



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO BIOMÉDICO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
POS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E  
EXPERIMENTAL - CLINEX

**EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA ADMINISTRAÇÃO  
AGUDA E CRÔNICA DE LEPTINA SOBRE O EIXO  
HIPÓFISE-TIREÓIDE E COMPOSIÇÃO  
CORPORAL DE RATOS ADULTOS  
EUTIREOIDEOS**

Elaine de Oliveira

Rio de Janeiro  
2005

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO BIOMÉDICO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
POS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E  
EXPERIMENTAL - CLINEX

**EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA ADMINISTRAÇÃO  
AGUDA E CRÔNICA DE LEPTINA SOBRE O EIXO  
HIPÓFISE-TIREÓIDE E COMPOSIÇÃO  
CORPORAL DE RATOS ADULTOS  
EUTIREOIDEOS**

Elaine de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e  
Experimental da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Rio de Janeiro  
2005

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Oliveira, Elaine**

Efeito *in vivo* e *in vitro* da administração aguda e crônica de leptina sobre o eixo hipófise-tireóide e composição corporal de ratos adultos eutireoideos / Elaine de Oliveira – 2005.

Orientadores: Patrícia Cristina Lisboa e Magna Cottini da Fonseca Passos.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,  
Faculdade de Ciências Médicas, Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia  
Clínica e Experimental.

1. leptina, tireóide, desiodase, composição corporal

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO BIOMÉDICO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
POS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E  
EXPERIMENTAL - CLINEX

**EFEITO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA ADMINISTRAÇÃO  
AGUDA E CRÔNICA DE LEPTINA SOBRE O EIXO  
HIPÓFISE-TIREÓIDE E COMPOSIÇÃO CORPORAL DE  
RATOS ADULTOS EUTIREOIDEOS**

Elaine de Oliveira

**ORIENTADORES**

**Dr<sup>a</sup>. Patrícia Cristina Lisboa**

Prof<sup>a</sup>. Visitante do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

**Dr<sup>a</sup>. Magna Cottini da Fonseca Passos**

Prof<sup>a</sup>. Adjunta do Departamento de Nutrição Aplicada do Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 05 de 2005, pela banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Cabanelas Pazos-Moura \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tamar Gomes Pinheiro Frankenfeld \_\_\_\_\_

Eliane Beraldi Ribeiro \_\_\_\_\_

Rio de Janeiro  
2005

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia Endócrina do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob orientação das Professoras Dr<sup>a</sup>. Patrícia Cristina Lisboa e Dr<sup>a</sup>. Magna Cottini da Fonseca Passos, com apoio financeiro concedido pela CAPES, CNPq e FAPERJ.

**PARA SER GRANDE. sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui  
Se todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha. porque alta vive**

**(Fernando Pessoa)**

**Meu agradecimento especial à Deus sem o qual  
não seria possível a realização deste trabalho.**

**Aos meus pais, minha eterna gratidão  
pelo apoio, compreensão e incentivo,  
dados desde os meus primeiros passos.**

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Patrícia Cristina Lisboa, pelo estímulo, orientação, paciência e dedicação constante, imprescindíveis na elaboração deste trabalho.

A professora Magna Cottini da Fonseca Passos pela amizade, orientação, credibilidade e dedicação.

Ao Professor Egberto Gaspar de Moura, pela confiança e orientação. Uma excelente referência como chefe, professor e pesquisador.

À Coordenação de Pós-Graduação em Fisiopatologia, pela oportunidade concedida na realização deste trabalho.

Ào professor Alex Christian Manhães pela manutenção da infra-estrutura do Departamento, permitindo que o nosso trabalho fosse executado de forma satisfatória.

Às amigas Aline Teixeira Silva Fagundes, Isabela Teixeira Bonomo, Fabiane Toste Cardoso, pelo apoio e incentivo, que sempre foram muito mais que colegas de trabalho.

À Fernanda Toste, Luciane Pires e Mabel Fraga pela recente amizade

À mestranda Ísis Hara, e aos doutorandos Gustavo Lopes, José Ricardo, Márcia Lins, Patrícia Dias de Brito, Sheila Dutra e Simone Bezerra e à doutora Regina Santos, pela convivência amigável e pela ajuda nos momentos críticos.

Aos alunos de Iniciação Científica: Aldir, Analaura, Bruna, Cristina, Joice, Laila, Luciana, Natália, Raquel e Viviane, sem as quais parte deste trabalho não teria sido realizada.

Aos funcionários técnico-administrativos do laboratório de Fisiologia Endócrina: Andréa, Henrique e Lauciene pela prontidão e colaboração.



# ÍNDICE

	<b>página</b>
Lista de quadros e tabelas	x
Lista de gráficos	xi
Lista de abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Abstract	xvi
Introdução	1
Leptina	3
Mecanismo de ação da leptina	5
Tireóide	7
Mecanismo de transporte de iodo	8
Hormônios tireóideanos (HTs)	10
Metabolismo desiodativo	11
Leptina e eixo hipotálamo-hipófise-tireóide	16
Leptina e metabolismo desiodativo	17
Leptina e glicocorticóides	19
Justificativa do presente estudo	19
Objetivos	21
Materiais e métodos	23
Resultados	32
Discussão	47
Conclusões	61
Referências Bibliográfica	63
Anexos	86

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadros</b>		<b>página</b>
Quadro 1	Leptinemia, captação de radioiodeto tireoideana, concentrações séricas de TSH e HTs das linhas de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Endócrina (UERJ)	20
Quadro 2	Resumo dos dados dos experimentos em ratos adultos tratados com dose única de leptina ou com dose crônica	46
<b>Tabelas</b>		<b>página</b>
Tabela 1	Resumo da metodologia para determinação da atividade D1 e D2 em ratos tratados com leptina.	29
Tabela 2	Concentrações séricas de leptina, HTs, TSH e corticosterona de ratos adultos submetidos ao tratamento agudo com leptina	35
Tabela 3	Concentrações séricas de leptina, HTs, TSH e corticosterona de ratos injetados cronicamente com leptina	41

## LISTA DE GRÁFICOS

	<b>página</b>
<b>Gráfico 1</b> PC e MGV de animais submetidos ao tratamento agudo com leptina (2 horas)	33
<b>Gráfico 2</b> Percentual de captação de 15 e 120 min de $^{125}\text{I}$ pelo tecido tireoideano de ratos controles. Captação tireoideana de $^{125}\text{I}$ após 15 e 120 min de administração nos animais submetidos ao tratamento agudo com leptina	34
<b>Gráfico 3</b> Atividade da enzima GPDm hepática de ratos adultos após 2 horas da administração de leptina	35
<b>Gráfico 4</b> Atividade D1 hepática, D2 do TAM, D1 e D2 muscular de ratos adultos após 2 horas da administração de leptina	36
<b>Gráfico 5</b> Ingestão de ração de ratos tratados cronicamente com leptina no primeiro dia de tratamento. Evolução da ingestão alimentar na terceira hora pós tratamento diário	37
<b>Gráfico 6</b> Evolução do PC de ratos submetidos ao tratamento crônico com leptina	38
<b>Gráfico 7</b> MGV de ratos tratados cronicamente com leptina	38
<b>Gráfico 8</b> Gordura, proteína e água corporais de ratos adultos tratados cronicamente com leptina	39
<b>Gráfico 9</b> Percentual de captação de 15 e 120 min de $^{125}\text{I}$ pelo tecido tireoideano de ratos controles. Captação de $^{125}\text{I}$ após 15 e 120 min de sua administração nos animais tratados cronicamente com leptina	40
<b>Gráfico 10</b> Atividade da enzima GPDm hepática de ratos adultos que receberam injeção crônica leptina	41
<b>Gráfico 11</b> Atividade D2 do TAM, D1 hepática, D1 e D2 muscular de ratos injetados cronicamente com leptina	42
<b>Gráfico 12</b> Captação <i>in vitro</i> de $^{125}\text{I}$ /g de tecido tireoideano de ratos tratados agudamente com leptina	43

<b>Gráfico 13</b>	Liberação de T3 e T4 para o meio de incubação de explantes tireoideanos de ratos tratados com dose única de leptina 2 horas antes do sacrifício	43
<b>Gráfico 14</b>	Captção “in vitro” de $^{125}\text{I}$ /g de tecido tireoideana de ratos tratados cronicamente com leptina	44
<b>Gráfico 15</b>	Secreção de T4 e T3 para o meio de incubação de explantes tireoideanos de ratos tratados com leptina durante 6 dias consecutivos	44
<b>Gráfico 16</b>	Captção de $^{125}\text{I}$ “in vitro” por tireoides de ratos adultos eutireoideos incubadas com leptina	45
<b>Gráfico 17</b>	MGV relacionada ao peso corporal de animais submetidos ao tratamento agudo com leptina	87
<b>Gráfico 18</b>	Peso tireoideano de animais após 2 h da injeção com leptina (experimento “in vivo”)	87
<b>Gráfico 19</b>	Ingestão de ração por 100g de PC de ratos tratados cronicamente com leptina	88
<b>Gráfico 20</b>	MGV relacionada ao PC de ratos tratados cronicamente com leptina	88
<b>Gráfico 21</b>	Peso tireoideano de ratos tratados cronicamente com leptina (experimento “in vivo”)	88
<b>Gráfico 22</b>	Peso tireoideano de ratos tratados agudamente com leptina (experimento “in vitro”)	89
<b>Gráfico 23</b>	Peso tireoideano de ratos tratados cronicamente com leptina (experimento “in vitro”)	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

