.4 C).

No que se refere às análises hormonais, houve redução de 62 e 18% nas concentrações séricas de T4 e T3, respectivamente ($P<0,001$ e $P=0,033$), sem alteração significativa na concentração de TSH (Fig. 5 A, B e C). Também não houve alteração significativa nas concentrações séricas de PYY ou leptina (Fig.6 A e B).

Já animais em jejum submetidos ao mesmo protocolo de tratamento com o CGP apresentaram atenuação da queda na concentração sérica de T4, que permaneceu mais de 3 vezes superior a dos animais controles ($P<0,001$) (Fig.7 B). Por outro lado, não houve alteração significativa nas concentrações de TSH e T3 (Fig.7 A e C). O bloqueio dos receptores Y5 centrais também acentuou a perda de massa corporal durante o jejum de 15 para 17% ($P=0,005$) (Fig.8 A), sem alteração nas concentrações de PYY e leptina (Fig.8 B e C).

Por outro lado, administração única do CGP (na mesma dose utilizada no protocolo de administração seriada) após 72 horas de jejum promoveu incremento de cerca de 4 vezes na concentração sérica de TSH ($P<0,001$) (Fig.9 A). Entretanto, não houve alteração estatisticamente significativa nas concentrações de T4 ($P=0,195$) ou T3 ($P=0,085$), quando comparadas ao grupo controle (Fig. 9 B e C).

Bloqueio de receptores Y5 centrais por 72h em animais com livre acesso à ração

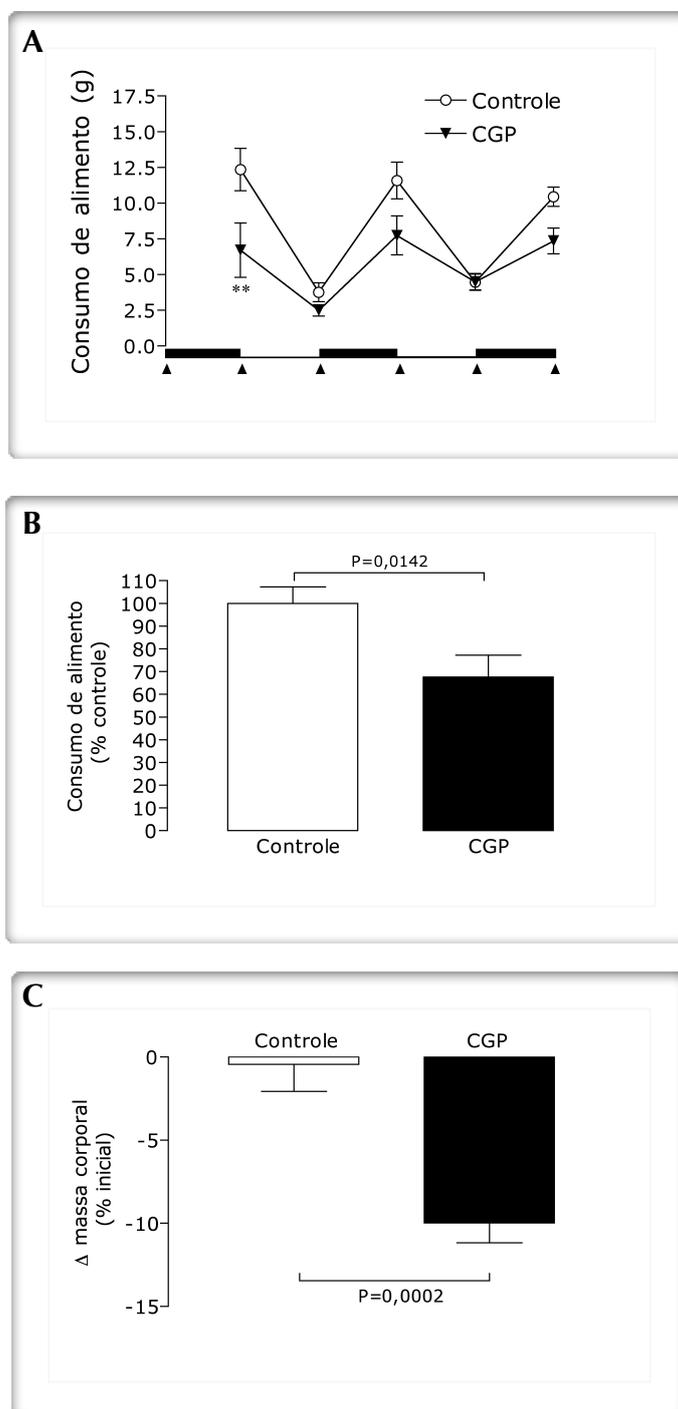


Figura 4: Efeito do bloqueio de receptores Y5 centrais por 72 horas (CGP, 15 nmoles/rato, icv; 2 administrações diárias) sobre o consumo alimentar (A e B) e a massa corporal de ratos. Em "A", as barras pretas representam o período escuro, enquanto as brancas o período claro. Cada seta indica o momento de uma microinjeção. Dados expressos como média \pm erro padrão da média** $P < 0,01$ vs controle. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

**Bloqueio de receptores Y5 centrais por 72h
em animais com livre acesso à ração**

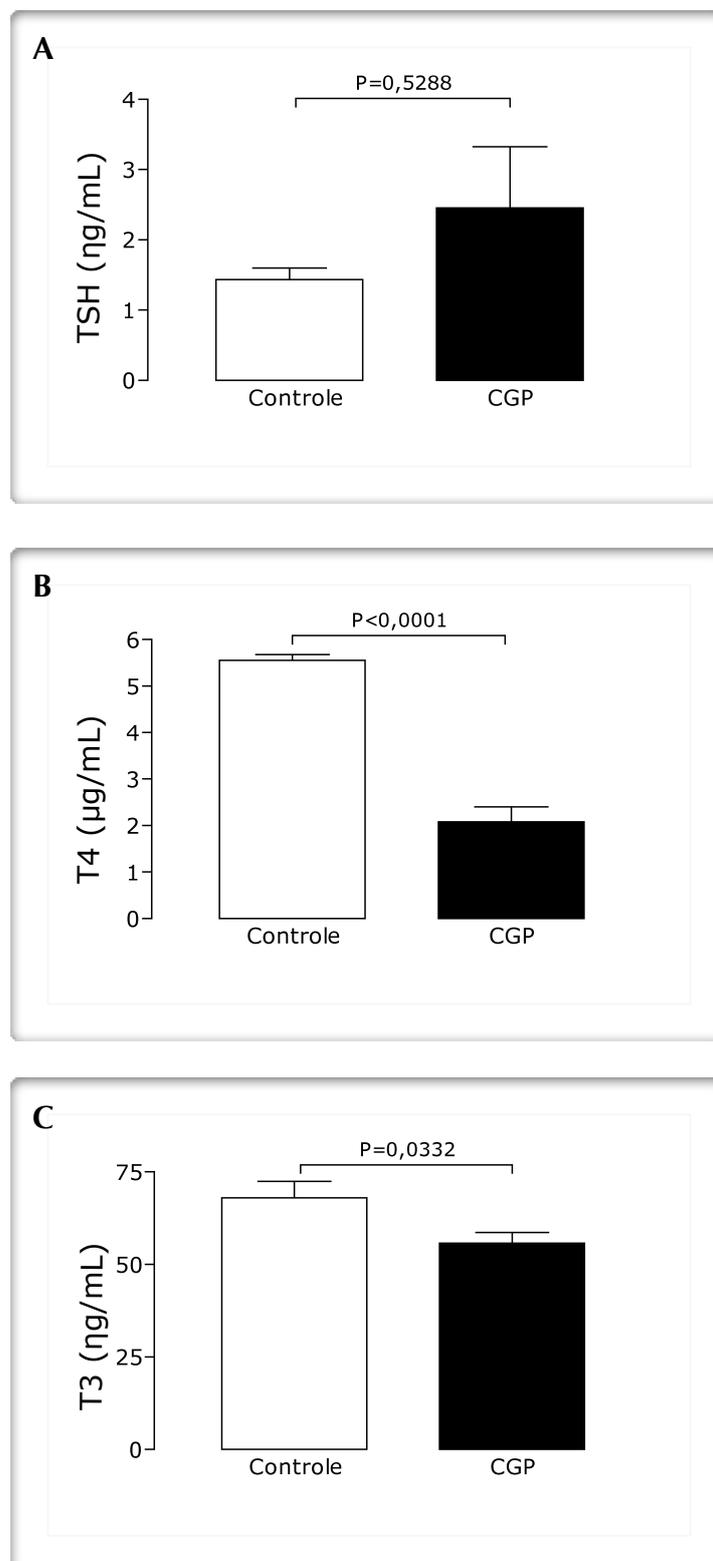


Figura 5: Efeito do bloqueio de receptores Y5 centrais por 72 horas (CGP, 15 nmoles/rato, icv, 2 administrações diárias) sobre as concentrações séricas de TSH (A), T4 (B) e T3 (C) de ratos com livre acesso à ração. Dados expressos como média ± erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

**Bloqueio de receptores Y5 centrais por 72h
em animais com livre acesso à ração**

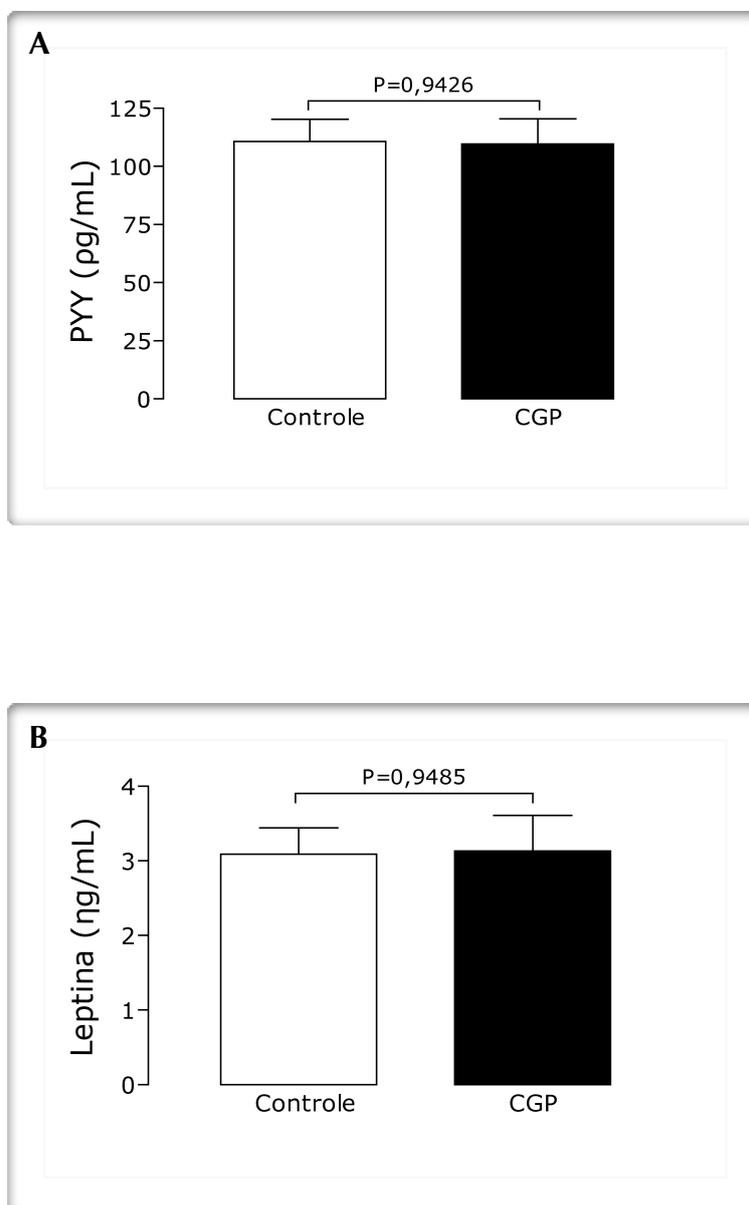


Figura 6: Efeito do bloqueio de receptores Y5 centrais por 72 horas (CGP, 15 nmoles/rato, icv; 2 administrações diárias) sobre as concentrações séricas de PYY (A) e leptina (B) de ratos com livre acesso à ração. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

Bloqueio de receptores Y5 centrais por 72h em animais em jejum

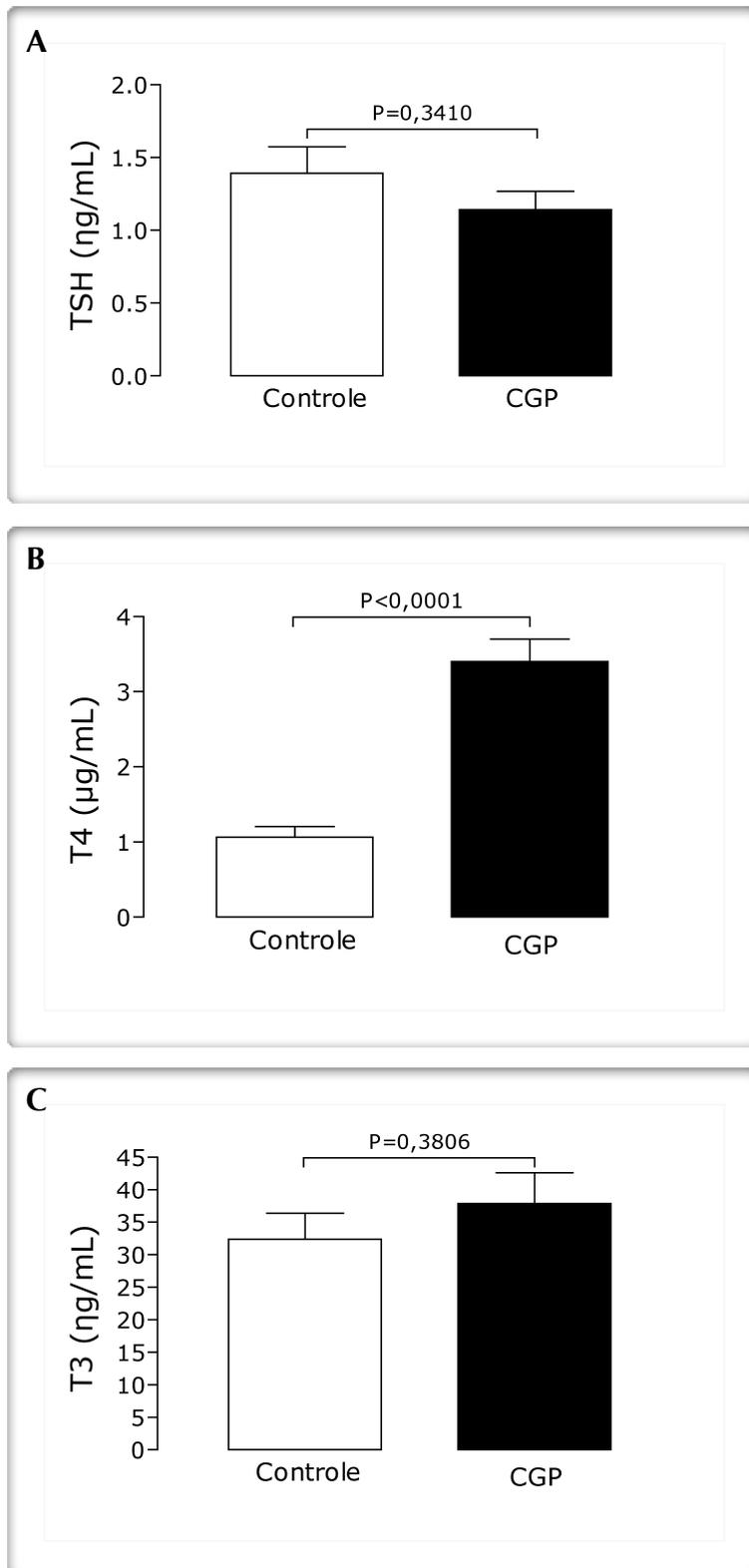


Figura 7: Efeito do bloqueio de receptores Y5 centrais durante 72 horas de jejum (CGP, 15 nmoles/rato, icv; 2 administrações diárias), sobre as concentrações séricas de TSH (A), T4 (B) e T3 (C). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