A/min/mg ptn	absorbancia por minuto por miligrama de proteína
AgRP	Agouti related protein (proteína relacionada ao agouti)
AIT	transportador apical de iodeto
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -melanocortina
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
BSA	albumina bovina sérica
CART	fator de transcrição regulado por anfetamina e cocaína
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
cpm	contagem por minuto
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
DIT	diiodotirosina
D1	iodotironina desiodase tipo 1
D2	iodotironina desiodase tipo 2
D3	iodotironina desiodase tipo 3
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
FRTL-5	Fisher Rat Thyroid Line
GH	hormônio de crescimento
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HTs	hormônios tireoideanos
<sup>125</sup> I	radioisótopo de iodo
i.c.v	intracerebroventricular
IL-1 $\alpha$	interleucina-1 $\alpha$
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
IMC	índice de massa corporal
i.p.	intra-peritoneal
JAK	tirosina kinase janus kinase
Kda	kilodaltons
KCN	cianeto de potássio
MCH	hormônio concentrador de melanina
MC4R	receptores de melanocortina 4
MCT8	transportador de monocarboxilato 8
MEM	meio essencial mínimo
MGV	massa de gordura visceral
MIT	moniodotirosina
MMI	1-metil-2-mercaptoimidazole
GPDm	$\alpha$ -glicerol fosfato desidrogenase mitocondrial
NADPH	Nicotinamina Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NaOH	hidróxido de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NIS	simportador de Na <sup>+</sup> /I <sup>-</sup>
NPY	neuropeptídeo Y
ob/ob	camundongo transgênico com mutação no gene que codifica a leptina

Ob-R	receptor de leptina
PBS	tampão fosfato em salina
PC	peso corporal
PDE3B	Fosfodiesterase 3B
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinase
POMC	pró-ópiomelanocortina
PTH	paratohormônio
PTU	6-propil-2-tiouracil
PVN	núcleo paraventricular
RIE	radioimunoensaio
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucléico mensageiro
rpm	rotações por minuto
rT <sub>3</sub>	3-3'-5'- triiodotironina reversa
s.c.	subcutânea
SHP2	Src homology protein-tyrosine phosphatase 2
SNC	sistema nervoso central
SOCS-3	supressores de sinalização de citocinas 3
STAT	proteína de transdução de sinal e transcrição
T <sub>3</sub>	3,5,3'- triiodotironina
T <sub>4</sub>	3,5,3',5'- tetraiodotironina (tiroxina)
TAM	tecido adiposo marrom
TBG	globulina ligadora de tiroxina
TCA	ácido tricloroacético
Tg	tireoglobulina
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral $\alpha$
TOX	oxidase tireoideana
TPO	tireoperoxidase
TR	receptor para hormônios tireoideanos
TRE	elemento responsivo a hormônio tireoideano
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TSH	tireotrofina
TTR	transtirretina

## Resumo

São muitos e controversos os estudos a respeito da interação entre leptina e hormônios tireoideanos (HTs). Anteriormente observamos que a aplicação de leptina em ratas lactantes eleva a captação tireoideana de  $^{125}\text{I}$  nas mães durante a lactação. Já o tratamento dos filhotes com leptina no início da lactação programa um aumento de peso corporal (PC) e hiperleptinemia, contudo sem alterar a captação tireoideana na idade adulta. Neste trabalho investigamos o efeito “in vivo” da administração aguda e crônica de leptina em ratos adultos sobre a composição corporal, captação tireoideana, glicerofosfato desidrogenase mitocondrial (GPDm), desidases, HTs, TSH, leptina e corticosterona. Realizamos 2 estudos: 1) tratamento agudo (LepA): grupo tratado com dose única de leptina (8ug/100g PC/sc/2 horas); 2) tratamento crônico (LepC): grupo tratado com leptina (8ug/100g PC/sc/6 dias). Em cada experimento, paralelamente, utilizamos animais controles. Em um outro estudo, incubamos explantes tireoideanos de ratos adultos machos e fêmeas na presença de diferentes concentrações de leptina. O tratamento com leptina aguda ou crônica não modificou o PC dos animais. O grupo LepC apresentou redução de MGV e do conteúdo de gordura corporal, e aumento de massa magra corporal. Verificamos maior captação tireoideana “in vivo” de  $^{125}\text{I}$ , 15 minutos e 2 horas após injeção, no grupo LepC, embora esta não tenha se alterado no grupo LepA. Após ambos os tratamentos com leptina “in vivo”, as tireóides incubadas “in vitro”, apresentaram menor conteúdo tireoideano de  $^{125}\text{I}$ , assim como as tireóides incubadas com leptina “in vitro”. O grupo LepA apresentou aumento de HTs, TSH e corticosterona séricos. O grupo LepC apresentou diminuição de TSH intrahipofisário e hipercorticosteronemia. A atividade GPDm hepática foi menor apenas após a administração crônica com leptina. Os animais LepA apresentaram aumento da atividade D1 hepática, D1 e D2 muscular, e queda da D2 no TAM. Já nos animais LepC, detectamos somente maior atividade D1 hepática. Nossos dados sugerem que a hiperleptinemia aguda e crônica modula a função tireoideana, atuando diretamente sobre a atividade do NIS, além de atividade GPDm e desidase. Alterações rápidas da leptinemia produzem uma alteração da função tireoideana compatível com maior produção de T3, que pode ter um papel importante na sintonia fina da regulação da massa adiposa.

## Abstract

The association between leptin and thyroid hormones (TH) is still controversial. Previously, we showed that leptin treatment of lactating rats caused an increase in the thyroid  $^{125}\text{I}$  uptake during lactation. Leptin injection in the pups during the first 10 days of lactation programs higher body weight and hyperleptinaemia, without change thyroid uptake in the adulthood. The goal of the present work was evaluate the “in vivo” effects of acute and chronic leptin administration in adult Wistar rats on body composition and on several parameters of thyroid function (iodine uptake, mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase - mGPD and deiodinase activities), serum TH, TSH, leptin and corticosterone hormones. We carried out 2 studies: 1) Acute treatment (LepA): rats received a single injection of leptin (8ug/100g BW/sc/2 hours); 2) Chronic treatment (LepC): rats received the same leptin dose, daily, for 6 consecutive days. In parallel, we used control groups in both experiments. On another study, thyroid explants from adults male and female rats were incubated with distinct leptin concentrations. The body weight was not changed by leptin administration. LepC group had lower visceral fat mass and body fat content, and higher fat-free mass. We detected higher thyroid  $^{125}\text{I}$  uptake, 15 minutes or 2 hours after the “in vivo” injection, in LepC group. After both leptin “in vivo” treatment, “in vitro” incubated thyroid presented lower  $^{125}\text{I}$  content, as well as the thyroid glands incubated with leptin “in vitro”. The LepA animals showed an increase in serum TH, TSH and corticosterone concentrations. LepC group showed lower pituitary TSH and higher serum corticosterone. The mGPD activity was lower only on LepC group. The acute leptin treatment had a stimulatory action on liver D1, skeletal muscle D1 and D2, but an inhibitory action on BAT D2 activity. While the leptin chronic treatment was capable to increase only the hepatic D1 activity. The amount of our results suggest that acute and chronic leptin administration is capable to modulate directly the thyroid function, as well as, the peripheral thyroid hormone metabolism and action. Rapid changes in serum leptin produces changes on thyroid function compatible with a higher T3 production, whose may have an important role in adipose mass regulation.



## **Introdução**

Dentre os hormônios envolvidos na regulação do peso corporal e metabolismo, destacam-se a leptina e os hormônios tireoideanos (HTs). Os papéis biológicos destes hormônios se entrecruzam no que diz respeito à regulação do gasto energético, termogênese e metabolismo basal. Porém, a relação entre leptina e HTs é ainda controversa.

O T3, em concentrações fisiológicas, é capaz de aumentar a expressão do mRNA e secreção de leptina em adipócitos “in vitro” (Yoshida et al., 1997). Em seres humanos hipotireoideos, verificou-se menores níveis de leptina comparado aos eutireoideos e hipertireoideos, todos dentro de uma mesma faixa de IMC (Yoshida et al., 1998). Entretanto, em um estudo com ratos tireoidectomizados infundidos com diferentes doses de HTs, variando desde um estado de hipotireoidismo até um hipertireoidismo, demonstrou-se uma diminuição, dose dependente, da leptinemia (Escobar-Morreale et al., 1997). Confirmamos estes achados em grupos de animais altamente hipotireoideos, que apresentaram hiperleptinemia, e de animais fortemente hipertireoideos, os quais apresentaram leptina sérica próxima do limite sensibilidade do método (Casimiro Lopes, 2004).

A leptina restaura a baixa concentração de HTs observados no jejum (Ahima et al., 1996; Seoane et al., 2000). Este efeito é mediado pela ação estimulatória, direta ou indireta, da leptina sobre eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (BasKin et al., 1998; Baskin et al., 1999; Baskin et al., 2000; Ortiga-Carvalho et al., 2002). Nowak et al. (2002), demonstrou a presença do receptor de leptina (Ob-Rb) na tireóide, sugerindo sua atuação direta sobre a glândula, estimulando a secreção de T3 e T4, aumentando o peso tireoideano, independente do TSH, que se encontrou diminuído.

Em humanos, a diminuição sérica de leptina e HTs resultante da redução de peso corporal, é revertida pela reposição de leptina, demonstrando que adaptações metabólicas e endócrinas observadas na perda de peso, são em parte mediadas pela leptina (Rosenbaum et al., 2002).

## I) LEPTINA

A leptina, produto do gene *Ob*, é uma proteína de 16kDa sintetizada principalmente no tecido adiposo branco (Zhang et al., 1994). Também é produzida em menor escala em outros tecidos, como a placenta (Mastizaki et al., 1997), estômago (Bado et al., 1998), músculo esquelético (Wang et al., 1998) epitélio mamário (Smith-Kirwin et al., 1998) hipófise (Jin et al., 2000; Popovic et al., 2001) e hipotálamo (Morash et al., 1999), no entanto sua função nestes tecidos ainda não é completamente clara.

A leptina é um importante sinalizador do estado nutricional, interagindo com receptores hipotalâmicos para manutenção da homeostase do peso corporal e balanço energético (Camplield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995; Weigle et al., 1995; Friedman et al. 1998). Está envolvida em uma gama de funções fisiológicas, incluindo ingestão de alimentos e regulação do peso corporal, reprodução, formação óssea e angiogênese (Sahu, 2004). A deficiência total de leptina está associada a hiperfagia e obesidade severa, em humanos e em roedores (Montague et al., 1997; Friedman et al. 1998).

A ação da leptina depende de um circuito neural constituído de sinais orexigênicos e anorexigênicos localizados no hipotálamo, e a complexa regulação desse circuito é crítica para ingestão alimentar e peso corporal normais. Os neuropeptídeos orexigênicos são inibidos pela leptina e apresentam-se elevados na sua deficiência, enquanto que os peptídeos anorexigênicos são estimulados pela leptina e encontram-se diminuídos na sua deficiência. Os peptídeos orexigênicos incluem: neuropeptídeo Y (NPY), proteína relacionada ao agouti (AgRP), hormônio concentrador de melanina (MCH), orexina e grelina; enquanto que a pró-ópiomelanocortina (POMC),  $\alpha$ -melanocortina ( $\alpha$ -MSH), fator de transcrição regulado por anfetamina e cocaína (CART) e hormônio liberador de corticotrofina (CRH) são os neuropeptídeos anorexigênicos (Schwartz et al., 1996; Flier & Maratos-Flier, 1998; Friedman et al., 1998; Elmquist et al., 1999; Morash et al., 1999; Jéquier, 2002).

Dentre os sistemas neurais orexigênicos, o NPY, por ser o sinal orexigênico endógeno mais potente em mamíferos, parece ser o principal mediador da ação da leptina no hipotálamo (Kalra et al., 1991; Sahu et al., 1993; Sahu et al., 1998; Woods et al., 1998; Kalra et al., 1999). A leptina reduz a secreção e expressão de NPY por explantes hipotalâmicos (Stephens et al., 1995; Schwartz et al., 1996; Sahu et al., 1998) e tem ação oposta ao NPY sobre ingestão alimentar, este agindo como um antagonista à ação anorética da leptina (Erickson et al., 1996; Baskin et al., 1998). Os neurônios NPY expressam Ob-Rb (Mercer et al., 1996) e STAT3 (Hakansson et al., 1998), sugerindo a existência de uma ação direta da leptina sobre estes neurônios. Camundongos *ob/ob* knockout para NPY, reduzem a hiperfagia e obesidade, indicando que a resposta à deficiência de leptina requer sinalização pelo NPY (Erickson et al., 1996). Camundongos com deficiência de NPY não apresentaram anormalidade no controle da ingestão alimentar e peso corporal, indicando que na ausência de NPY, outros hormônios orexigênicos substituem sua ação, inclusive na regulação por leptina (Erickson et al., 1996).

Os neurônios NPY co-expressam AgRP (Broberger et al., 1998); sua super expressão resulta em obesidade (Graham et al., 1997) e causa hiperfagia, quando administrada i.c.v. A AgRP é um antagonista endógeno do  $\alpha$ -MSH, inibindo seu efeito nos receptores de melanocortina 4 (MC4R). A leptina diminui o mRNA de AgRP no hipotálamo, sugerindo que esta inibição seja um dos mecanismos pelo qual a leptina exerce seu efeito anorético no hipotálamo (Ollmann et al., 1997).

A ghrelina, um peptídeo gástrico regulado negativamente pela leptina e IL-1 $\beta$ , é produzida principalmente no estômago (Nakazato et al., 2001), mas também por neurônios hipotalâmicos, demonstrando um possível papel da ghrelina sobre o circuito neural que controla a homeostase de energia. A injeção central ou periférica de ghrelina induz a alimentação (Wren et al., 2000; Nakazato et al., 2001). A ghrelina bloqueia a ação da leptina sobre a alimentação, e a administração prévia de leptina atenua este efeito da ghrelina, sugerindo uma interação funcional entre ambos.

O MCH é expresso principalmente no hipotálamo lateral e sua aplicação central estimula a alimentação (Rossi et al., 1997). Sua síntese aumenta tanto na restrição energética quanto na deficiência de leptina (Qu et al., 1996). Camundongos MCH-knockout são hipofágicos, hipermetabólicos e excessivamente magros (Shimada et al., 1998). A super expressão hipotalâmica de MCH causa obesidade (Ludwig et al., 2001), e camundongos *ob/ob* MCH-knockout apresentam peso corporal diminuído sem alterar a ingestão alimentar (Segal-Lieberman et al., 2003). Em ratos, a leptina diminui a expressão gênica do MCH, além de diminuir a ingestão alimentar induzida pelo MCH (Sahu, 1998).

A leptina aumenta a expressão e a secreção hipotalâmica do  $\alpha$ -MSH (Gee et al., 1983). O  $\alpha$ -MSH aumenta o AMPc em células que apresentam MC4R. Postula-se que neurônios que contém MC4R inibem neurônios do hipotálamo lateral, que normalmente estimulam o apetite. O  $\alpha$ -MSH é regulado pela ingestão alimentar (Brady et al., 1990), mediada, pelo menos em parte, pela ativação dos neurônios que expressam o mRNA de POMC pela leptina (Mobbs & Mizuno, 2000).

O CRH é um potente anorexigênico e sua administração central suprime a ingestão alimentar (Arase et al., 1988; Krahn et al., 1988). A leptina aumenta a liberação e expressão do CRH (Huang et al., 1998); a ação da leptina é atenuada pelo pré-tratamento com  $\alpha$ -CRH (antagonista específico do CRH) ou pelo anticorpo anti-CRH (Gardner et al., 1998; Uehara et al., 1998; Okamoto et al., 2001). O tratamento com  $\alpha$ -CRH inibiu a expressão da UCP1 induzida pela leptina no tecido adiposo marrom (Masaki et al., 2003), sugerindo que o CRH é um importante mediador da sinalização da leptina sobre o hipotálamo na regulação de ingestão alimentar e metabolismo.

### Mecanismo de ação da leptina

O receptor de leptina é um membro da família da classe 1 dos receptores de citocinas (Tartaglia et al., 1995; Tartaglia et al., 1998). Foi isolado por clonagem na década de 90 a partir do cDNA no plexo coróide de camundongos (Tartaglia et al., 1995).

Subseqüentemente, foram identificadas 6 isoformas do receptor para leptina (Ob-Ra; Ob-Rb; Ob-Rc; Ob-Rd; Ob-Re; Ob-Rf) (Chua et al, 1996; Lee et al, 1996; Wang et al, 1998). Cinco dessas isoformas (Ob-Ra; Ob-Rb; Ob-Rc; Ob-Rd; Ob-Rf) têm domínios transmembranas, entretanto, apenas a isoforma longa (Ob-Rb) contém todos os sítios intracelulares necessários para a ativação da via de transdução sinalizada por JAK-STAT (Vaisse et al, 1996; Ghilardi et al, 1996; Bjorbaek et al, 1997). O hipotálamo apresenta elevada razão Ob-Rb/Ob-Ra (Ghilardi et al., 1996), consistente com seu papel na mediação dos efeitos da leptina sobre alimentação e no balanço energético. Ob-Ra e Ob-Rc são altamente expressos no plexo coróide e nos microvasos (Hileman et al., 2002), sugerindo seu papel no transporte da leptina hemato-encefálico.