Bloqueio de receptores Y5 centrais por 72h em animais em jejum

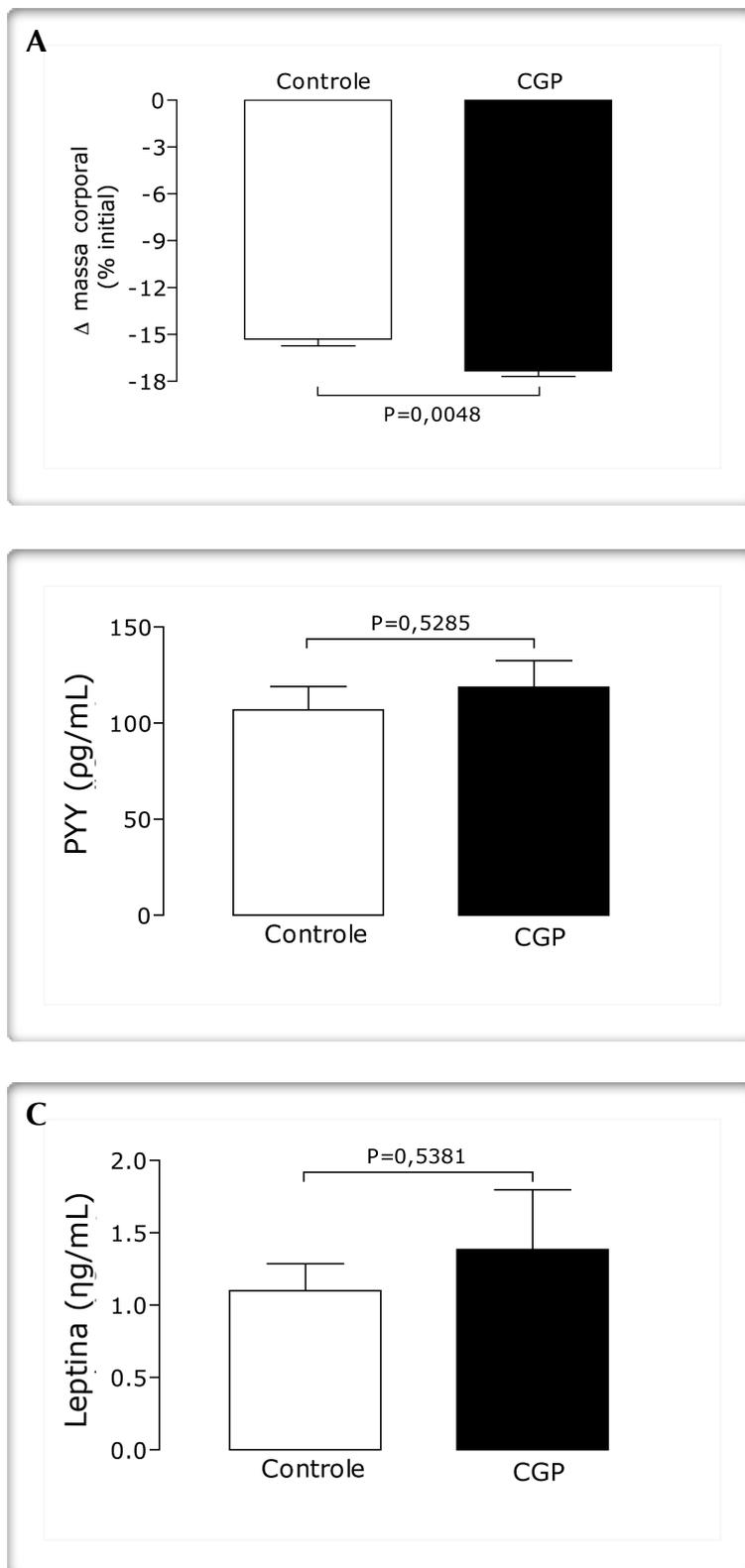


Figura 8: Efeito do bloqueio de receptores Y5 centrais durante 72 horas de jejum (CGP, 15 nmoles/rato, icv; 2 administrações diárias), sobre a perda de massa corporal (A) e as concentrações séricas de PYY (B) e leptina (C). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

Bloqueio de receptores Y5 centrais após 72h de jejum

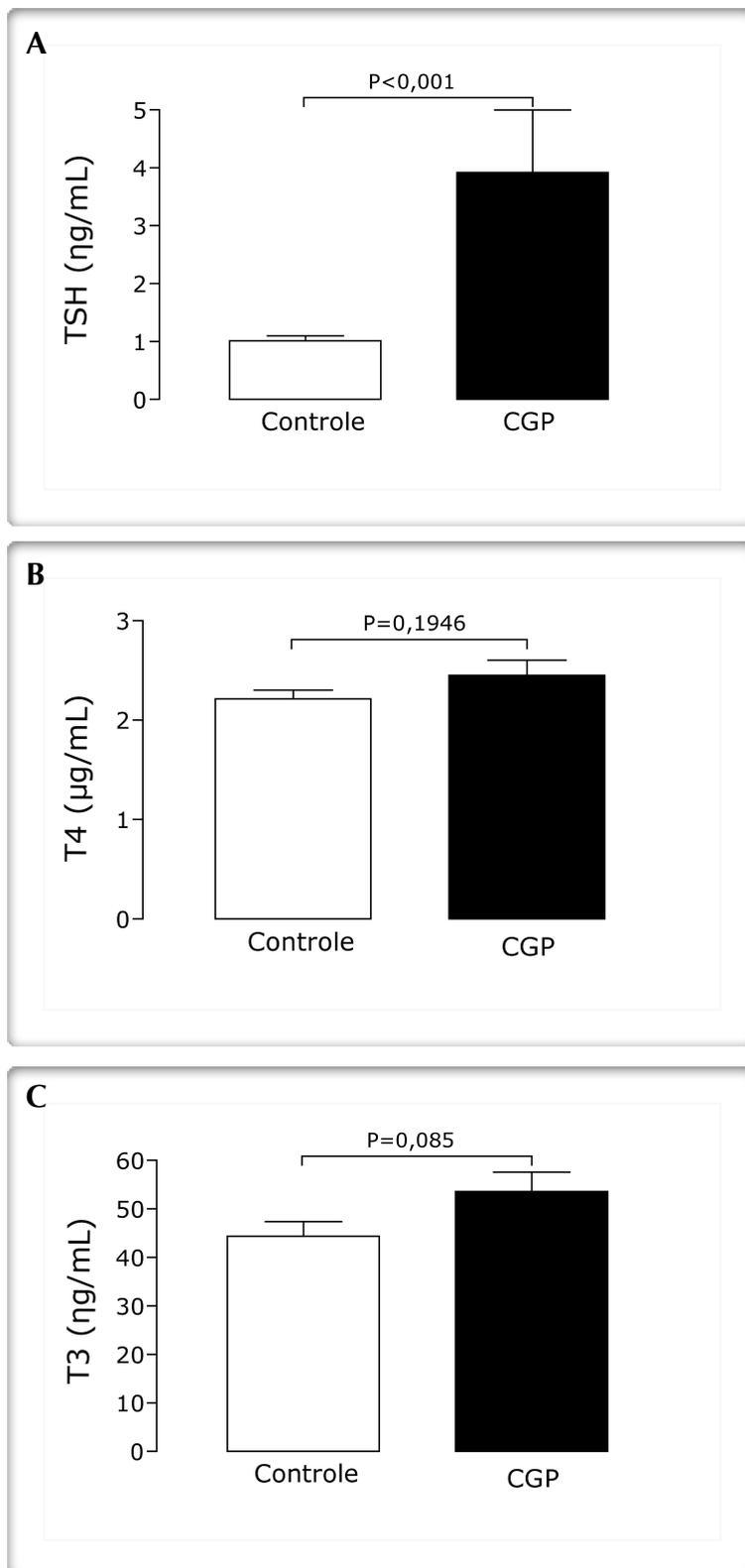


Figura 9: Efeito do bloqueio de receptores Y5 centrais após 72 horas de jejum (CGP 15 nmoles/rato, icv, administração única), sobre as concentrações séricas de TSH (A), T4 (B) e T3 (C). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

O mesmo tratamento seriado com um antagonista de receptores Y1 (BIBP3226; 10 nmoles/rato, icv, 2 vezes por dia durante 72 horas) não modificou significativamente os parâmetros analisados (consumo alimentar, massa corporal e concentrações séricas de TSH, T4 e T3) nos animais com livre acesso à ração (Fig.10 e 11). Em animais em jejum, o bloqueio de receptores Y1 centrais também não modificou a concentração sérica de TSH e T3 (Fig.12 B e D). Entretanto, esse tratamento modificou significativamente a concentração sérica de T4, que foi 15% superior ao grupo controle em jejum ($P=0,046$) (Fig.12 C). Adicionalmente, os animais em jejum tratados com o antagonista Y1 tiveram a perda de massa corporal acentuada ($P=0,044$) (Fig.12 A). Diversos animais apresentaram o comportamento de *barrel rolling*¹ em até 5 minutos após a administração do BIBP.

4.2 Efeito da realimentação sobre o eixo HHT e possíveis mediadores deste efeito

Após 72h de jejum, os animais foram realimentados por 6 horas (o grupo controle permaneceu em jejum) e amostras de sangue foram coletadas através da cânula na jugular, permitindo a análise das variações na concentração plasmática de TSH durante a realimentação. Após 3h, o grupo realimentado apresentou um incremento de aproximadamente 45% na concentração plasmática de TSH (relativo ao basal, antes da realimentação), enquanto o grupo em jejum apresentou um decréscimo de cerca de 8% ($P=0,053$) (Fig.13 A). Depois de 6h, a média da concentração plasmática de TSH do grupo realimentado permaneceu cerca de 12% superior ao basal, enquanto no grupo em jejum esse parâmetro foi 22% menor que o estado basal ($P=0,096$) (Fig.13 B). Ainda, a variação na concentração plasmática de TSH após 3h de realimentação apresentou correlação positiva com a quantidade de alimento ingerido ($r=0,56$; $P= 0,049$).

¹ Alteração motora caracterizada por rotações ao longo do eixo longitudinal do animal

Bloqueio de receptores Y1 centrais por 72h em animais com livre acesso à ração

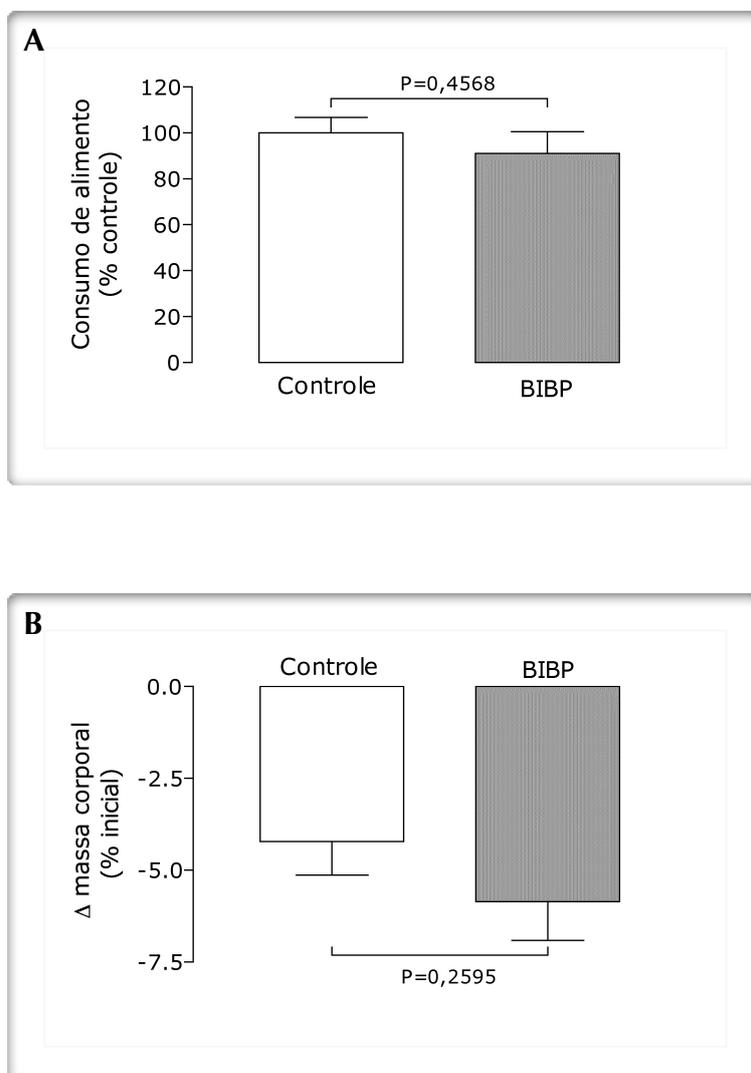


Figura 10: Efeito do bloqueio de receptores Y1 centrais por 72 horas (BIBP, 10 nmoles/rato, icv; 2 administrações diárias), sobre o consumo de alimento (A) e a variação da massa corporal (B) de ratos com livre acesso à ração. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