A via JAK2-STAT3 é a principal forma de sinalização da leptina (Baumann et al., 1996; Ghilardi et al., 1996; Rosenblum et al., 1996; Vaisse et al., 1996; White et al., 1997; Bjorback et al., 1997). Na cascata de sinalização, a ligação da leptina ao seu receptor resulta na fosforilação e ativação de JAK2 (Janus quinase 2). Esta ativada, medeia a fosforilação do resíduo de tirosina específico do receptor, que serve como um sítio de ligação da STAT3 (transdutor do sinal e ativador da transcrição-3), que se torna fosforilada. A STAT3 fosforilada se dimeriza e transloca para o núcleo, onde se liga e regula a expressão do promotor alvo no DNA (Darnell, 1997).

O resíduo de tirosina na posição 1138 de Ob-Rb medeia a ativação da STAT3 durante a ação da leptina. A sinalização Ob-Rb-JAK2-STAT3 é necessária para que a leptina regule o balanço de energia, mas não a reprodução (Bates et al., 2003). Em ratos transgênicos, a substituição da tirosina 1138 do Ob-Rb por uma serina prejudicou a ativação da STAT3 pela leptina, levando a obesidade, sem alterar a reprodução desses animais. O rompimento da sinalização de Ob-Rb-JAK2-STAT3 resultou na desregulação da ação da leptina em neurônios POMC, sem comprometer os efeitos da leptina sobre neurônios NPY, sugerindo que a inibição do NPY pela leptina pode ser independente da sinalização do STAT3 (Bates et al., 2003).

Alguns autores sugerem a existência de um controle por *feedback* negativo entre a via de sinalização JAK-STAT e as proteínas da família SOCS (supressoras da sinalização de citocinas) (Endo et al, 1997; Naka et al, 1997; Starr et al, 1997; Hilton et al., 1998). As SOCS são induzidas por citocinas e agem como um regulador negativo da sinalização destas citocinas. A leptina, estimula especificamente a SOCS3 no hipotálamo (Ghilardi et al, 1996; Bjorbaek et al, 1998; Bjorbaek et al, 1999; Elias et al, 1999; Baskin et al, 2000) em neurônios que expressam NPY e POMC (Elias et al, 1999; Baskin et al, 2000). Em linhagens de células de mamíferos, a superexpressão de SOCS3 bloqueou o sinal de transdução induzido pela leptina, via inibição da fosforilação da JAK2 (Bjorbaek et al, 1999; Bjorbaek et al, 2000). A SOCS3 também inibe a sinalização da leptina, ligando-se à Tyr-985 fosforilada (Banks et al, 2000). Foi descrita ainda, uma competição entre a SOCS3 e o SHP-2, um outro mediador da sinalização da leptina e citocinas (Bjorbaek et al, 1999; Bjorbaek et al, 2000). Portanto, um aumento na expressão da SOCS3 pode desencadear uma resistência ao efeito da leptina.

Também foi relatada uma via alternativa da sinalização da leptina, *insulina-like*, onde há ativação de PI3K-PDE3B (fosfatidilinositol 3-quinase e fosfodiesterase 3B), reduzindo os níveis de AMPc (Zhao et al., 1998; Zhao et al., 2000; Zhao et al., 2002). Então, acredita-se que a interação das duas vias (JAK2-STAT3 e PI3K-PDE3B-AMPc) seja importante para a sinalização intracelular da leptina no hipotálamo.

## II) Tireóide

A glândula tireóide sintetiza e secreta dois importantes hormônios, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3), que são os únicos hormônios contendo iodo em vertebrados. Morfologicamente, a tireóide consiste de uma série de folículos de tamanhos variados, com estrutura esférica, formados por uma única camada de epitélio folicular circundando o colóide. As células foliculares apresentam uma superfície basolateral, um espaço intersticial, um leito capilar e uma superfície apical voltada para o colóide. Essas células produzem colóide, armazenam iodo, sintetizam tireoglobulina e os HTs. O estoque de colóide varia de acordo com algumas situações, como a estimulação pelo TSH e disponibilidade de iodo. Sob estímulo de TSH, o colóide é reabsorvido para a secreção

de T3 e T4 (Conn & Melmed, 1997). A principal proteína da tireóide, a tireoglobulina (Tg), é uma glicoproteína dimérica (>600kDa) que serve como base molecular para a síntese hormonal no espaço célula-colóide e como um estoque de hormônio e iodo. A Tg é o principal componente do colóide, com uma concentração >50mg/ml (Braverman et al., 1991; Carrasco, 1993).

Os HTs regulam múltiplas funções no organismo, destacando-se seus efeitos sobre desenvolvimento, crescimento e metabolismo. A produção e liberação de T3 e T4, são reguladas pelo hormônio adeno-hipofisário TSH (tireotrofina), que por sua vez é estimulado pelo neurohormônio hipotalâmico TRH (hormônio liberador de TSH). Tanto o TSH como o TRH são controlados por um mecanismo de *feedback* negativo pelos HTs (Conn & Melmed, 1997).

### Mecanismo de transporte de iodo

Por ser o iodo um componente essencial para a biossíntese de T3 e T4, a função tireoideana depende de um suprimento adequado deste elemento. Um sistema especializado e eficaz garante que a maior parte do iodo da dieta, a única fonte de iodo, seja acumulado na tireóide. A molécula responsável por este processo é o co-transportador de  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS), uma proteína de membrana que medeia o transporte ativo de iodo para dentro da tireóide, além de outros tecidos, como glândulas salivares, mucosa gástrica e glândula mamária lactante, embora nestes não ocorra organificação.

Como o NIS é a via pela qual o iodo chega à tireóide, este tem uma função chave na fisiopatologia tireoideana. A habilidade do tireócito concentrar iodo foi relatada pela primeira vez em 1915 (Marine & Feiss, 1915). Em condições fisiológicas, a tireóide é capaz de concentrar iodo em um fator de 20 a 40 vezes em relação à sua concentração plasmática (Halmi, 1961; Wolff, 1964; Carrasco, 1993). Na década de 60, Iff & Wilbrandt (1963) demonstraram que o acúmulo de iodo tireoideano era dependente do sódio celular, e que existia uma íntima relação com o sistema  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ . A identificação molecular do NIS data dos anos 90, quando o seu cDNA foi isolado por clonagem em ovócito de *Xenopus laevis* (Daí et al., 1996).



Assim, o armazenamento de iodo tireoideano é um transporte ativo contra o seu gradiente eletroquímico, estimulado pelo TSH, bloqueado por inibidores competitivos clássicos, como tiocianato e perclorato, e sensível à inibição competitiva do TSH via AMPc (Conn & Melmed, 1997). O conteúdo tireoideano de iodo, regula o seu transporte para a tireóide. Fish et al. (1952), demonstrou que a captação tireoideana de  $I^{131}$  foi inversamente proporcional ao conteúdo de iodo contido na glândula. O TSH estimula a expressão gênica do NIS, elevando a captação de iodo pelos tireócitos (Kaminsky et al., 1994; Riedel et al., 2001). Uma importante restrição da maioria dos estudos para avaliação da regulação da captação tireoideana de iodo, é que estes foram conduzidos em cultura de células tireoideanas FRTL-5, que são incapazes de organificar iodo de forma eficiente.

Recentemente Ferreira et al. (2005) estudaram a atividade do NIS em ratos hipotireoideos tratados com MMI (1-metil-2mercaptoimidazole) por 21 dias, e após 1, 2 e 5 dias da retirada do MMI. A atividade do NIS foi maior após 21 dias de MMI e no 1º dia após a suspensão deste. Já nos dias 2 e 5 pós-suspensão do tratamento, a captação de iodo foi normalizada, provavelmente resultando do restabelecimento da organificação do iodo após a retirada do MMI (Ferreira et al., 2005). A sobrecarga de iodo (0,05% NaI / 6 dias) diminui a captação tireoideana de  $I^{125}$ , e o MMI bloqueia este efeito (Ferreira et al., 2005), confirmando que a organificação de iodo é essencial para a inibição do transporte, pelo excesso de iodo (Wolff & Chaikoff 1948; Price & Sherwin 1986).

Um aspecto interessante a se considerar, é o efeito de determinadas citocinas sobre a função do NIS. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  inibem a expressão do NIS, tanto basal quanto induzida pelo TSH (Ajjan et al., 1998). Altas concentrações de IFN- $\gamma$  fazem downregulation do mRNA do NIS. Consequentemente, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IFN- $\gamma$  inibem a captação de iodo em células FRTL-5 (Ajjan et al., 1998). Caturegli et al (1999) criaram um camundongo transgênico que produz INF- $\gamma$  na tireóide. A presença desta citocina não afetou a expressão de Tg, elevou a expressão da TPO e do receptor de TSH e reduziu a expressão do NIS. Além disto, estes animais apresentaram redução severa do acúmulo de iodo.