**Bloqueio de receptores Y1 centrais por 72h
em animais com livre acesso à ração**

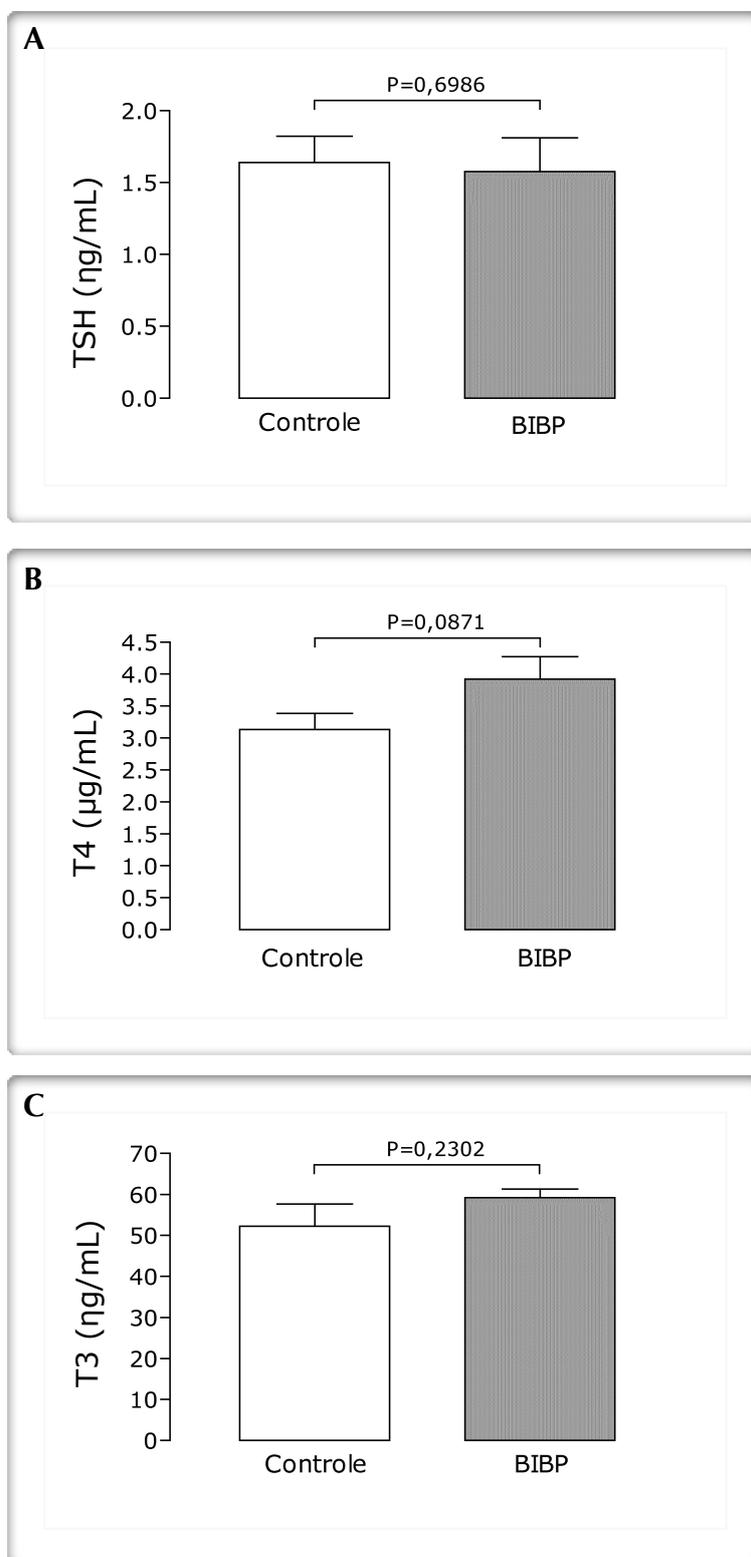


Figura 11: Efeito do bloqueio de receptores Y1 centrais por 72 horas (BIBP, 10 nmoles/rato, icv; 2 administrações diárias), sobre as concentrações séricas de TSH (A), T4 (B) e T3 (C) de ratos com livre acesso à ração. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

Bloqueio de receptores Y1 centrais por 72h em animais em jejum

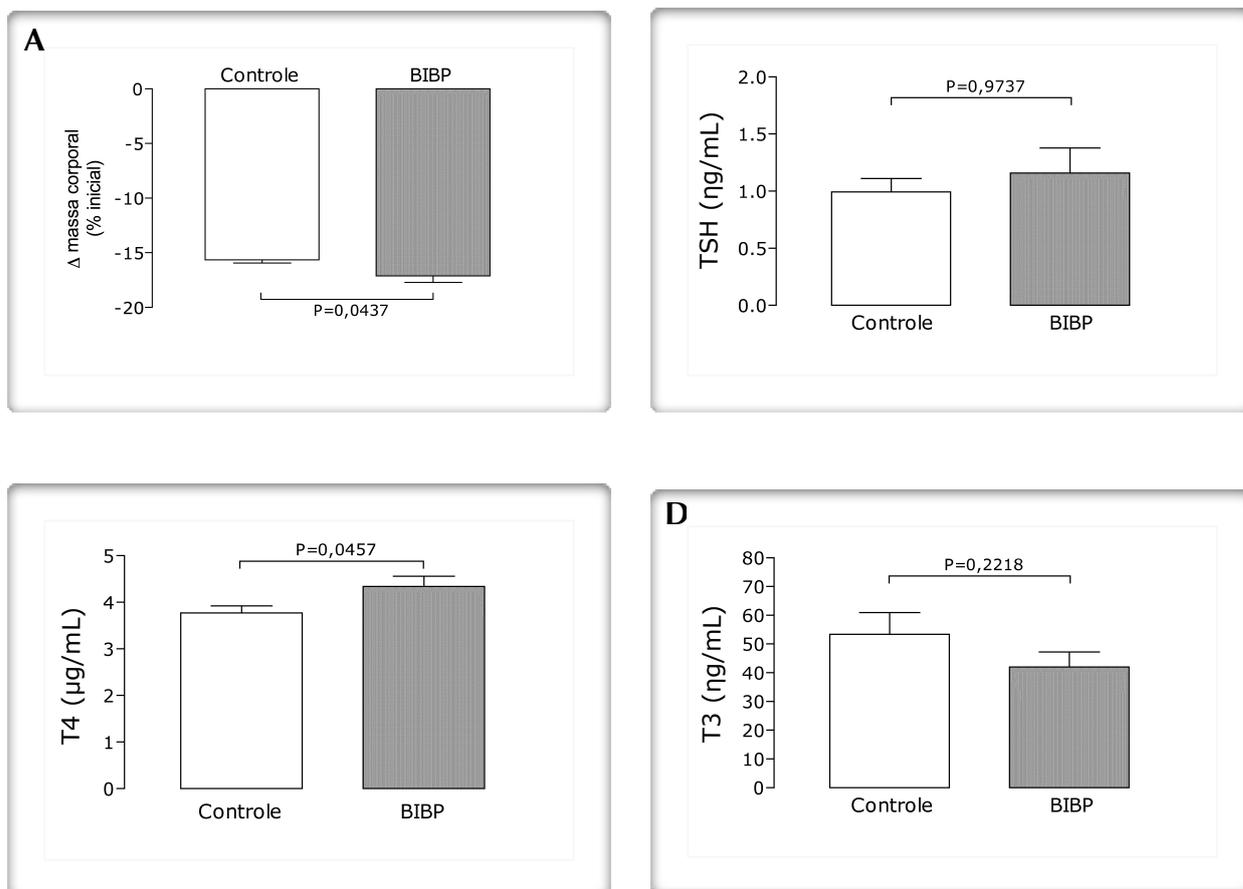


Figura 12: Efeito do bloqueio de receptores Y1 centrais durante 72 horas de jejum (BIBP, 10 nmoles/rato, icv; 2 administrações diárias), sobre a variação de massa corporal (A) e as concentrações séricas de TSH (B), T4 (C) e T3 (D). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

**Realimentação após 72h de jejum:
Coleta seriada de sangue através de cânula jugular**

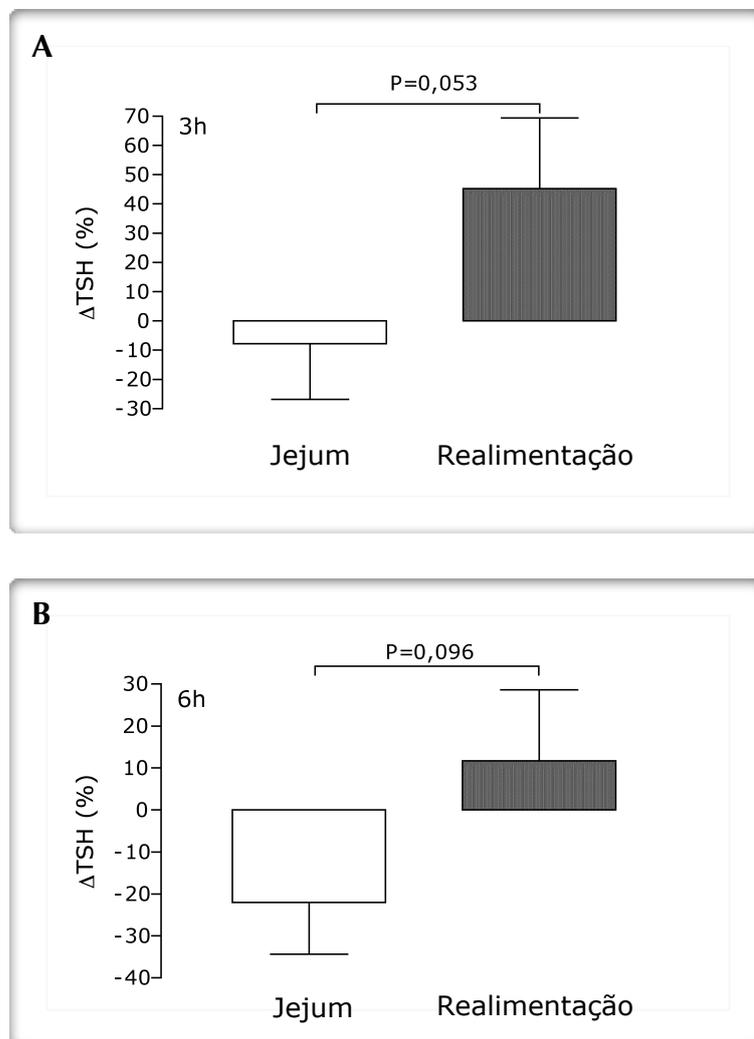


Figura 13: Alterações na concentração plasmática de TSH durante a realimentação, após 72 horas de jejum. As colunas representam as médias das variações da concentração plasmática de TSH 3 (A) ou 6 (B) horas após o início da realimentação, em relação ao período basal, anterior à realimentação. O grupo controle permaneceu em jejum. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

Em outro experimento de realimentação o sangue foi coletado em jejum ou posteriormente à realimentação por 1, 2, 3 ou 6 horas, após a eutanásia por decapitação. A concentração de glicose sérica aumentou cerca de 83% na primeira hora de realimentação, permanecendo em valores semelhantes até sexta hora ($P < 0,001$) (Fig. 14 A). Já a massa corporal sofreu incremento gradual, alcançando um ganho de 6,6% (em relação à massa em jejum) após 6 horas de realimentação ($P < 0,001$ vs 1, 2 e 3h) (Fig. 14 B). Sob o ponto de vista endócrino, ocorreram alterações nas concentrações séricas de TSH, T4, T3 e PYY, sem alterações estatísticas nas concentrações de leptina e corticosterona (Fig. 15 e 16). As concentrações de T4 e T3 aumentaram cerca de 26 e 29% , respectivamente, com 1h de realimentação ($P < 0,01$), tendo a concentração de T4 aumentado gradualmente até 6 horas, quando foi 78% superior ao jejum ($P < 0,001$) (Fig. 15 B). Por outro lado, a concentração sérica de T3 começou a reduzir após 2h de realimentação e não apresentou diferença significativa dos valores de jejum após 6 horas de realimentação (Fig. 15 C). De forma semelhante, a concentração de TSH aumentou após 2h ($P < 0,01$), permaneceu em valor semelhante a este após 3h, mas sofreu decréscimo para valor semelhante ao controle após 6h de realimentação (Fig. 15 A).

A concentração sérica de PYY aumentou já na primeira hora de realimentação e permaneceu estável por todo o período analisado ($P < 0,05$) (Fig. 16 A). Entretanto, as concentrações de leptina e corticosterona não sofreram alterações significativas (Fig. 16 B e C). A expressão do receptor para leptina, ObR-b, no hipotálamo mediobasal também não sofreu modificação durante o período estudado (Fig.17).

Após a primeira hora de realimentação, não houve modificação estatisticamente significativa na atividade da 5' desiodase tireoideana ($P = 0,446$) (Fig. 18 A). Porém, a

captação de iodeto durante 15 minutos (avaliada em um novo experimento) estava aumentada cerca de 32% neste mesmo período ($P=0,042$) (Fig. 18 B).

4.3 Efeitos central e hipofisário do PYY₃₋₃₆ sobre a secreção de TSH, em animais em jejum

Após 15 minutos da administração icv de 0,1nmol de PYY₃₋₃₆ ocorreu decréscimo na concentração sérica de TSH de aproximadamente 44%($P<0,01$). Já a administração de 0,01 nmol não promoveu alteração significativa (Fig. 19 A). A incubação de adenohipófise, isoladas de ratos em jejum, com diferentes concentrações de PYY₃₋₃₆ também não alterou a secreção de TSH (Fig. 19 B).

Realimentação após 72h de jejum: Grupos distintos para cada tempo

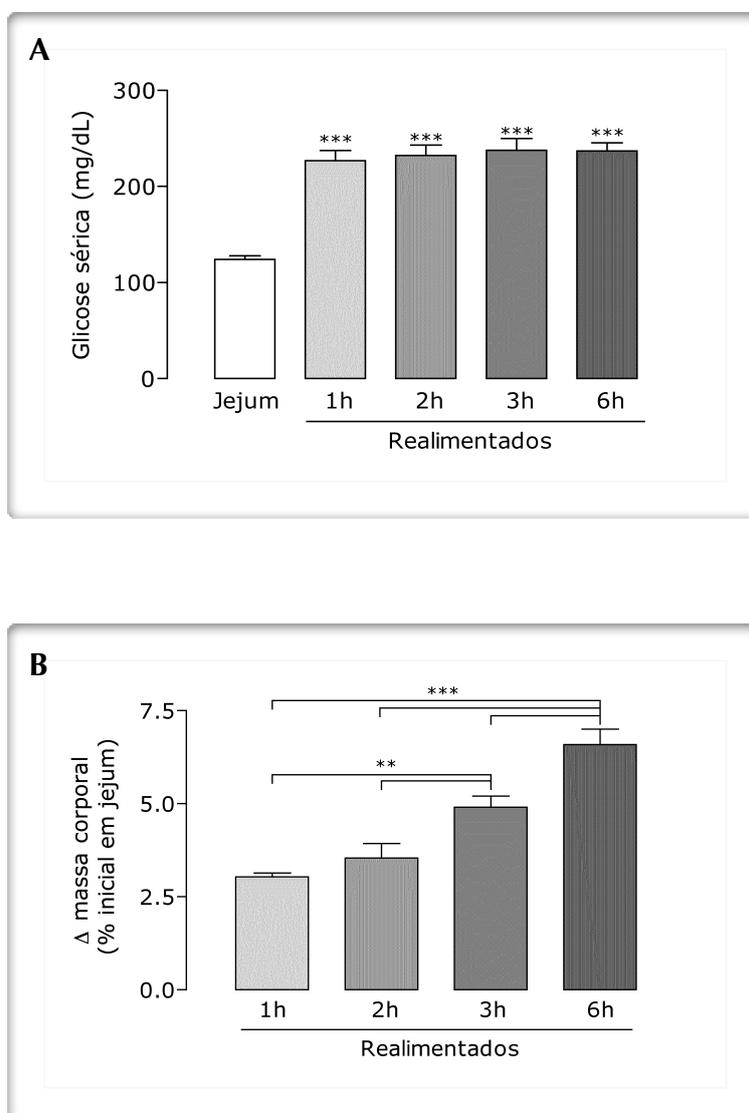


Figura 14: Efeitos da realimentação sobre a concentração sérica de glicose (A) e a massa corporal (B). A variação na massa corporal é relativa ao período anterior a realimentação (72h de jejum). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