## Hormônios tireoideanos (HTs)

Os eventos básicos para a biossíntese dos HTs na célula folicular incluem: transporte ativo de iodo pela membrana plasmática basolateral para dentro da célula, migração deste em direção a membrana apical, onde é transportado pela pendrina e pelo AIT (transportador apical de iodeto) para o colóide; oxidação e organificação do iodeto nos resíduos de tirosinas da Tg, formando os radicais mono e diiodotirosina (MIT e DIT), que se acoplam formando os HTs. Estas etapas são catalizadas pela TPO (peroxidase tireoideana), uma enzima localizada na membrana apical, que usa como co-fator o  $H_2O_2$  (Taurog, 1996), gerado pela enzima NADPH-oxidase (Carvalho et al., 1996; Cardoso et al., 2002) ou TOX (De Deken et al., 2000; Morand et al., 2003). A TG iodada é endocitada, seguida de proteólise e secreção dos HTs. Estudos mostram a existência de transportadores de membrana para T3 e T4, como MCT8 e o OATP4, que parecem ser importantes para a saída destes hormônios do folículo e para a entrada na célula alvo (Friesema et al., 2003; Sugiyama et al., 2003). MIT e DIT não secretadas pelo tireócito, são metabolizadas a tirosinas e  $I^-$ ; reação catalizada pelas iodotironina desidrodase tipos 1 e 2. Este processo facilita a reutilização do iodo remanescente (Dumont & Vassant, 1995; Larsen et al., 1998).

A secreção tireoideana diária normal de T4 e T3, ocorre na proporção de 14:1 em seres humanos, e de 5,7:1 em murinos, o que sugere que no rato a produção tireoideana de T3 seja mais importantes que no homem (Larsen & Ingbar, 1992; Chopra, 1996; Escobar-Morreale et al., 1996). Em ratos, cerca de 55% do T3 sérico é originário da tireóide (Chanoine et al., 1993a; Chanoine et al., 1993b), enquanto que em humanos, somente 20% deste seja proveniente da tireóide (Refetoff & Nicoloff, 1995). A razão T4:T3 pode ser alterada em algumas situações, como no hipertireoidismo e outras situações de deficiência de iodo, onde há aumento na fração relativa da secreção de T3, devido a união preferencial de MIT/DIT e pelo aumento da atividade desidrodase tipo 1 intratireoideana (Conn & Melmed, 1997).

A maior parte dos HTs, devido sua natureza hidrofóbica, circulam acopladas à proteínas transportadoras: TBG (globulina ligadora de tiroxina), TTR (transtirretina) e

albumina. Em humanos, 70% dos HTs estão ligados a TBG (Utiger, 1996). Já em ratos, a proteína carreadora predominante destes hormônios, é a TTR, responsável pelo transporte de 55% do T4 circulante (Davis, 1970). A fração livre, que representa a forma metabolicamente ativa do hormônio, compreende somente 0,02% do T4 e 0,03% do T3 séricos.

A ação tecidual do HT é mediada principalmente por receptores nucleares na células alvo. O T3, hormônio metabolicamente ativo apresenta uma afinidade de 10 a 15 vezes maior pelo receptor nuclear que o T4 (Utiger, 1996). Parece existir alguma ação não-nuclear dos HTs, ao nível de membrana celular, envolvendo proteínas dependentes de cálcio e AMPc (Wondisford et al., 1994; Davis et al., 1997).

Os receptores dos HTs (TRs) são proteínas não histonas, membros da superfamília de receptores nucleares derivados de 2 subtipos de genes, o  $\alpha$  e o  $\beta$ , que geram as isoformas  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$  respectivamente. Os TRs possuem em comum, a porção C-terminal, que é o domínio de ligação ao hormônio, e uma porção variável N-terminal, enquanto a porção central altamente conservada entre as espécies, participa do reconhecimento do sítio de ligação ao DNA (Zhang & Lazar, 2000). O TR $\alpha 2$  não apresenta na sua porção C-terminal o sítio de ligação ao T3, não sendo considerado um receptor para HTs, no entanto, podendo atuar como um inibidor dos HTs (Zhang & Lazar, 2000). A principal função destes receptores é regular diretamente a expressão de gene específicos, através de sua ligação à sequências de DNA denominados elementos responsivos aos HTs (TREs) presentes nestes genes (Lazar, 1993; Zhang & Lazar, 2000).

### Metabolismo Desiodativo

Como já mencionado, a tireóide secreta principalmente T4. Este hormônio será convertido a forma ativa T3 em diversos tecidos, pela 5'-monodesiodação do T4. As reações de desiodação são catalizadas por 3 selenoenzimas, denominadas iodotironinas desiodases tipo 1 (D1), tipo 2 (D2) e tipo 3 (D3). O metabolismo dos HTs incluem duas reações distinta:

- a desiodação do anel fenólico ou externo (5'-desiodação), catalisada pela D1 e D2, via ativadora, pois gera T3 e
- a desiodação do anel tirosílico ou interno (5-desiodação), catalisada pela D1 e D3, via inativadora, pois gera T3 reverso que é metabolicamente inativo.

As enzimas desiodases possuem características distintas baseadas na distribuição tecidual, substrato de preferência, cinética e sensibilidade a inibidores (St. Germain, 1997; Conn & Melmed, 1997; Kohrle, 1999; Bianco et al. 2002).

Uma atividade coordenada das desiodases nos diferentes tecidos, confere homeostase plasmática dos HTs, assim como uma adequada exposição dos tecidos a esses hormônios. A concentração tecidual de T3, varia conforme o transporte do hormônio para o tecido e a atividade local das desiodases, capazes de levar ao aumento ou diminuição de T3, independente das concentrações séricas de HTs (Larsen et al., 1981; Bianco et al., 2002).

As desiodases variam de acordo com o estado tireoideano. No hipertireoidismo, ocorre aumento da D1 periférica e da D3 cerebral, e diminuição na D2 hipofisária, no córtex cerebral e no tecido adiposo marrom (TAM). Enquanto no hipotireoidismo, o oposto é observado (Silva & Larsen, 1983; Larsen et al., 1998).

## **D1:**

A fonte primária de T3 nos tecidos periféricos é resultante da 5'-monodesiodação do T4 pela D1. Em ratos, dos 55% do T3 obtido por desiodação, metade provém da atividade D1 (Nguyen et al., 1998).

A D1 é uma proteína integral de membrana, localizada na membrana plasmática e tem seu sítio ativo voltado para o citoplasma, o que facilita o acesso ao T4 sérico e a saída do T3 para a circulação (Toyoda et al., 1995; Baqui et al., 2000). Foi a primeira das isoformas a ser identificada; o seu cDNA foi clonado em ratos, camundongos, seres

humanos, cachorros e galinhas, com elevado grau de homologia entre as espécies (Berry et al., 1991a; Toyoda et al., 1994; Sanders et al., 1997).

Em murinos, esta enzima é encontrada predominantemente na tireóide, fígado, rim, hipófise, SNC, intestino (Chopra, 1996; Köhrle, 1996; Bianco et al., 2002) e músculo (Tsakahara et al., 1989; Tsakahara et al., 1990; Salvatore et al., 1996, Lisboa et al., 2003b).

Foram identificados 2 TREs no gene da D1, sendo sua síntese aumentada pelos HTs, tanto em ratos quanto em humanos (Bianco *et al.*, 2002). O T3, TSH e AMPc aumentam a expressão da D1 em cultura de células FRTL5 (Conn & Melmed, 1997 ). Outros fatores que podem modular, negativa ou positivamente, a síntese e/ou atividade desta enzima são: glicocorticóides, estrógenos, testosterona, citocinas, GH, prolactina, leptina, insulina, selênio e estado nutricional (Harris et al., 1978; Beckett et al., 1987; Beckett et al., 1989; LoPresti et al., 1989; Behne et al., 1990; Pekary et al., 1994; Miyashita et al., 1995; Nguyen et al., 1998; Van der Geyten et al., 1999; Bates et al., 2000; Baur et al., 2002; Lisboa et al., 2003a).

A D1 requer tiol reduzido como co-fator e é sensível a inibição por propiltiroacil (PTU), que compete com o co-fator. Outros inibidores da D1 incluem doença sistêmica, inanição, glicocorticóides e propranolol (Conn & Melmed, 1997 ).

Zavacki et al. (2005) demonstraram que a D1 é um marcador sensível do estado tireoideano periférico. Camundongos com TR $\alpha$ 1 mutado apresentam aumento de T3 sérico (1,9 vezes) e da expressão do RNAm e atividade da D1 (4 a 5 vezes), enquanto outros marcadores, como a GPDm aumentou apenas 1,7 vezes. A administração de T3 no hipotireoidismo elevou a D1 cerca de 175 vezes e a GPDm, somente 3 a 6 vezes.

Recentemente, Maglich et al (2004) evidenciaram que na restrição calórica, ocorre aumento da atividade sulfotransferase hepática, induzida pelo receptor órfão CAR (receptor constitutivo de androstano), ocasionando aumento da sulfatação do T4, o que

faz com que a D1 catalise a desiodação do anel tirosílico do T4, diminuindo a formação de T3 e aumentando, a de rT3.

## **D2:**

Foi localizada pela primeira vez na hipófise, como uma desiodase insensível a inativação pelo PTU (Silva et al., 1977). Esta enzima tem função de regular a concentração intracelular de T3, sobretudo em tecidos onde a concentração de T3 é crítica (Silva et al., 1985). A D2 é uma proteína transmembrana, localizada no retículo endoplasmático (Baqui et al., 2000). Esta diferença de localização entre D1 e D2 é condizente com o acesso mais rápido do T3 ao núcleo, o que não acontece na desiodação pela D1.

No hipotireoidismo, a alta atividade D2 parece ser importante para manter as concentrações intracelulares de T3 apesar do decréscimo de T4, especialmente no cérebro, adenohipófise e TAM. Assim, esta parece tratar-se de uma resposta adaptativa à queda de HTs (Koenig et al., 1984; Escobar-Morreale et al., 1996).

Em murinos, a D2 está presente na hipófise, cérebro, TAM, pele, tireóide, gônadas, timo, glândula mamária, músculo (esquelético, cardíaco e liso vascular) e útero (Kaplan & Yaskoski, 1980; Visser et al., 1982; Silva & Larsen, 1983; Tanaka et al., 1986; Kaplan et al., 1988; Tsukahara et al., 1989; Molinero et al., 1995; Becker, 1996; Bates et al., 2000; Song et al., 2000; Galiton et al., 2001; Lisboa 2003a, 2003b). Em humanos, a D2 foi localizada na tireóide, hipófise, coração, cérebro, músculo esquelético, placenta, rins e pâncreas (Croteau et al., 1996; Salvatore et al., 1996; Hosol et al., 1999; Imai et al., 2001; Murakami et al., 2001).

Além da produção local de T3, a D2 parece contribuir para a geração do T3 circulante (Nguyen et al., 1998; Sabatino et al., 2000). O percentual de conversão de T4 a T3 foi semelhante em ratos eutireoideos e hipotireoideos tratados com PTU, sugerindo que a D2, junto com a D1, é responsável pela produção de metade do T3 sérico. Talvez

a D1 atue mais rapidamente e a D2 mais tardiamente para equilibrar a taxa de conversão do T4 a T3 (Nicoloff et al., 1984; Pilo et al., 1990).

A expressão e atividade da D2 no TAM é estimulada pela exposição ao frio, e inibida por bloqueadores  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgicos (Salvatore et al., 1998). Segundo Murakami et al (2001), em ratos, a atividade D2 no TAM é estimulada de forma dose-dependente pelo TSH, via ativação direta de seu receptor específico neste tecido. Já, de acordo com outros estudos (Nicoloff et al., 1984; Hernandez & Obregon, 1996), o T<sub>3</sub> estimula a D2 em cultura de adipócitos marrons, por aumentar a síntese protéica e isto é oposto a regulação negativa do T3 sobre a D2 em outros tecidos (Silva & Larsen, 1983; Tu et al., 1997; Larsen et al., 1998; Hosoi et al., 1999).

Foi demonstrado que linhagens de osteoblastos e extratos ósseos expressam D2, indicando que esta pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento do esqueleto e homeostase óssea, e que o osso pode contribuir para produção periférica de T3. A atividade D2 é estimulada pela vitamina D ativa, PTH, estrogênio e leptina (Gouveia et al., 2004).

### **D3:**

A D3 é a principal enzima inativadora de HT. É uma proteína integral de membrana plasmática, e tem a maior parte de sua molécula na face extracelular, o que explica sua rápida capacidade de inativação dos HTs em determinadas doenças e na barreira placentária (Leornad & Koehrie, 1996; Baqui et al., 2003). A atividade D3 é regulada pelos HTs, e a queda destes associa-se a menor atividade desta isoforma. A D3 pode ter uma função na regulação da disponibilidade T3/T4, especialmente durante o desenvolvimento (Conn & Melmed, 1997).

Esta isoforma é encontrada no córtex cerebral, placenta, pele, e fígado de ratos e humanos (Kaplan, 1986; Galton et al., 1991; Bates et al., 1999; Bates et al., 2000).

### III) Leptina e eixo hipotálamo-hipófise-tireóide

Diversos estudos correlacionam leptina e função tireoideana, todavia existem várias controvérsias na literatura. Estas podem estar associadas a espécie estudada, ao status tireoideano, diferentes doses e períodos de administração de leptina ou HTs.

Segundo Escobar-Morreale et al. (1997), os HTs modulam negativamente a leptinemia, entretanto ainda não está claro o mecanismo preciso de como isto acontece.

Em um estudo avaliando o ritmo circadiano da secreção de leptina e TSH em crianças, foi demonstrado que ambos os hormônios estão correlacionados, positiva e negativamente, dependendo da fase do dia. A correlação positiva da leptina sobre o TSH é mais fácil de explicar pelo efeito fisiológico da leptina sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. A relação negativa, no entanto, existe mas é de explicação mais complexa e pode depender dos *feedbacks* com HTs (Ghizzoni et al., 2001).

No jejum, onde se tem uma ameaça a homeostase, é disparada uma resposta adaptativa manifestada por queda dos HTs e, paradoxalmente um TSH normal ou diminuído (Campbell, 1977; Harris et al., 1978; Hermus et al., 1992). Esta resposta é devida, pelo menos em parte, à supressão da expressão gênica do pro-TRH hipotalâmico no núcleo paraventricular hipotalâmicos (PVN) (Legradi et al., 1998).

Durante o jejum, também ocorre diminuição da leptinemia, e a administração de leptina exógena reverte os níveis de TSH e HTs ao normal (Ahima et al 1999; Ahima et al., 2000). Portanto, é provável que exista uma relação da leptina sobre a resposta adaptativa ao jejum, agindo provavelmente em neurônios hipofisiotróficos produtores de TRH. A administração de leptina em ratos em jejum, reverteu a supressão do RNAm para pró-TRH (Legradi et al., 1997). Em ratos com lesões no PVN, onde os receptores para leptina estão altamente expressos, nem o jejum, nem administração de leptina no jejum resultou em alterações de HTs e TSH plasmáticos ou RNAm para pró-TRH no PVN (Legradi et al., 1998).



Ortiga-Carvalho et al. (2002), em estudos “in vitro”, demonstraram um efeito direto da leptina inibindo a secreção de TSH, em hipófises de ratos eutireoideos. Por outro lado, estes autores também mostraram um efeito estimulatório, “in vivo”, da leptina sobre o TSH em animais alimentados normalmente (Ortiga-Carvalho et al., 2002). Porém, o mesmo não foi observado com tanta magnitude quando a administração de leptina ocorre em animais hipotireoideos, indicando que esse efeito é dependente da função tireoideana (Seoane et al., 2000). Recentemente, Da Veiga et al. (2004) observaram que esta resposta do TSH à leptina, estimulatória (“in vivo”) e inibitória (“in vitro”), não ocorre em ratos hipotireóideos e é preservada no hipertireoidismo.

Nowak et al. (2002), revelou a expressão do receptor de forma longa para leptina (Ob-Rb) na tireóide de ratas normais, indicando que a leptina pode exercer um efeito direto sobre a tireóide e não apenas modulando a liberação do eixo hipotálamo-hipófise. Mais recentemente, Isozaki et al. (2004) também detectou a presença do Ob-Rb em cultura de células tireoideanas.

Em estudos anteriores do nosso laboratório, verificamos que ratas lactantes submetidas à desnutrição proteica apresentaram hiperleptinemia e função tireoideana alterada (Ramos et al., 2000; Passos et al., 2001b; Lisboa et al., 2003b), assim evidenciando uma relação entre leptina e função tireoideana durante o período de lactação.

#### **IV) Leptina e metabolismo desiodativo**

Diversos fatores podem estar envolvidos na modulação direta ou indireta, e de forma isolada ou em conjunto, do metabolismo desiodativo. Vários estudos consideram a leptina como sendo um desses fatores. A diminuição do T3 sérico resultante da restrição alimentar ou jejum experimental é dada, pelo menos em parte, por alteração no metabolismo desiodativo.

Camundongos *ob/ob* (deficientes em leptina) apresentaram diminuição da atividade D1 hepática e renal e aumento da atividade D2 em TAM e cérebro (Hillgartener & Romsos, 1985; Kates & Himms-Hagen, 1985; Kaplan & Young, 1987).

Durante a restrição alimentar, a atividade e expressão da D2 encontra-se elevada no hipotálamo. Este aumento coincide com o decréscimo de T3 e T4. A reposição de T4, não restabelece a atividade e o RNAm para D2, sugerindo a existência de outro sinal de regulação para a D2 hipotalâmica (Diano et al., 1998).