**Realimentação após 72h de jejum:
Grupos distintos para cada tempo**

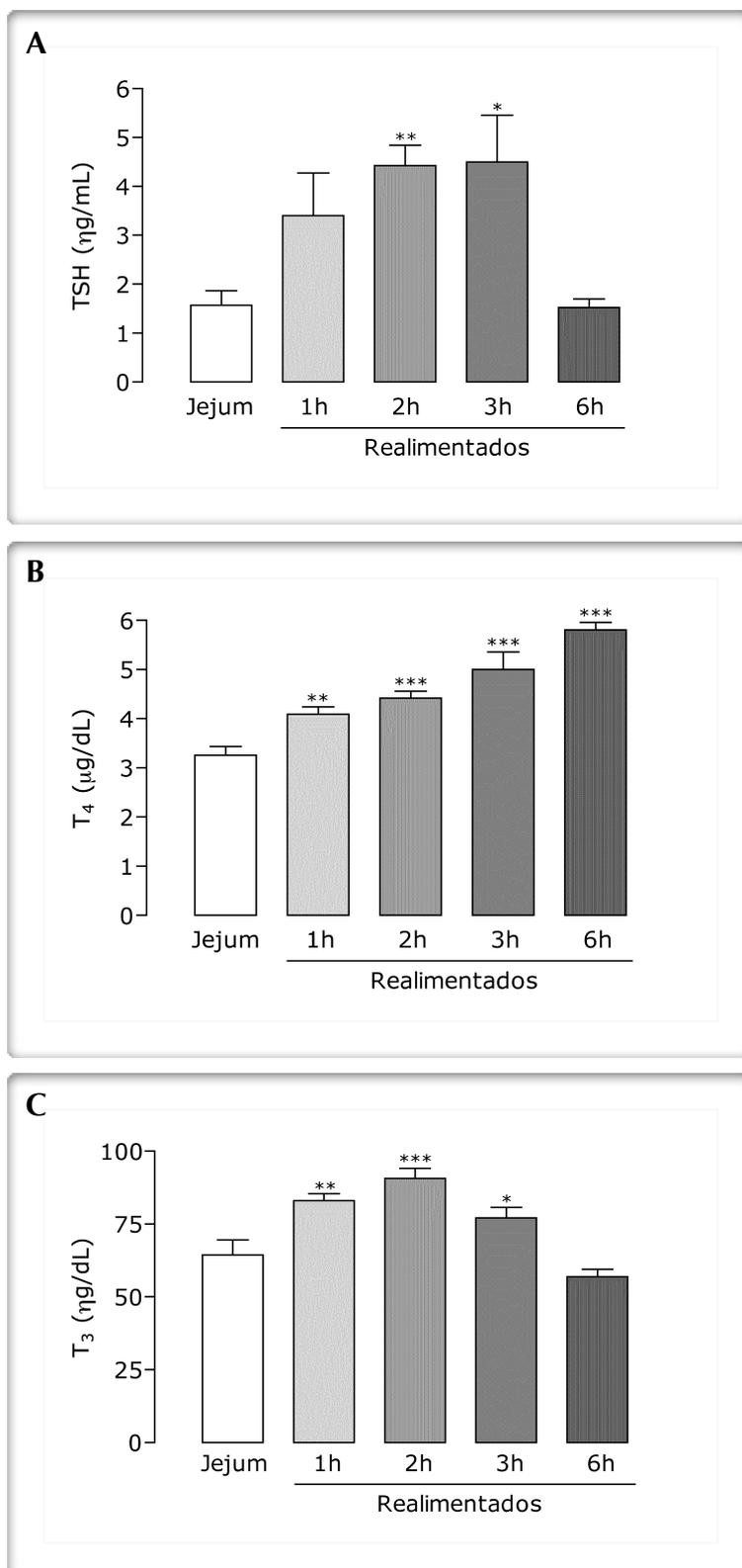


Figura 15: Efeitos da realimentação sobre a concentração sérica de TSH (A), T₄ (B) e T₃ (C). Dados expressos como média ± erro padrão da média. *P<0,05, ** P<0,01 e ***P<0,001 vs jejum. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

**Realimentação após 72h de jejum:
Grupos distintos para cada tempo**

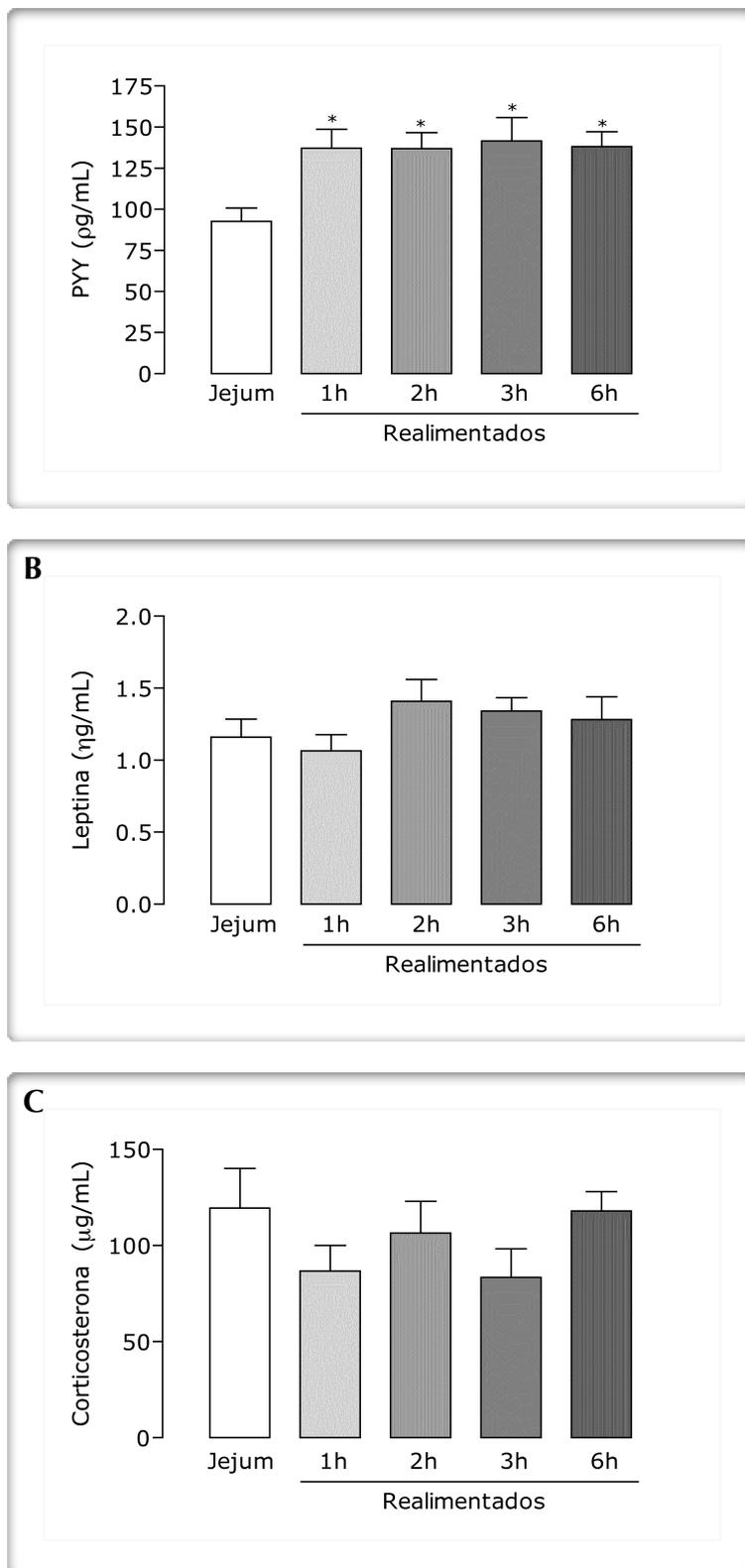


Figura 16: Efeitos da realimentação sobre a concentração sérica de PYY (A), leptina (B) e corticosterona (C). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs jejum. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

**Realimentação após 72h de jejum:
Grupos distintos para cada tempo**

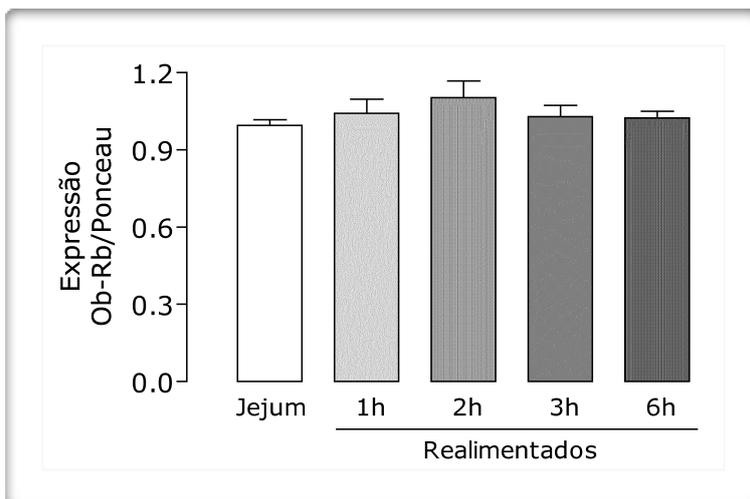
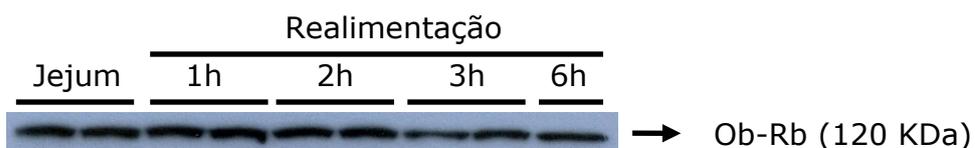


Figura 17: Efeitos da realimentação sobre expressão hipotalâmica do receptor para leptina, ObR-b. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

**Realimentação após 72h de jejum:
Metabolismo tireoideano
na 1a hora de realimentação**

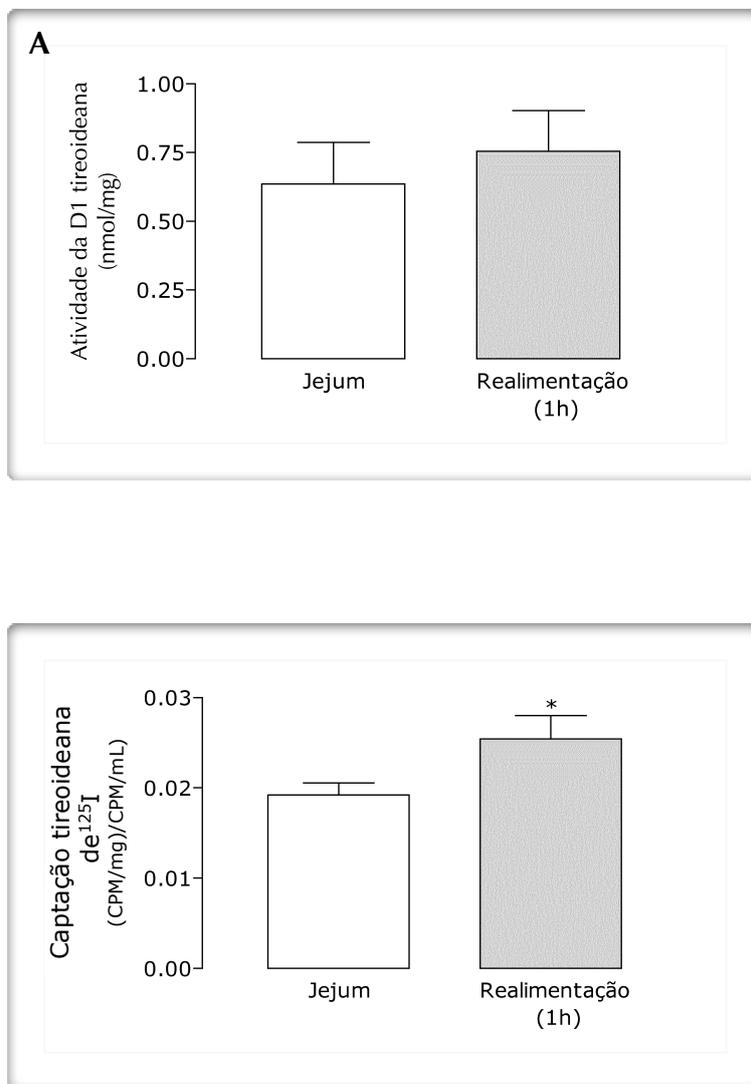


Figura 18: Efeitos da realimentação sobre a atividade da 5' desidase tireoideana (A) e captação tireoideana de iodeto (B). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs jejum. Os grupos experimentais continuam 9 a 12 animais.

Efeitos do PYY₃₋₃₆ sobre a secreção de TSH

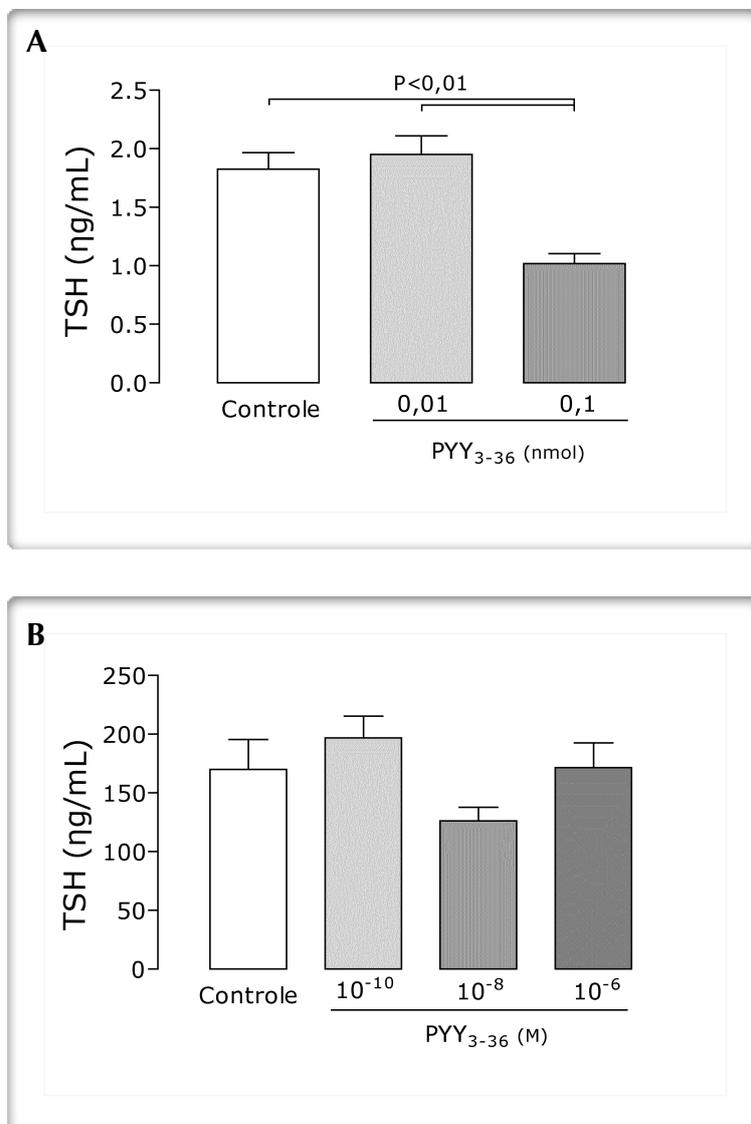


Figura 19: Efeitos da administração central, em ratos em jejum, do PYY₃₋₃₆ (A) e da incubação de adenohipófise isoladas de ratos em jejum com este peptídeo (B), sobre a secreção de TSH. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Os grupos experimentais continham 9 a 12 animais.