Estudos demonstraram que a atividade D1 hepática encontra-se diminuída na restrição calórica, e que a administração central de leptina restabelece os níveis de T3 e o decréscimo da atividade da D1 hepática (Cusin et al., 2000). Além de regular a D1 no fígado, a leptina mostrou-se também estimuladora da atividade D2 no TAM (Cettour-Rose et al., 2001; Cettour-Rose et al., 2002).

Lisboa et al. (2003a), demonstrou que a leptina, em dose única e sistêmica, aumenta a atividade D1 tireoideana, sem afetar a atividade D2, sugerindo um mecanismo de regulação diferenciado entre estas duas isoformas na tireóide. Foi também verificado neste estudo, aumento na atividade D1 hepática. Segundo Cabanelas (2003), a leptina eleva a atividade D1 e reduz a D2 na adenohipófise. Recentemente, demonstramos que ratas sob restrição protéica na lactação (que têm aumento da leptinemia), apresentam maior atividade da D2 hipofisária, tireoidiana e do TAM (Lisboa et al., 2003b). Assim, acreditamos na hipótese de que a leptina pode regular de forma diferente as isoformas das desidases nos vários tecidos e de acordo com o estado nutricional, contribuindo para a elevação do T3 sérico.

Parece existir uma regulação diferencial da atividade D2 durante o metabolismo energético negativo versus condições metabólicas normais. No estado metabólico normal, a atividade D2 parece não ser alterada pela leptina ou glicocorticóides. Contudo, durante a restrição alimentar, há aumento da atividade D2 hipotalâmica, devido à uma relação inversa entre hipoleptinemia e hipercorticosteronemia neste estado (Coppola et al., 2005).

## V) Leptina e glicocorticóides

A detecção das isoformas Ob-Ra e Ob-Rb no córtex adrenal porcino, demonstra a existência de um efeito direto da leptina sobre a secreção de corticosterona (Malendowicz et al., 2004). O tratamento com leptina reduz a corticosterona plasmática em camundongos ob/ob (Stephens et al., 1995) e suprime a liberação de CRH na resposta a hipoglicemia (Heiman et al., 1997) e restrição alimentar (Huang et al., 1998), porém potencializa a secreção basal de CRH em condições basais (Costa et al., 1997). No jejum, onde ocorre maior corticosterona e menor leptina, a reposição de leptina diminui a elevação da corticosterona (Ahima et al., 1996). Contrariando estes achados, o tratamento com leptina eleva a corticosteronemia em ratos diabéticos (Akirav et al., 2004). Apesar, da relação entre leptina e corticosterona, na maioria das vezes ser inversa, ratos submetidos a uma dieta pobre em selênio por um período de 4-10 semanas apresentaram uma redução de corticosterona e leptina circulantes (Chanoine et al., 2004).

## VI) Justificativa do presente estudo

Lins et al. (2005), demonstraram que a administração de leptina ao final da lactação em ratas lactantes, levou a um aumento na captação de radioiodeto pela tireóide, sugerindo um estímulo da leptina sobre a transferência de iodo nessa glândula. Por outro lado, o tratamento com leptina nos 10 primeiros dias de lactação programou uma hiperleptinemia, contudo esta não foi capaz de modificar a captação tireoideana de iodo nos animais adultos (Teixeira et al., 2003). Nestes estudos a hiperleptinemia ocorre em situações particulares, na primeira, trata-se do período de lactação, onde o organismo materno sofre diversas adaptações para garantir o desenvolvimento adequado da prole; na segunda trata-se da prole programada. Além disto, em vários outros modelos experimentais desenvolvidos em nosso laboratório, detectamos alterações de leptinemia e de captação tireoideana (quadro 1), nem sempre facilmente explicável por uma relação direta, o que torna relevante caracterizar a existência de interação entre estes 2 parâmetros.

**Quadro 1:** leptinemia, captação de radioiodeto tireoideana, concentrações séricas de TSH e HTs das linhas de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Endócrina (UERJ)

modelo experimentais	leptina sérica	Captação tireoideana de <sup>125</sup> I	TSH sérico	HTs séricos
Ratas lactantes tratadas com leptina no fim da lactação <sup>1</sup>	↑	↑	<b>N</b>	<b>N</b>
Ratos adultos programados pela injeção de leptina no início da lactação <sup>2</sup>	↑	<b>N</b>	<b>N</b>	↑
Prole adulta programada pela restrição protéica durante a lactação <sup>3</sup>	<b>N</b>	↑	↓	↑
Prole adulta programada pela restrição calórica durante a lactação <sup>3</sup>	<b>N</b>	<b>N</b>	↓	<b>T3↑</b>
Prole adulta programada pela bromocriptina no fim da lactação <sup>4</sup>	↑	↓	↓	↓
Ratos adultos programados pela hipertiroxinemia no início da lactação <sup>5</sup>	↑	↓	↓	↓

1- Lins et al. (2005); 2- Teixeira et al. (2003); 3- Passos et al (2001); 4- Bonomo (2004); 5- Santos (2005)

Assim, no presente estudo pretendemos avaliar o efeito “in vivo” da administração sistêmica, aguda e crônica, de leptina em ratos adultos eutireoideos, sobre o eixo hipófise-tireóide e metabolismo periférico dos HTs, assim como a sua relação com a composição corporal, afim de elucidar a ação da leptina sobre a tireóide.

**Objetivos**

## **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a função tireoideana de ratos adultos eutireoideos tratados aguda ou cronicamente com leptina, assim como demonstrar a repercussão deste tratamento sobre a composição corporal dos animais.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Nos animais tratados com a dose aguda ou crônica de leptina, avaliamos:

- ◆ A massa de gordura visceral;
- ◆ A captação tireoideana de radioiodeto “in vivo” após 15 minutos (atividade do NIS) ou 2 horas (atividade do NIS e da TPO) de sua aplicação;
- ◆ A captação tireoideana de radiodeto “in vitro”;
- ◆ As concentrações séricas de leptina, hormônios tireoideanos, TSH e corticosterona;
- ◆ O conteúdo intrahipofisário de TSH;
- ◆ A atividade hepática da  $\alpha$ -glicerol fosfato desidrogenase mitocondrial (GPDm);
- ◆ A atividade das iodotironinas desiodases (D1 e/ou D2) em fígado, músculo, esquelético e tecido adiposo marrom;

Além disso, só nos animais tratados cronicamente com leptina, avaliamos:

- ◆ a ingestão alimentar e o peso corporal
- ◆ o conteúdo corporal total de proteínas, gordura e água

## **Materiais e Métodos**

## ANIMAIS

Ratos Wistar machos, de 3 meses de idade, foram mantidos em biotério com temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro (7:00 - 19:00h) controlados e com livre acesso à água e ração. O nosso protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, que se baseia nos princípios descritos no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Bayne K, 1996; Goldim & Raymundo, 1997).

Realizamos duas experiências com tempos diferentes de administração de leptina.

### EXPERIÊNCIA I: TRATAMENTO AGUDO COM LEPTINA

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais:

- **Controle (Con)** : injetados com solução salina (NaCl 0,9%), via subcutânea (s.c.);
- **Leptina Aguda (Lep A)** : injetados com  $8\mu\text{g}$  de leptina murina recombinante (National Hormone and Pituitary Program, Medical Center, CA, EUA) por 100g de peso corporal (PC) via s.c., diluída em NaCl 0,9%.

Os ratos foram sacrificados por decapitação, 2h após a injeção única de leptina ou salina.

### EXPERIÊNCIA II: TRATAMENTO CRÔNICO COM LEPTINA

Ratos separados em 2 grupos:

- **Controle (Con)** : receberam NaCl 0,9%, via s.c.;
- **Leptina Crônica (Lep C)** : receberam injeção de  $8\mu\text{g}$  de leptina por 100g de PC via s.c., diluída em NaCl 0,9%.

Os ratos receberam uma injeção diária de leptina ou salina durante 6 dias consecutivos.

Monitoramos, diariamente, o peso corporal e a ingestão de ração em 1, 2, 3 e 24h após cada injeção de leptina.

Sacrificamos os animais por decapitação após 3h da última injeção de leptina.



Em ambas as experiências, no dia do sacrifício, as amostras de sangue foram obtidas do tronco, centrifugadas (3.000 rpm, 4°C, 20 minutos) para obtenção do soro e armazenadas a -20°C para posterior dosagem das concentrações dos hormônios circulantes.

Retiramos os seguintes tecidos: adeno-hipófise, tireóide, fígado, músculo esquelético (sóleo), tecido adiposo marrom (TAM) e massa de gordura visceral (MGV) .

A tireóide foi utilizada para o estudo de captação de radioiodeto.

Para estimativa da composição corporal, dissecamos e pesamos a MGV, considerada como a soma dos depósitos de gordura nas cavidades retroperitoneal, mesentérica e epididimal (Hansen et al., 1997). A carcaça foi obtida para análise do conteúdo lipídico, protéico e de água.