5 DISCUSSÃO

A principal contribuição deste trabalho relaciona-se ao esclarecimento do papel de receptores Y5 central no controle da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) durante o jejum e na investigação dos mecanismos envolvidos na ativação da tireóide durante o período inicial de realimentação.

Embora haja controvérsia na literatura sobre o papel do receptor Y5 no controle da ingestão alimentar (Duhault e col., 2000; Polidori e col., 2000), nossos dados apoiam a hipótese de sua ativação estimular a ingestão alimentar, principalmente durante período escuro. Essa hipótese não é nova e já foi reforçada através da administração sistêmica do mesmo antagonista aqui utilizado (Criscione e col., 1998; Kask e col., 2001). Adicionalmente, a supressão da expressão central deste receptor também reduz o consumo alimentar em ratos com livre acesso à ração (Tang-Christensen e col., 1998). No presente trabalho, demonstramos que o bloqueio dos receptores Y5 centrais durante 72 horas reduz o consumo de alimento total em mais de 30% e que esse efeito anorexígeno é mais marcante no primeiro período escuro do tratamento. Nossos dados não permitem explicar o porquê desta dinâmica temporal do efeito observado sobre o consumo alimentar, mas Tang-Christensen e colaboradores (1998) observaram efeito semelhante ao suprimir a síntese central de receptores Y5, sendo a ação anorexígena mais marcante nas primeiras 12 horas.

Embora a ingestão alimentar tenha sido reduzida pelo tratamento com o antagonista de receptores Y5 (CGP71683), a concentração plasmática de PYY não sofreu modificação. Isso pode ser consequência da redução do efeito anorexígeno ao longo do período experimental. Afinal, no último período, anterior a eutanásia, não houve diferença estatística entre os valores de ingestão alimentar dos grupos.

Outro efeito observado foi acentuada perda de massa corporal nos animais tratados com o CGP que, provavelmente, resulta da redução na ingestão alimentar

observada. A redução nas concentrações séricas de T4 e T3 observada representa um fenômeno já descrito nessas condições de perda de massa corporal, sendo esse efeito comumente atribuído à supressão da atividade de neurônios hipotalâmicos produtores de TRH por ação do NPY (ver Boelen e col., 2008). Todavia, nós demonstramos que o bloqueio dos receptores Y5 compromete essa ação supressora do NPY durante o jejum. Portanto, a redução na concentração de hormônios tireoideanos (HT) observada nos animais alimentados não deve resultar da ação do NPY sobre neurônios TRHérgicos do PVN. É possível que o efeito observado envolva a redução da ativação de receptores MC4-R nesses neurônios, já que durante a restrição alimentar também ocorre aumento da expressão de AgRP no núcleo arqueado (Mizuno & Mobbs, 1999; Palou e col., 2009) e este é capaz de suprimir a expressão de pré-proTRH (Fekete e col., 2002c). Neste caso, haveria redução na síntese de AMPc nos neurônios produtores de TRH, redução na fosforilação da CREB e, conseqüentemente, menor ativação do promotor do proTRH. Todavia, considerando essa hipótese, seria esperado que também ocorresse redução na concentração sérica de TSH, o que não ocorreu. Uma possível explicação seria a redução inicial da concentração e atividade biológica do TSH (resultante da reduzida secreção de TRH), resultando em decréscimo na concentração sérica de HT que, por sua vez, resultaria em menor supressão da síntese hipofisária de TSH. Desta forma, após 72 horas de tratamento, teríamos a concentração sérica de TSH normal, mas redução na atividade tireoideana. Entretanto, nossos dados não permitem a confirmação desta hipótese.

Conforme apresentado na introdução, durante o jejum ocorre supressão do eixo HHT, caracterizando-se pela redução na expressão do pré-proTRH e nas concentrações séricas de TSH, T4 e T3 (Grossie & Turner, 1962; Croxson e col., 1977; Blake e col., 1991). Acredita-se que essa resposta represente um importante mecanismo de

adaptação ao estado de baixa disponibilidade energética. Afinal, o decréscimo nos efeitos dos hormônios tireoideanos (HT) resulta em redução no gasto energético e, portanto, evitaria depleção acelerada das reservas energéticas. Todavia, a administração de T3 em roedores em jejum não aumenta a taxa metabólica (Rothwell e col., 1982). Os mecanismos que levam a supressão do eixo HHT ainda não foram elucidados. Neste sentido, o presente trabalho demonstra, pela primeira vez, um papel fisiológico para receptores Y5 centrais no controle do eixo HHT durante o jejum, sendo sua ativação responsável, pelo menos em parte, pela supressão da secreção de TSH e da atividade da glândula tireóide.

O bloqueio dos receptores Y5 durante as 72 horas de jejum resultou em acentuada perda de massa corporal, que pode resultar do incremento no gasto energético secundário ao aumento na concentração sérica de T4 e sua conversão local a T3. O fato da concentração sérica de T3 não ter modificado sugere que o tratamento com o antagonista de receptores Y5 não interferiu em sua secreção ou conversão a partir do T4, que encontram-se reduzidas no jejum. (Kinlaw e col., 1985; Wu S.Y., 1990). Por outro lado, também não ocorreu alteração na concentração sérica de TSH.

Uma primeira hipótese seria de que o incremento na secreção de T4, resultante do bloqueio de receptores Y5 centrais neste modelo de jejum, poderia ser resultado de ativação neural da tireóide. De fato, sabemos que: a administração central de NPY suprime a atividade do sistema nervoso simpático (Egawa e col., 1991); durante o jejum ocorre redução na atividade de eferências simpáticas à tireóide e que a desnervação simpática compromete o funcionamento desta glândula (Young e col., 2005). Portanto, não podemos descartar a possibilidade da administração central do antagonista de receptores Y5 promover incremento na atividade de eferências simpáticas à tireóide, resultando em maior secreção de T4.

Por outro lado, o aumento na concentração sérica de T4 não foi acompanhado por alteração na concentração de TSH, o que sugere não haver uma alteração primária da tireóide, pois isso resultaria em supressão da secreção de TSH. Portanto, outra hipótese para explicar o efeito do bloqueio de receptores Y5 centrais sobre a concentração sérica de T4 se baseia na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, resultando em maior atividade biológica do TSH, já que sua concentração não aumentou.

Os receptores Y5 são expressos no PVN (Durkin e col., 2000) e a administração de agonista Y5 em animais alimentados promove supressão na expressão do pré-proTRH (Fekete e col., 2002a). Ainda, durante o jejum ocorre incremento na concentração do NPY tanto no núcleo arqueado, como no PVN (Beck e col., 1990). Portanto, é possível que o bloqueio dos receptores Y5 centrais comprometa a supressão da síntese de TRH durante o jejum. Como resultado, ocorreria maior secreção de TRH, contribuindo para o incremento na atividade biológica do TSH (Nikrodhanond e col., 2006). O fato da concentração sérica de TSH não aumentar pode ser resultado da supressão de sua síntese por ação direta dos hormônios tireoideanos, no tireotrofo. Portanto, é possível que a reativação tireoideana por bloqueio dos receptores Y5 seja decorrente da retirada do efeito supressor do NPY sobre neurônios produtores de TRH, resultando em síntese sustentada de TSH, biologicamente mais ativo, mesmo na presença de elevada concentração de T4.

Ainda, é possível que o bloqueio de receptores Y5 diminua a conversão hipotalâmica de T4 a T3, contribuindo para ativação do eixo HHT. Embora não haja evidências que sugiram uma ação direta do NPY sobre os tanicitos que expressam a D2, sabe-se que a administração de leptina suprime a ativação da D2 hipotalâmica durante o jejum (Coppola e col., 2005). Como a leptina apresenta efeito inibitório

sobre neurônios produtores de NPY, é possível que esse neurotransmissor seja mediador do efeito da leptina. Neste caso, consideramos a hipótese de um efeito estimulante do NPY sobre a atividade da D2, que seria bloqueado pelo antagonista de receptores Y5. Como resultado, ocorreria menor síntese hipotalâmica de T3, contribuindo para ativação do eixo HHT. De qualquer maneira, o aumento na concentração plasmática de T4 não é secundário a alteração na secreção de PYY ou leptina que, como descrito na introdução, são capazes de estimular a secreção de TSH (Légrádi e col., 1997; Oliveira e col., 2006), mas estão inalterados em nosso estudo.

Se a segunda hipótese, relativa ao bloqueio da supressão da síntese de TRH, fosse verdadeira, uma única administração central do antagonista de receptores Y5 no final do período de jejum causaria incremento da secreção de TSH. Afinal, como o receptor Y5 é acoplado à proteína Gi, seu bloqueio reduziria a inibição da síntese de AMPc e, portanto, resultaria em maior fosforilação da CREB, com conseqüente ativação do promotor do proTRH. Dessa forma, ocorreria aumento da secreção de TRH, mas não haveria supressão da síntese de TSH pelos hormônios tireoideanos, que encontram-se em baixa concentração plasmática. De fato, em novo experimento, demonstramos que o bloqueio agudo de receptores Y5 centrais após 72 horas de jejum, compromete a supressão do eixo HHT durante o jejum, resultando em incremento na concentração sérica de TSH. Portanto, a ativação desses receptores apresenta papel fisiológico durante o jejum, sendo responsável pela supressão do eixo HHT e, conseqüentemente, redução no gasto energético.

Dessa forma, reforçamos a importância do papel dos receptores Y5 centrais no controle da ingestão alimentar, o que indiretamente acarreta alterações no eixo HHT, e demonstramos, pela primeira vez, sua relevância para o controle da atividade do eixo HHT durante o jejum.

Outro receptor que, quando ativado farmacologicamente, é capaz de modular tanto a ingestão de alimentos, como a expressão do pré-proTRH, é o receptor Y1. O bloqueio de receptores Y1 centrais reduza a resposta orexígena resultante da administração do NPY, mas a administração central do BIBP3226 (antagonista de receptores Y1) não modifica o consumo de alimento em condições basais (Kask e col., 1998; Morgan e col., 1998). Portanto, nossos dados reforçam a hipótese de não haver relevância fisiológica para a ativação de receptores Y1, em condições basais, no controle da ingestão alimentar. Por outro lado, esse antagonista reduz tanto o consumo de uma dieta de alta palatabilidade, como a resposta orexígena induzida por um período de jejum (Kask e col., 1998). Portanto, é possível que a resposta orexígena secundária a ativação dos receptores Y1 relacione-se a condições de reduzida oferta de energia, ou mesmo de caráter hedônico, como no caso de alimentos de alta palatabilidade.

Sob o ponto de vista endócrino, o bloqueio de receptores Y1 centrais por 72 horas não modificou a atividade do eixo HHT em animais com livre acesso à ração. Por outro lado, nos animais tratados durante o jejum, houve discreto aumento na perda de massa corporal e na concentração sérica de T4. Como não houve incremento na concentração sérica de TSH, podemos elaborar hipótese similar àquela elaborada para explicar os efeitos observados após o bloqueio de receptores Y5. Entretanto, naquela situação, o incremento na concentração de T4 foi de magnitude bem maior. De qualquer forma, a interpretação dos dados obtidos com a administração central do antagonista de receptores Y1 deve ser feita com muita cautela, pois diversos animais apresentaram o comportamento de *barrel rolling* (um tipo de convulsão) nos primeiros minutos após a microinjeção (efeito não quantificado). Como a administração de anticorpos contra o NPY na área ventrolateral do tálamo promove o comportamento de

barrel rolling (Walter e col., 1994), é possível que o comportamento observado resulte do bloqueio de receptores Y1 nesta área.

Assim sendo, podemos afirmar que, pelo menos em ratos, a ativação de receptores Y5 contribui para a supressão do eixo hipotálamo-hipófise tireóide durante o jejum, provavelmente através da inibição de neurônios produtores de TRH no PVN. Por outro lado, não podemos excluir a possibilidade de envolvimento de receptores Y1.

Sobre a ativação do eixo HHT durante a realimentação, existem poucos dados disponíveis na literatura e estes são controversos. Rothwell e colaboradores (1982; 1983) mostraram que a concentração sérica de T3 aumenta nas primeiras 3 horas de realimentação (após 72h de jejum). Por outro lado, em trabalho mais recente, Sánchez e colaboradores (2008) propuseram que a ativação do eixo HHT ocorresse somente após 12 horas de realimentação (após 64h de jejum). Estes mostraram que tanto a expressão de pré-proTRH no PVN, como a concentração sérica de TSH permanecem reduzidas entre 4 e 12 horas de realimentação, retornando para valores semelhantes ao grupo normoalimentado em 24 horas. Já os nossos dados, mostram que a ativação do eixo HHT ocorre rapidamente, nas primeiras horas de realimentação, apresentando relação com a quantidade de alimento ingerido.

A coleta de sangue seriada dos animais (em jejum e após 3 e 6 horas de realimentação) nos permitiu verificar que a secreção de TSH aumenta já nas primeiras 3 horas de realimentação e apresenta correlação com a quantidade de ração consumida. Esta abordagem experimental apresenta dois inconvenientes: reduzido volume de plasma disponível para quantificação de concentração de diferentes hormônios; a possibilidade de redução na atividade do eixo HHT em função da manipulação cirúrgica na véspera do experimento. Em função disso, realizamos outro experimento, no qual grupos de animais foram sacrificados por decapitação em

diferentes tempos (jejum, 1, 2, 3 ou 6h de realimentação), nos permitindo a coleta de maior volume de sangue.

A concentração sérica dos hormônios tireoideanos aumentou já na primeira hora de realimentação, assim como a captação de iodeto pela tireóide, sugerindo o incremento na atividade do NIS, o qual é estimulado pelo TSH. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na concentração sérica de TSH com 1 hora de realimentação. É possível que a glândula do animal em jejum estivesse depletada de iodo, o que aumentaria a sua sensibilidade à ação do TSH, facilitando a captação de iodeto. Mesmo assim, não podemos excluir a possibilidade de um incremento na atividade biológica do TSH nesse período, associado ao incremento gradual de sua concentração sérica. Hugues e colaboradores (1983) mostraram ocorrer incremento na concentração plasmática de TSH na primeira hora após realimentação com dieta rica em carboidratos, sendo este efeito bloqueado pela administração de um anticorpo contra o TRH.

Embora não tenhamos identificado alteração na atividade da 5' desidase tireoideana com uma hora de realimentação, as alterações na concentração sérica de T3 seguem um perfil semelhante aquele das alterações de TSH, sugerindo que este último represente um importante estímulo à secreção do primeiro. Por outro lado, como não há alteração significativa na concentração sérica de TSH e na atividade da D1 tireoideana (a qual é estimulada pelo TSH), é possível que a ativação inicial da tireóide envolva outros mecanismos, como a ativação sistema nervoso simpático.

Interessantemente, após 3 horas de realimentação a concentração de T3 retorna a valores semelhantes aos do grupo em jejum, provavelmente como resultado da redução na concentração de TSH. Esta última, por sua vez, pode ter ocorrido em função do ciclo circadiano, caracterizado pela redução no eixo HHT após as primeiras

horas do período claro (ver Seoane e col., 2000). Já a concentração sérica de T4 continuou sofrendo incremento durante todo o período experimental, alcançando seu pico 6 horas após o início da realimentação. Portanto, embora ocorra rápida ativação do eixo HHT nas primeiras horas de realimentação, após 3 horas este sofre modificação, resultando em redução na secreção de TSH e concentração sérica de T3, porém com sustentado aumento na concentração de T4. Este último fenômeno pode ocorrer em função da elevada meia vida do T4, quando comparado ao T3. De qualquer forma, nossos dados não se opõem aos dados de Sánchez e colaboradores (2008), já que o primeiro ponto temporal analisado por eles foi 4h após o início da realimentação. Por outro lado, a afirmação deles sobre a ativação tardia do eixo HHT parecer ser inadequada.

Associando nossos dados, sabemos que ocorre rápido estímulo ao eixo HHT e este relaciona-se ao consumo alimentar. Como os animais foram mantidos agrupados, não mensuramos o consumo individual de ração no segundo experimento. Entretanto, o “ganho de massa corporal”, que ocorreu gradualmente ao longo da realimentação, nos sugere que os animais continuaram comendo até a 6a. hora de realimentação. Isso explicaria o porquê das concentrações séricas de glicose e PYY permanecerem em valores semelhantes em todos os grupos realimentados. A glicose parece não contribuir para a ativação do eixo (Fekete e col., 2006), mas a administração sistêmica de PYY₃₋₃₆ é capaz de estimular a secreção de TSH em animais em jejum (Oliveira e col., 2006). Portanto, é possível que a secreção intestinal deste hormônio durante a realimentação resulte em ativação do eixo HHT.

Visando contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação do PYY₃₋₃₆ sobre a secreção de TSH, realizamos 2 novos experimentos, nos quais avaliamos o efeito da sua administração central e sua ação direta sobre adenohipófises

isoladas de ratos em jejum. De forma intrigante, seu efeito central resultou em redução na concentração sérica de TSH. Embora seja um efeito oposto ao esperado, pode ser resultado da ativação de receptores Y5 nos neurônios TRHérgicos do PVN. Já em adenohipófises isoladas, o PYY₃₋₃₆ não modificou a secreção de TSH, nas concentrações testadas. Assim sendo, nossos dados não permitem afirmar como ocorre o efeito estimulante do PYY₃₋₃₆ sobre a secreção de TSH em animais em jejum (Oliveira e col., 2006). Uma hipótese para explicar este efeito seria sua atuação em aferências vagais. Afinal, esses neurônios expressam o receptor Y2 e apresentam incremento na frequência de disparo de potenciais de ação após a administração sistêmica de PYY₃₋₃₆ (Koda e col., 2005). Ainda, a vagotomia suprime o aumento da expressão de c-fos em neurônios parvocelulares do PVN induzida pela realimentação (Timófeeva e col., 2005). Portanto, é possível que a ativação de neurônios do PVN durante a realimentação envolvam a ação do PYY₃₋₃₆ em aferências vagais.

Outro possível modulador da ativação do eixo HHT durante a realimentação é a leptina. Conforme exposto na introdução, esse hormônio é capaz de estimular o eixo HHT e seus efeitos sobre a expressão de proTRH podem ser tanto diretos, como indiretos, através de sua ação sobre neurônios do núcleo arqueado(ARC) (ver Hollenberg, A.N., 2008; Nilni, E.A., 2010). Vella e colaboradores (2007) demonstraram que, após 24 horas de jejum em camundongos, a realimentação por duas horas promove incremento na concentração plasmática de leptina. Simultaneamente, ocorre aumento na expressão do fator de transcrição Nhlh2 no PVN e ARC, podendo esse efeito ser obtido pela administração de leptina a camundongos em jejum. Portanto, eles propuseram que o incremento na concentração plasmática de leptina durante a realimentação representasse estímulo à expressão do Nhlh2. Como este fator de transcrição é capaz de influenciar a expressão do proTRH (Jing e col., 2004), torna-se

plausível admitirmos seu envolvimento na ativação do eixo HHT durante a realimentação, sendo a leptina um importante mediador.

Todavia, nossos dados mostram que a realimentação por 6 horas, após 72 horas de jejum não modifica a concentração plasmática de leptina. Essa diferença em relação aos dados de Vella e colaboradores (2007) pode ser resultado da diferença na duração do jejum, já após 72 horas de jejum a massa de tecidos adiposo torna-se extremamente reduzida, podendo comprometer a secreção de leptina. Mesmo assim, 2 horas de realimentação (após 72h de jejum) promove mudança na expressão de c-Fos em neurônios da porção medial para aqueles mais laterais do núcleo arqueado, aonde estão localizados os produtores de α MSH, sendo a expressão de c-Fos presente em quase 90% desses neurônios (Singru e col., 2007). Além disso, a administração do AgRP antes da realimentação reduziu a expressão de c-Fos no PVN. Também já foi demonstrado que a expressão de NPY e AgRP no ARC sofre redução nas primeiras 4 horas de realimentação (Sánchez e col., 2008). Portanto, a neurotransmissão melanocortinérgica parecer apresentar efeito estimulante sobre neurônios do PVN durante a realimentação, podendo estar envolvida na ativação do eixo HHT. Como os neurônios produtores de α MSH são estimulados pela leptina, é possível que, mesmo sem incremento na concentração plasmática deste hormônio, alteração na expressão hipotalâmica de seu receptor, o ObR-b, pudesse contribuir para ativação do eixo HHT.

Também foi proposto um papel para os glicocorticóides no controle do eixo HHT durante o jejum. Coppola e colaboradores (2005) demonstraram que os glicocorticóides estimulam o incremento na atividade da desidase do tipo 2 (D2) no hipotálamo durante o jejum, contribuindo para a supressão do eixo HHT. Ainda, Lee e colaboradores (2003) demonstraram que na primeira hora de realimentação ocorre incremento na fosforilação de CREB no hipotálamo de ratos, sendo esse efeito

bloqueado pela administração de dexametasona. Portanto, por sua ação inibitória tanto sobre a D2, como sobre a fosforilação da CREB, o incremento na concentração sérica de glicocorticóides pode participar da supressão do eixo HHT. Por outro lado, a redução em sua concentração sérica durante a realimentação poderia estar envolvida na ativação deste eixo. Entretanto, não houve redução na concentração sérica de corticosterona nas primeiras 6 horas de realimentação, sugerindo o não envolvimento deste hormônio no controle da atividade tireoideana neste período.

Dessa forma, demonstramos que durante a realimentação ocorre rápido estímulo da atividade tireoideana, pelo menos em parte, devido ao incremento na secreção de TSH, caracterizando assim, a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide ainda nas primeiras horas. Embora não possamos identificar os mecanismos envolvidos neste fenômeno, demonstramos que a ativação do eixo HHT está relacionada com a quantidade de ração ingerida, podendo envolver a ação do PYY.

6 CONCLUSÕES

A ativação de receptores Y5 no encéfalo, provavelmente em neurônios hipofisiotrópicos produtores de TRH, contribui significativamente para a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) que ocorre durante o jejum. Embora a ativação de receptores Y1 possa contribuir para esse fenômeno, nossos dados sugerem haver maior participação dos receptores Y5.

Conforme descrito na literatura, nós confirmamos que os receptores Y5 participam do controle da ingestão alimentar em condições basais e o seu bloqueio promove redução no consumo alimentar e na massa corporal. A redução na concentração sérica de hormônios tireoideanos nessa condição foi, provavelmente, resultado da perda de massa corporal e não um efeito primário do bloqueio dos receptores Y5. Já o bloqueio de receptores Y1 não modificou o consumo de ração, mas promoveu alteração motora caracterizando um tipo de convulsão (*barrel rolling*), possivelmente por ação em áreas talâmicas.

Durante a realimentação, a captação tireoideana de iodeto aumenta já na primeira hora, sendo esse efeito, pelo menos em parte, resultante da ativação do eixo HHT. Embora a concentração sérica de tiroxina aumente gradualmente até 6 horas de realimentação, as concentrações de tireotrofina e triiodotironina sofrem intensa redução após 3 horas, podendo este fenômeno resultar de alterações circadianas normais.

A secreção de TSH nas 3 primeiras horas de realimentação relaciona-se com o total de alimento ingerido no período e, portanto, a ativação do eixo HHT pode envolver a participação de hormônios do trato gastrointestinal, como o PYY₃₋₃₆, um agonista de receptores Y2. De fato, a concentração sérica de PYY aumenta já na primeira hora, mas nossos dados não permitem elucidar o mecanismo através do qual ele exerceria esse efeito. De qualquer forma, esse hormônio não foi capaz de estimular

a secreção de TSH por adenohipófise isoladas de ratos em jejum, ou após sua administração central. Portanto, é possível que seu efeito envolva a ativação de aferências vagais.

Embora a leptina e a corticosterona pudessem estar envolvidas na ativação do eixo HHT durante a realimentação, nossos dados não apoiam essa hipótese. Afinal, não houve modificação significativa na concentração sérica desses hormônios durante a realimentação.

Assim sendo, podemos concluir que os receptores Y5, além de participarem do controle da ingestão de alimento em condições basais, também apresentam importante papel no controle da atividade tireoideana em condição de intenso catabolismo, como no jejum. A mudança do estado catabólico para uma condição anabólica representa um estímulo à atividade tireoideana, envolvendo a rápida ativação do eixo HHT que ocorre simultaneamente ao incremento na concentração sérica de PYY.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, C.R., MONTEIRO, M., SMALL, C.J., SAJEDI, A., SIMTH, K.L., PARKINSON, J.R.C., GHATEI, M.A., BLOOM, S.R. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY3-36 and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. **Brain Res**, v.1044, p.127-131, 2005.
- ABEL, E.D., BOERS, M.E., PAZOS-MOURA, C., MOURA, E., KAULBACH, H., ZAKARIA, M., LOWELL, B., RADOVICK, S., LIBERMAN, M.C., WONDISFORD, F.E. Divergent roles for thyroid hormone receptor β isoforms in the endocrine axis and auditory system. **J Clin Invest**, v.104, p.291-300, 1999.
- ABEL, E.D., AHIMA, R.S., BOERS, M.E., ELMQUIST, J.K., WONDISFORD, F.E. Critical role for thyroid hormone receptor β_2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. **J Clin Invest**, v.107, p.1017-1023, 2001.
- ABEL, E.D., MOURA, E.G., AHIMA, R.S., CAMPOS-BARROS, A., PAZOS-MOURA, C.C., BOERS, M.E., KAULBACH, H.C., FORRESTER, D., WONDISFORD, F.E. Dominant inhibition of thyroid hormone action selectively in the pituitary of thyroid hormone receptor-beta null mice abolishes the regulation of thyrotropin by thyroid hormone. **Mol Endocrinol**, v.17, p.1767-1776, 2003.
- ACUNA-GOYCOLEA, C., TAMAMAKI, N., YANAGAWA, Y., OBATA, K., VAN DEN POL, N.A. Mechanisms of neuropeptide γ , peptide yy, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing gaba neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus. **J Neuroscience**, v.25, n.32, p.7406-7419, 2005.
- AIZAWA, T., GREER, M.A. Delineation of the hypothalamic area controlling thyrotropin secretion in the rat. **Endocrinology**, v.109, n.5, p.1731-1738, 1981.
- ANINI, Y., FU-CHENG, X., CUBER, J.C., KERVRAN, A., CHARIOT, J., ROZÉ, C. Comparison of the postprandial release of peptide YY and proglucagon-derived peptides in the rat. **Pflügers Arch**, v.438, p.299-306, 1999.
- ASCHNER, B. Ueber die funktion der hypophysye. **Pfleuger's Arch Ges Physiol**, v.146, p.1-146, 1912.
- ASTAPOVA I, LEE LJ, MORALES C, TAUBER S, BILBAN M, HOLLENBERG AN. The nuclear corepressor, NCoR, regulates thyroid hormone action in vivo. **PNAS**, v.105, p. 19544-19549, 2008.
- BATTERHAM, R.L., COWLEY, M.A., SMALL, C.J., HERZOG, H., COHEN, M.A., DAKIN, C.L., WREN, A.M., BRYNES, A.E., LOW, M.J., GHATEI, M.A., CONE, R.D., BLOOM, S.R. Gut hormone PYY93-360 physiologically inhibits food intake. **Nature**, v.418, p. 650-654, 2002.
- BECK, B., JHANWAR-UNIYAL, M., BURLET, A., CHAPLEUS-CHATEAU, M., LEIBOWITZ, S.F., BURLET, C. Rapid and localized alteration of neuropeptide Y in discrete hypothalamic nuclei with feeding status. **Brain Res**, v.528, p.245-249, 1990.

BLAKE NG, ECKLAND DJA, FOSTER OJF, LIGHTMAN SL. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. **Endocrinology**, v.129, p.2714-2718, 1991.

BOELEN, A., KWAKKEL, J., VOS, X.G., WIERSINGA, W.M., 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**, v.190, p. 537-544, 2006.

BOWERS, C.R., REDDING, T.W., SCHALLY, A.V. Effect of thyrotropin releasing factor (TRF) of ovine, bovine, porcine and human origin on thyrotropin release in vitro and in vivo. **Endocrinology**, v.77, n.4, p.609-616, 1965.

BOWERS, C.Y., SCHALLY, A.V., REYNOLDS, G.A., HAWLEY, W.D. Interaction of L-thyroxine or L-triiodothyronine and thyrotropin-releasing factor on the release and synthesis of thyrotropin from the anterior pituitary gland of mice. **Endocrinology**, v.81, n. 4, p.741-747, 1967.

BROBERG, C. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. **Brain Res**, v.848, p. 101-113, 1999.

BROBERGER, C., VISSER, T.J., KUCHAR, M.J., HÖKFELT, T. Neuropeptide Y innervation and neuropeptide-Y-Y1-receptor-expressing neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of the mouse. **Neuroendocrinology**, v.70, p.295-305, 1999.

CAMPBELL, G.A., KURCZ, M., MARSHALL, S., MEITES, J. Effects of starvation in rats on serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, thyrotropin, growth hormone and prolactin; Response to LH-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v.100, p.580-587, 1977.

CAMPBELL, H.J., GEORGE, R., HARRIS, G.W. The acute effects of injection of thyrotrophic hormone or of electrical stimulation of the hypothalamus on thyroid activity. **J Physiol**, v.152, p.527-544, 1960.

CAMPBELL, R.E., FRENCH-MULLEN, J.M., COWLEY, M.A., SMITH, M.S., GROVE, K.L. Hypothalamic circuitry of neuropeptide Y regulation of neuroendocrine function and food intake via Y5 receptor subtype. **Neuroendocrinology**, v.74, p.106-119, 2001.

CARR, F.E., GALLOWAY, R.J., REID, A.H., KASEEM, L.L., DHILLON, G., FEIN H.G., SMALLRIDGE, R.C. Thyrotropin-releasing hormone regulation of thyrotropin beta-subunit gene expression involves intracellular calcium and protein kinase C. **Biochemistry**, v.30, p.3721-3728, 1991.

CHALLIS, B.G., PINNOCK, S.B., COLL, A.P., CARTER, R.N., DICKSON, S.L., O'RAHILLY, S. Acute effects of PYY3-36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse. **Biochem Biophysical Res Comm**, v.311, p.915-919, 2003.

CHIN, W.W., SHUPNIK, M.A., ROSS, D.S., HABENER, J.F., RIDGWAY, E.C. Regulation of the α and β thyrotropin subunit messenger ribonucleic acids by thyroid hormones. **Endocrinology**, v.116, p.873-878, 1985.

CONNORS, J.M., DEVITO, W.J., HEDGE, G.A. Effects of food deprivation on the feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of the rat. **Endocrinology**, v.117, n.3, p.900-906, 1985.

COPPOLA, A., MELI, R., DIANO, S. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. **Endocrinology**, v.146, p. 2827-2833, 2005.

CRISCIONE, L., RIGOLLIER, P., BATZL-HARTMANN, C., RÜEGER, H., STRICKER-KROGRAD, A., WYSS, P., BRUNNER, L., WHITEBREAD, S., YAMAGUCHI, Y., GERALD, C., HEURICH, R.O., WALKER, M.W., CHIESI, M., SCHILLING, W., HOFBAUER, K.G., LEVENS, N. **J Clin Invest**, v.102, p.2136-2145, 1998.

CROXSON, M.S., HALL, T.D., KLETZKY, O.A., JARAMILLO, J.E., NICOLOFF, J.T. Decreased serum thyrotropin induced by fasting. **J Clin Endocrinol Metab**, v.45, p. 560-568, 1977.

D'ANGELO, S.A., SNYDER, J. Electrical stimulation of the hypothalamus and TSH secretion in the rat. **Endocrinology**, v.73, p.75-80, 1963.

DA VEIGA, M.A.L.C., FONSECA, BLOISE F., COSTA-E-SOUSA, R.H., SOUZA, L.L., ALMEIDA, N.A.S, JESUS, K.J., PAZOS-MOURA, C.C. Acute effects of endocannabinoid anandamide and CB1 receptor antagonist AM251 in the regulation of thyrotropin secretion. **J Endocrinol**, v.199, n.2, p.235-242, 2008.

DIANO, S., NAFTOLIN, F., GOGLIA, F., HORVATH, T.L. Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. **Endocrinology**, v.139, p.2879-2884, 1998.

DUHAULT, J., BOULANGER, M., CHAMORRO, S., BOUTIN, J.A., DELLA ZUANA, O., DOUILLET, E., FAUCHÈRE, J.L., FÉLÉTOU, M., GERMAIN, M., HUSSON, B., VEGA, A.M., RENARD, P., TISSERAND, F. Food intake regulation in rodents: Y5 or Y1 NPY receptors or both? **Can J Physiol Pharmacol**, v.78, p.173-185, 2000.

DUMONT, Y., FOURNIER, A., ST-PIERRE, S., QUIRION, R. Comparative characterization and autoradiographic distribution of neuropeptide Y receptor subtypes in the rat brain. **J Neuroscience**, v.13, n.1, p.73-86, 1993.

DURKIN, M.M., WALKER, M.W., SMITH, K.E., GUSTAFSON, E.L., GERALD, C., BRANCHEK, T.A. Expression of a novel neuropeptide Y receptor subtype involved in food intake: an in situ hybridization study of Y5 mRNA distribution in rat brain. **Exp Neurol**, v.165, p.90-100, 2000.

DYESS, E.M., SEGERSON, T.P., LIPOSITS, Z., PAULL, W.K., KAPLAN, M.M., WU, P., JACKSON, I.M.D., LECHAN, R.M. Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v.123, n.5, p.2291-2297, 1988.

EGAWA, M., YOSHIMATSU, H., BRAY, G.A. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. **Am J Physiol**, v.260, p.328-334, 1991.

ELIAS, C.F., LEE, C., KELLY, J., ASCHKENASI, C., AHIMA, R.S., COUCEYRO, P.R., KUHAR, M.J., SAPER, C.B., ELMQUIST, J.K. Leptin activates hypothalamic CART neurons projectin to the spinal cord. **Neuron**, v.21, p.1375-1385, 1998.

ELMQUIST, J.K., BJORBAECK, C., AHIMA, R.S., FLIER, J.S., SAPER, C.B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **J Comp Neurol**, v.395, p.535-547, 1998.

EVERSON, C.A., NOWAK, T.S. Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone mRNA response to hypothyroxinemia induced by sleep deprivation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.283, p.E85-E93, 2002.

FEKETE, C., KELLY, J., MIHÁLY, E., SARKAR, S., RAND, W.M., LÉGRÁDI, G., EMERSON, C.H., LECHAN, R.M. Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **Endocrinology**, v.142, p.2606-2613, 2001.

FEKETE, C., LECHAN, R.M. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: Role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. **Frontiers Neuroendocrinol**, v.28, p.97-114, 2007.

FEKETE, C., LÉGRÁDI, G., MIHÁLY, E., HUANG, Q.H., TATRO, J.B., RAND, W.M., EMERSON, C.H., LECHAN, R.M. α -Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. **J Neuroscience**, v.20, p.1550-1558, 2000a.

FEKETE, C., MARKS, D.L., SARKAR, S., EMERSON, C.H., RAND, W.M., CONE, R.D., LECHAN, R.M. Effect of agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. **Endocrinology**, v.145, p.4816-4821, 2004a.

FEKETE, C., MIHÁLY, E., LUO, L.G., KELLY, J., CLAUSEN, J.T., MAO, Q., RAND, W.M., MOSS, L.G., KUHAR, M., EMERSON, C.H., JACKSON, I.M., LECHAN, R.M. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. **J Neurosci**, v.20, p.9224-9234, 2000b.

FEKETE, C., SARKAR, S., RAND, W.M., HARNEY, J.W., EMERSON, C.H., BIANCO, A.C., BECK-SICKINGER, A., LECHAN, R.M. Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **Endocrinology**, v.143, n.12, p.4513-4519, 2002a.

FEKETE, C., SARKAR, S., RAND, W.M., HARNEY, J.W., EMERSON, C.H., BIANCO, A.C., LECHAN, R.M. Agouti-related protein (AgRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; Comparisons between the effect of AgRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPY axis. **Endocrinology**, v.143, p. 3846-3853, 2002c.

FEKETE, C., SINGRU, P.S., SANCHEZ, E., SARKAR, S., CHRISTOFFOLETE, M.A., RIBEIRO, R.S., RAND, W.M., EMERSON, C.H., BIANCO, A.C., LECHAN, R.M. Differential effects of central leptin, insulin or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus. **Endocrinology**, v.147, p.520-529, 2006.

FEKETE, C., WITTMANN, G., LIPOSITS, Z., LECHAN, R.M. GABA-ergic innervation of thyrotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. **Brain Res**, v.957, p.251-258, 2002b.

FEKETE, C., WITTMANN, G., LIPOSITS, Z., LECHAN, R.M. Origin of cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART)-immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus. **J Comp Neurol.**, v.469, p.340-350, 2004b

FERREIRA, A.C.F., LIMA, L.P., ARAÚJO, R.L., MÜLLER, G., ROCHA, R.P., ROSENTHAL, D., CARVALHO, D.P. Rapid regulation of thyroid sodium-iodide symporter activity by thyrotropin and iodine. **J. Endocrinol**, v.184, n.1, p.69-76, 2005.

FU-CHENG, X., ANINI, Y., CHARIOT, J., CASTEX, N., GALMICHE, J.P., ROZÉ, C. Mechanisms of peptide YY release induced by an intraduodenal meal in rats: neural regulation by proximal gut. **Pflügers Arch**, v.433, p.571-579, 1997.

GREER, M.A. Evidence of hypothalamic control of the pituitary release of thyrotropin. **Pro Soc Exp Biol Med**, v.77, n.4, p.603-608, 1951.

GREER, M.A., ERWIN, H.L. Evidence of separated hypothalamic centers controlling corticotropin and thyrotropin secretion by the pituitary. **Endocrinology**, v.58, n.5, p. 665-670, 1956.

GROSSIE, J.A., TURNER, C.W. Thyroxin secretion rates during food restriction in rats. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.110, p.613, 1962.

HARRIS, A.R., FANG, S.L., AZIZI, F., LIPWORTH, L., VAGENAKIS, A.G., BARVERMAN, L.E. Effect of starvation on hypothalamic-pituitary-thyroid function in the rat. **Metabolism**, v.27, n.9, p.1074-1083, 1978.

HARRIS, M., ASCHKENASI, C., ELIAS, C.F., CHANDRANKUNNEL, A., NILLNI, E.A., BJORBAEK, C., ELMQUIST, J.K., FLIER, J.S., HOLLENBERG, A.N. Transcriptional

regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. **J Clin Invest**, v.107, p.111-120, 2001.

HERZOG, H., HORT, Y.J., BALL, H.J., HAYES, G., SHINE, J., SELBIE, L.A. Cloned human neuropeptide Y receptor couples to two different second messenger systems. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.89, p.5794-5798, 1992.

HOLLENBERG, A.N. The role of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuron as a metabolic sensor. **Thyroid**, v.18, p.131-139, 2008.

HOLLENBERG, A.N., MONDEN, T., FLYNN, T.R., BOERS, M.E., COHEN, O., WONDISFORD, F.E. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. **Mol Endocrinol**, v.9, p.540-550, 1995.

HUGUES, J.N., BURGER, A.G., GROUSELLE, D., VOIROL, M.J., CHABERT, P., MODIGLIANI, E., SEBAOUN, J. Evidence of a thyrotropin-releasing hormone independent increase in plasma thyrotropin during refeeding of starved rats. **Endocrinology**, v.112, p.715-719, 1983.

HUO, L., MÜNZBERG, H., NILLNI, E.A., BJØRBÆK, C. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic trh gene expression by leptin. **Endocrinology**, v.145, p.2516-2523, 2004)

HWA, J.J., WITTEN, M.B., WILLIAMS, P., GHIBAUDI, L., GAO, J., SALISBURY BG, MULLINS D, HAMMUD F, STRADER CD, PARKER EM. Activation of the NPY Y5 receptor regulates both feeding and energy expenditure. **Am J Physiol**, v.277, p.R1428-1434, 1999.

ISHIKAWA, K., KAKEGAWA, T., SUZUKI, M. Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in the secretion of thyrotropin under adrenergic and cold-stimulated conditions in the rat. **Endocrinology**, v.114, p.352-358, 1984.

ISSE, T., UETA, Y., SERINO, R., NOGUCHI, J., YAMAMOTO, Y., NOMURA, M., SHIBUYA, I., LIGHTMAN, S.L., YAMASHITA, H. Effects of leptin on fasting induced inhibition of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. **Brain Res**, v.846, p.229-235, 1999.

JING, E., NILLNI, E.A., SÁNCHEZ, V.C., STUART, R.C., GOOD, D.J. Deletion of the Nhlh2 transcription factor decreases the levels of the anorexigenic peptides alpha melanocyte-stimulating hormone and thyrotropin-releasing hormone and implicates prohormone convertases I and II in obesity. **Endocrinology**, v.145, p.1503-1513, 2004.

JOSEPH-BRAVO, P., URIBE, R.M., VARGAS, M.A., PÉREZ-MARTÍNEZ, L., ZOELLER, T., CHARLI, J.L. Multifactorial modulation of TRH metabolism. **Cell Mol Neurobiol**, v.18, n.2, p.231-247, 1998.

KALSBECK, A., FLIERS, E., FRANKE, N., WORTEL, J., BUIJS, R.M. Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by

lesioning and viral tracing techniques in the rat. **Endocrinology**, v.141, p.3832-3841, 2000.

KASK, A., RÄGO, L., HARRO, J. Evidence for involvement of neuropeptide Y receptors in the regulation of food intake: studies with Y1-selective antagonist BIBP3226. **Br J Pharmacol**, v.124, p.1507-1515, 1998.

KASK, A., VASAR, E., HEIDMETS, L.T., ALLIKMETS, L., WIKBERG, J.E. Neuropeptide Y Y (5) receptor antagonist CGP71683A: the effects on food intake and anxiety-related behavior in the rat. **Eur J Pharmacol**, v.414, p.215-224, 2001.

KINLAW, W.B. SCWARTZ, H.L., OPPENHEIMER, J.H. Decreased serum triiodothyronine in starving rats is due primarily to diminished thyroidal secretion of thyroxine. **J Clin Invest**, v.75, p.1238-1241, 1985.

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

KODA, S., DATE, Y., MURAKAMI, N., SHIMBARA, T., HANADA, T., TOSHINAI, K., NIIJIMA, A., FURUYA, M., INOMATA, N., OSUYE, K., NAKAZATO, M. The role of the vagal nerve in peripheral PYY₃₋₃₆ induced feeding reduction in rats. **Endocrinology**, v. 146, n.5, p.2369-2375, 2005.

KOIBUCHI, N., GIBBS, R.B., SUZUKI, M., PFAFF, D.W. Thyroidectomy induces Fos-like immunoreactivity within thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons located in the paraventricular nucleus of the adult rat hypothalamus. **Endocrinology**, v.129, n.6, p. 3208-3216, 1991.

KRULICH, L., GIACHETTI, A., MARCHLEWSKA-KOJ, A., HEFCO, E., JAMESON, H.E. On the role of the central noradrenergic and dopaminergic systems in the regulation of TSH secretion in the rat. **Endocrinology**, v.100, p.496-505, 1977.

LANGLOIS, M.F., ZANGER, K., MONDEN, T., SAFER, J.D., HOLLENBERG, A.N., WONDISFORD, F.E. A unique role of the β 2 thyroid hormone receptor in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. **J Biol Chem**, v.40, p.24927-24933, 1997.

LECHAN, R.M., FEKETE, C. Role of melanocortin signaling in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Peptides*, v.27, p.310-325, 2006a.

LECHAN, R.M., FEKETE, C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. **Prog Brain Res**, v.153, p.209-235, 2006b.

LECHAN, R.M., JACKSON, I.M.D. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. **Endocrinology**, v.111, n.1, p. 55-65, 1982.

LEE, J.Y., LEE, J.H., KIM, D.G., JAHNG, J.W. Dexamethasone blocks the refeeding-induced phosphorylation of cAMP response element-binding protein in the rat hypothalamus. **Neurosci Lett**, v.344, p.107-111, 2003.

LEE, S.L., STEWART, K., GOODMAN, R.H. Structure of the gene encoding rat thyrotropin-releasing hormone. **J Biol Chem**, v.263, p.16604-16609, 1988.

LÉGRÁDI, G., EMERSON, C.H., AHIMA, R.S., FLIER, J.S., LECHAN, R.M. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v.138, p.2569-2576, 1997.

LÉGRÁDI, G., EMERSON, C.H., AHIMA, R.S., RAND, W.M., FLIER, J.S., LECHAN, R.M. Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of proTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Neuroendocrinology**, v.68, p.89-97, 1998.

LÉGRÁDI, G., LECHAN, R.M. The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v.139, p.3262-3270, 1998.

LÉGRÁDI, G., LECHAN, R.M. Agouti-related protein containing nerve terminal innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v.140, p.3643-3652, 1999.

LEMKEY-JOHNSTON, N., REYNOLDS, W.A. Nature and extent of brain lesions in mice related to ingestion of monosodium glutamate. **J Neuropathol Exp Neurol**, v.33, p.74-97, 1974.

LISBOA, P.C., PASSOS, M.C., DUTRA, S.C., SANTOS, R.S., BONOMO, I.T., CABANELAS, A.P., PAZOS-MOURA, C.C., MOURA, E.G. Increased 5'-iodothyronine deiodinase activity is a maternal adaptive mechanism in response to protein restriction during lactation. **J Endocrinol**, v.177, p.261-267, 2003.

MARTIN, J.B., BOSHANS, R., REICHLIN, S. Feedback regulation of TSH secretion in rats with hypothalamic lesions. **Endocrinology**, v.87, p.1032-1040, 1970.

MATSUDA, K., GREER, M.A., DUYCK, C. Neural control of thyrotropin secretion: effect of forebrain removal on thyroid function. **Endocrinology**, v.73, p.462-466, 1963.

MIHÁLY, E., FEKETE, C., LÉGRÁDI, G., LECHAN, R.M. Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. **Brain Res**, v.891, p.20-31, 2001.

MIHÁLY, E., FEKETE, C., TATRO, J.B., LIPOSITS, Z., STOPA, E.G., LECHAN, R.M. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the human hypothalamus are innervated by neuropeptide Y, agouti-related protein, and α -melanocyte-stimulating hormone. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, p.2596-2603, 2000.

- MIZUNO, T.M., MOBBS, C.V. Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. **Endocrinology**, v.140, p.814-817, 1999.
- MOREIRA, A.C., VALENÇA, M.M., MCCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Evolução dos conceitos em neuroendocrinologia. *In*: ANTUNES-RODRIGUES, J., MOREIRA, A.C., ELIAS, L.L.K., CASTRO, M. **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.1, p.1-8, 2005.
- MORGAN, D.G., SMALL, C.J., ABUSNANA, S., TURTON, M., GUNN, I., HEATH, M., ROSSI, M., GOLDSTONE, A.P., O'SHEA, D., MEERAN, K., GHATEI, M., SMITH, D.M., BLOOM, S. The NPY Y1 receptor antagonist BIBP 3226 blocks NPY induced feeding via a non-specific mechanism. **Regul Pept**, v.25, p.377-382, 1998.
- MORI, M., MICHIMATA, T., YAMADA, M., YAMAGUCHI, M., IRIUCHIJIMA, T., KOBAYACHI, S. Food deprivation decreases blood TRH concentration in the rat. **Exp Clin Endocrinol**, v.91, n.1, p.97-104, 1988.
- MOURA, E.G., RAMOS, C.F., NASCIMENTO, C.C.A., ROSENTHAL, D., BREITENBACH, M.M.D. Thyroid function in fasting rats: Variations in ¹³¹I uptake and transient decrease in peroxidase activity. **Braz J Med Biol Res**, v.20, p.407-410, 1987.
- NIKRODHANOND, A.A., ORTIGA-CARVALHO, T.M., SHIBUSAWA, N., HASHIMOTO, K., LIAO, X.H., REFETTOFF, S., YAMADA, M., MORI, M., WONDISFORD, F.E. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. **J Biol Chem**, v.281, n.8, p.5000-5007, 2006.
- NILLNI, E.A., VASLET, C., HARRIS, M., HOLLENBERG, A., BJORBAEK, C., FLIER, J.S. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. **J Biol Chem**, v.275, p.36124-36133, 2000.
- NILLNI, E.A. Regulation of hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. **Front Neuroendocrinol**, 2010 (in press).
- NUNES, M.T. Regulação neuroendócrina da função tireoideana. *In*: ANTUNES-RODRIGUES, J., MOREIRA, A.C., ELIAS, L.L.K., CASTRO, M. **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.17, p.249-261, 2005.
- OLIVEIRA, K.J., PAULA, G.S.M., COSTA-E-SOUSA, R.H., SOUZA, L.L., MORAES, D.C., CURTY, F.H., PAZOS-MOURA, C.C. Peptide YY (PYY)₃₋₃₆ modulates thyrotropin secretion in rats. **J Endocrinol**, v.191, p.459-463, 2006.
- ORTIGA-CARVALHO, T.M., OLIVEIRA, K.J., SOARES, B.A., PAZOS-MOURA, C.C. The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: in vivo and in vivo studies. **J Endocrinol**, v.174, p.121-125, 2002.
- ORTIGA-CARVALHO, T.M., POLAK, J., MCCANN, S.M., PAZOS-MOURA, C.C. Effect of thyroid hormone on pituitary neuromedin B and possible interaction between thyroid

hormones and neuromedin B on thyrotropin secretion. **Regulatory Peptides**, v.67, p. 47-53, 1996.

PALOU, M., SÁNCHEZ, J., RODRÍGUES, A.M., PRIEGO, T., PICÓ, C., PALOU, A. Induction of NPY/AgRP orexigênic peptide expression in rat hypothalamus is an early event in fasting: Relationship with circulating leptin, insulin and glucose. **Cell Physiol Biochem**, v.23, p.115-124, 2009.

PARMENTIER, M., LIBERT, F., MAENHAUT, C., LEFORT, A., GERARD, C., PERRET, J., VAN-SANDE, J., DUMONT, J.E., VASSART, G. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. **Science**, v.246, p.1620-1622, 1989.

PASTAN, I., ROTH, J., MACCHIA, V. Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.56, p.1802-1809, 1966.

PAZOS-MOURA, C.C., MOURA, E.G., DORRIS, M.L., REHNMARK, S., MELENDEZ, L., SILVA, J.E., TAUROG, A. Effect of iodine deficiency and cold exposure on thyroxine 5'-deiodinase activity in various rat tissue. **Am J Physiol**, v.260, p.E175-182, 1991.

PERELLO, M., FRIEDMAN, T., PAEZ-ESPINOSA, V., SHEN, X., STUART, R.C., NILLNI, E.A. Thyroid hormone selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Endocrinology**, v.147, p.2705-2716, 2006.

POLIDORI, C., CICCOCIOPPO, R., REGOLI, D., MASSI, M. Neuropeptide Y receptor(s) mediating feeding in the rat: characterization with antagonists. **Peptides**, v.21, p.29-35, 2000.

REDDING, T.W., SCHALLY, A.V. Depletion of pituitary thyrotropic hormone by thyrotropin releasing factor. **Endocrinology**, v.81, n.4, p.918-921, 1967.

ROTHWELL, N.J., SAVILLE, M.E., STOCK, M.J. Sympathetic and thyroid influences on metabolic rate in fed, fasted and refed rats. **Am J Physiol**, v.243, p.R339-346, 1982.

ROTHWELL, N.J., SAVILLE, M.E., STOCK, M.J. Metabolic response to fasting and refeeding in lean and genetically obese rats. **Am J Physiol**, v.244, p.R615-620, 1983.

SÁNCHEZ, E., VARGAS, M.A., SINGRU, P.S., PASCUAL, I., FIDELIA, R., FEKETE, C., CHARLI, J.L., LECHAN, R.M. Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. **Endocrinology**, v.150, p.2283-2291, 2009.

SARKAR, S., LECHAN, R.M. Central administration of neuropeptide Y reduces alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein (CREB) phosphorylation in pro-thyrotropin-releasing hormone neurons and increases CREB phosphorylation in corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Endocrinology**, v.144, p.281-291, 2003.

SCHALLY, A.V., BOWERS, C.Y., REDDING, T.W. Presence of thyrotropic hormone-releasing factor (TRF) in porcine hypothalamus. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.121, n.3, p. 718-722, 1966a.

SCHALLY, A.V., BOWERS, C.Y., REDDING, T.W. Purification of thyrotropic hormone-releasing factor from bovine hypothalamus. **Endocrinology**, v.78, n.4, p.726-732, 1966b.

SCHANER, P., TODD, R.B., SIDAHA, N.G., NILLNI, E.A. Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases. **J Biol Chem**, v.272, p. 19958-19968, 1997.

SHIBUSAWA, N., HOLLENBERG, A.N., WONDISFORD, F.E. Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. **J Biol Chem**, v. 278, p.732-738, 2003.

SCHREIBER, V., KOČI, J., ECKERTOVA, A., FRANČ, Z., KMENTOVA, V. The hypothalamus factor activating adenylylating acid phosphatases and TSH release in vitro: further purification by high-voltage electrophoresis. **Physiol Bohemoslov**, n.10, p. 417-426, 1961.

SCHREIBER, V., RYBAK, M., ECKERTOVA, A., KOČI, J., JIRGL, V., FRANČ, Z., KMENTOVA, V. Isolation of a hypothalamic peptide with TRF (thyrotrophin releasing factor) activity in vitro. **Experientia**, v.18, p.338-340, 1962.

SCHREIBER, V., ECKERTOVA, A., FRANČ, Z., RYBAK, M., GREGOROVA, I., KMENTOVA, V., JIRGL, V. Purification of the hypothalamic thyrotrophin-releasing factor. **Physiol Bohemoslov**, v.12, p.1-14, 1963.

SEOANE, L.M., CARRO, E., TOVAR, S., CASANUEVA, F.F., DIEGUEZ, C. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. **Reg Peptides**, v.92, p.25-29, 2000.

SHUPNIK, M.A., CHIN, W.W., HABENER, J.F., RIDGWAY, E.C. Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. **J Biol Chem**, v.260, p. 2900-2903, 1985.

SHUPNIK, M.A., RIDGWAY, E.C. Triiodothyronine rapidly decreases transcription of the thyrotropin subunit genes in thyrotropic tumor explants. **Endocrinology**, v.117, p. 1940-1946, 1985.

SINGRU, P.S., SÁNCHEZ, E., FEKETE, C., LECHAN, R.M. Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety. **Endocrinology**, v.148, p. 638-646, 2007.

SUGRUE, M.L., VELLA, K.R., MORALES, C., LOPEZ, M.E., HOLLENBERG, A.N. The thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone at the level of transcription in vivo. **Endocrinology**, v.151, p.793-801, 2010.

SUN, Y., LU, X., GERSHENGORN, M.C. Thyrotropin-releasing hormone receptors: similarities and differences. **J Mol Endocrinol**, v.30, p.87-97, 2003.

SUN, Y., ZUPAN, B., RAAKA, B., TOTH, M., GERSHENGORN, M. TRH-receptor-type-2-deficient mice are euthyroid and exhibit increased depression and reduced anxiety phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, v.34, p.1601-1608, 2009.

SZABO, M., FROHMAN, L.A. Suppression of cold-stimulated thyrotropin secretion by antiserum to thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, v.101, p.1023-1033, 1977.

SZKUDLINSKI, M.W., FREMONT, V., RONIN, C., WEINTRAUB, B.D. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev*, v.82, p.473-502, 2002.

TAGAMI, T., MADISON, L.D., NAGAYA, T., JAMESO, J.L. Nuclear receptor corepressor activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol Cell Biology*, v.17, p.2642-2648, 1997.

TANG-CHRISTENSEN, M., KRISTENSEN, P., STIDSEN, C.E., BRAND, C.L. Central administration of Y5 receptor antisense decreases spontaneous food intake and attenuates feeding in response to exogenous neuropeptide Y. *J Endocrinol*, v.159, p.307-312, 1998.

TAYLOR, T., WONDISFORD, F.E., BLAINE, T., WEINTRAUB, B.D. The paraventricular nucleus of the hypothalamus has a major role in thyroid hormone feedback regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Endocrinology*, v.126, n.1, p.317-324, 1990.

TEPPERMAN, J. O sistema neuro-hipofisário. In: TEPPERMAN J. **Fisiologia endócrina e metabólica**. 3^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.4, p.38-68, 1977a.

TEPPERMAN, J. Tireóide. In: TEPPERMAN J. **Fisiologia endócrina e metabólica**. 3^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.7, p.114-135, 1977b.

TIMOFEEVA, E., BARABOI, E.D., RICHARD, D. Contribution of the vagus nerve and lamina terminalis to brain activation induced by refeeding. *Eur J Neurosc*, v.22, p.1489-1501, 2005.

TONI, R., JACKSON, I.M.D., LECHAN, R.M. Neuropeptide-Y-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, v.126, p.2444-2453, 1990.

TU, H.M., KIM, S.W., SALVATORE, D., BARTHA, G., LEGRADI, P.R., LARSEN, R.M., LECHAN, R.M. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*, v.138, p.3359-3368, 1997.

UHLENHUTH, E. The anterior lobe of the hypophysis as a control mechanism of the function of the thyroid gland. *Br J Exp Biol*, v.5, p.1-5, 1927.

VAN SANDE, J., DEQUANTER, D., LOTHAIRE, P., MASSART, C., DUMONT, J.E., ERNEUX, C. Thyrotropin stimulates the generation of inositol 1,4,5-triphosphate in human thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab*, v.91, p.1099-1107, 2006.

VELLA, K.R., HOLLENBERG, A.N. The ups and downs of thyrotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, v.150, p.2021-2023, 2009.

VELLA, K.R., BURNSIDE, A.S., BRENNAN, K.M., GOOD, D.J. Expression of the hypothalamic transcription factor Nhlh2 is dependent on energy availability. **J Neuroendocrinol**, v.19, p.499-510, 2007.

WALTER, M.J., SCHERRER, J.F., FLOOD, J.F., MORLEY, J.E. Effects of localized injections of neuropeptide Y antibody on motor activity and other behaviors. **Peptides**, v.15, p.607-613, 1994.

WITTMANN, G., LIPOSITS, Z., LECHAN, R.M., FEKETE, C. Medullary adrenergic neurons contribute to the neuropeptide Y-ergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone synthesizing-neurons in the rat. **Neurosc Lett**, v.324, p. 69-73, 2002.

WITTMANN, G., LIPOSITS, Z., LECHAN, R.M., FEKETE, C. Medullary adrenergic neurons contribute to the cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. **Brain Res**, v.1006, p.1-7, 2004.

WOLAK, M.L., DEJOSEPH, M.R., CATOR, A.D., MOKASHI, A.S., BROWNFIELD, M.S., URBAN, J.H. Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in the rat brain by using immunohistochemistry. **J Comp Neurol**, v.464, p.285, 2003.

WU, S.Y. The effect of fasting on thyroidal T4-5' monodeiodinating activity in mice. **Acta Endocrinologica**, v.122, p.175-180, 1990.

YAMADA T. Studies on the mechanism of hypothalamic control of thyrotropin secretion: comparison of the sensitivity of the hypothalamus and the pituitary to local changes of thyroid hormone concentration. **Endocrinology**, v.65, p.920-925, 1959.

YAMADA T, GREER MA. Studies on the mechanism of hypothalamic control of thyrotropin secretion: effect of thyroxine injection into hypothalamus or the pituitary on thyroid hormone release. **Endocrinology**, v.64, n.4, p.559-566, 1959.

YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiol Rev**, v. 81, p.1097-1142, 2001.

YEN, Y.M., DISTEFANO, J.J., YAMADA, H., NGUYEN, T.T. Direct measurement of whole body thyroid hormone pool sizes and interconversion rates in fasted rats: Hormone regulation implication. **Endocrinology**, v.134, p.1700-1709, 1994.

YOUNG, J.B., BÜRGI-SAVILLE, M.E., BÜRGI, U., LANDSBERG, L. Sympathetic nervous system activity in rat thyroid: potential role in goitrogenesis. **Am J Physiol**, v.288, p.E861-867, 2005.

ZABAVNIK, J., ARTBUTHNOTT, G., EIDNE, K.A. Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in rat pituitary and brain. **Neuroscience**, v.53, p. 877-887, 1993.

ZENG, H., SCHIMPF, B.A., ROHDE, A.D., PAVLOVA, M.N., GRAGEROV, A., BERGMANN, J.E. Thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice display increased depression and anxiety-like behavior. **Mol Endocrinol**, v.21, p.2795-2804, 2007.

ZOELLER, R.T., KABEER, N., ALBERS, H.E. Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. **Endocrinology**, v.127, p. 2955-2962, 1990.

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](#)