O fígado, o sóleo e o TAM foram congelados, instantaneamente, em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -70°C.

As adenohipófises foram homogeneizadas em 500µl de tampão PBS, pH 7,0 e sonicadas para obtenção do homogenato total.

Os tecidos foram processados de acordo com os protocolos descritos a seguir.

## 1. ESTUDO DA CAPTAÇÃO DE RADIOIODO TIREOIDEANO

### **“IN VIVO”**

A captação de  $^{125}\text{I}$  “in vivo” após 15 minutos de sua injeção (Ferreira et al., 2005), nos revela a atividade transportadora de iodo para a tireóide (atividade do NIS), enquanto que a captação de 2h, nos permite avaliar se o iodo foi organificado ou não na molécula de tireoglobulina (atividade de oxidação e iodação, catalizada pela TPO).

Os ratos Con e Lep (experiência aguda e crônica) receberam dose traçadora de  $^{125}\text{I}$  ( $\pm 250.000$  cpm/100 µl) ( $\pm 3400$  Bq/100 µl), via intraperitoneal (i.p.), diluído em NaCl 0,9%. Após 15 min ou 2h da injeção de radioiodo, os ratos foram sacrificadas e as tireóides excisadas e pesadas. A radioatividade das tireóides foi determinada em cintilador de radiação gama (marca de aparelho) e relacionada à dose injetada. Os resultados foram expressos em % de  $^{125}\text{I}$  captado por miligrama de tecido tireoideano.

## **“IN VITRO”**

Após o sacrifício, as tireóides dos animais Con e Lep (experiência aguda e crônica) foram rapidamente dissecadas e pesadas. Cada explante tireoideano foi fatiado e imediatamente transferido para erlenmeyers contendo 2ml de meio essencial mínimo (MEM - Sigma) acrescido de 25 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM de glutamina, 0,1 µM KI e 5 mU/ml de TSH bovino e incubadas em banho-maria (37°C) com agitação constante e atmosfera carbogênica (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>) (Moura et al., 1990). Após 30 minutos de pré-incubação, adicionou-se 100µl de I<sup>125</sup> (+/- 125.000 cpm) para avaliação da captação glandular “in vitro”. Ao final de 2h, as glândulas foram levadas ao contador de fase sólida. A captação tireoideana foi estimada pela relação entre sua contagem e o peso glandular. Armazenamos alíquotas do meio de incubação para dosar HTs e assim estimar sua secreção.

Realizamos ainda um outro experimento “in vitro”, onde adicionamos aos explantes tireoideanos de ratos adultos eutireoideos (machos e fêmeas), 20 µl de meio com ou sem leptina em concentrações distintas (10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-7</sup>M e 10<sup>-5</sup>M) por 30 minutos. Após este período, adicionamos de I<sup>125</sup>, por 2 horas, para estimar a captação glandular sob efeito das 3 diferentes concentrações de leptina.

## **2. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL - MÉTODO DA CARÇAÇA**

Para o processamento da carcaça, os animais da experiência II (Con e Lep C) foram completamente eviscerados e as carcaças amolecidas em autoclave durante 1h, com posterior homogeneização em água destilada na proporção 1:1

❖ **CONTEÚDO LIPÍDICO TOTAL:** Alíquotas com cerca de 3g do homogeneizado foram utilizadas para determinação do conteúdo de gordura pelo método gravimétrico descrito por Stansbie et al (1976). As alíquotas foram hidrolisadas em banho-maria a 70°C durante 2h em presença de KOH 30% e etanol absoluto. Após acidificação com ácido sulfúrico 6M, os ácidos graxos totais e o colesterol livre foram extraídos mediante 3 lavagens sucessivas com éter de petróleo. O material foi transferido para um recipiente previamente pesado, e levado à capela de exaustão até ficar bem seco, quando se procedeu a pesagem diária até seu valor tornar-se constante. As

pesagens foram corrigidas pelas diluições feitas nas etapas anteriores. Resultados expressos em gramas de gordura por 100 gramas de carcaça.

- ❖ **CONTEÚDO PROTÉICO TOTAL:** Alíquotas contendo aproximadamente 1g do homogeneizado, foram aquecidas a 37°C por 1h em KOH 0,6N, sob agitação. Após centrifugação a 2.000 rpm, por 10 minutos, a concentração de proteínas totais foi determinada colorimetricamente no sobrenadante, segundo Lowry et al (1951), utilizando BSA para construção da curva padrão. Os resultados foram expressos em gramas de proteína por 100 gramas de carcaça.
  
- ❖ **ÁGUA CORPORAL TOTAL:** colocamos cerca de 1g do homogeneizado de carcaça em estufa à temperatura de 90°C, mantendo-as nesta temperatura até que o peso das amostras desidratadas ficasse estável (Pase et al., 1945). Os valores foram expressos em gramas de água corporal total.

### 3. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GPD<sub>m</sub> NO FÍGADO

A dosagem da atividade GPD em fração mitocondrial hepática baseia-se na adaptação da técnica colorimétrica descrita previamente (Lee & Lardy, 1965; Recupero et al., 1983), cujo princípio é o uso do metassulfato de fenacina (PMS) como transportador eletrônico entre a enzima reduzida e o cloreto de violeta-iodonitrotetrazólio (INT).

Cerca de 250mg de tecido hepático foi homogeneizado em 20 volumes de solução SM (sacarose 0,32 M e cloreto de magnésio 1mM) em Ultra-Turrax e centrifugado (1.000xg/10 min/4°C), para separar o precipitado nuclear (descartado) e utilizar o sobrenadante, que foi centrifugado (8.500xg/10 min/4°C). O precipitado resultante desta segunda centrifugação foi ressuspenso em 3ml de tampão fosfato 0,125M pH 7,5 (BPK), sob agitação em vórtex, seguido de uma nova centrifugação (8.500xg/10 min/4°C). Descartamos o sobrenadante, obtém-se a fração mitocondrial (precipitado), sendo esta ressuspendida em 1ml de BPK apenas no momento da dosagem da atividade enzimática.

Para o ensaio da atividade GPDm, um volume de 100µl da fração mitocondrial foi pipetado em 4 tubos (2 brancos e 2 problemas). Nos tubos problemas, pipetamos 50µl de solução DL- $\alpha$ -glicerofosfato hexahidratado sal sódica ( $\alpha$ -GP - 32,4 mg/ml) diluído em KCN (cianeto de potássio - 0,32mg/ml em tampão BKP pH7,5-0,125M) e nos tubos brancos, apenas 50µl de KCN. Incubamos por 10 min, a 30°C, seguido de um banho frio. Iniciamos a reação adicionando 100µl da solução INT-PMS por 15 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. Precipitamos as amostras com 50µL de TCA 10%, ainda em ambiente escuro. Então a luz foi acendida, sendo acrescentado 1ml de etanol absoluto, com agitação em vórtex e posterior centrifugação das amostras (1.000xg/5 min.) A leitura da absorbância do sobrenadante foi realizada a 500nm e os resultados expressos como A/min/mg de proteína mitocondrial.

#### **4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DESIODASE (D1 e D2)**

A atividade desiodase no fígado, TAM e músculo esquelético foi quantificada pela liberação de  $^{125}\text{I}$  a partir de  $^{125}\text{I}$ -rT3, conforme descrito anteriormente (Lisboa et al., 2003 a, Lisboa et al., 2003 b).

##### **❖ Processamento dos tecidos:**

**Fígado e TAM** (fração microssomal) - aproximadamente 250mg de tecido hepático foi homogeneizado sob gelo em 10 volumes de tampão Tris-HCl 50mM, pH 6,8. O TAM foi pesado e homogeneizado em 50 volumes do mesmo tampão. Os homogenatos foram centrifugados a 15.000xg por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi então ultracentrifugado (190.000xg/90 minutos/4°C) e o precipitado (microssoma) foi ressuspenso em volume inicial de homogeneização.

**Músculo Esquelético** (homogenato) - pesamos e homogeneizamos o sóleo em 5 volumes de tampão Tris-HCl 50mM, pH 6,8. Realizamos uma centrifugação (2.800xg/30 minutos/4°C) e utilizamos o sobrenadante para a dosagem da atividade enzimática.

As amostras foram armazenadas em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios enzimáticos.

- ❖ **Purificação do  $^{125}\text{I}$ -rT3:** antes dos ensaios, o  $^{125}\text{I}$ -rT3 (PerkinElmer Life Sciences) foi purificado por eletroforese em papel, evitando a contaminação da reação enzimática pela presença de  $^{125}\text{I}$  livre. Pipetamos  $50\mu\text{l}$  do  $^{125}\text{I}$ -rT3 ( $1,07\text{ mCi}/\mu\text{g}$ ) em papel de filtro Whatman nº 3. Aplicamos uma corrente de 500 Volts, 25mA por 15 minutos. O  $^{125}\text{I}$ -rT3 foi extraído do papel com NaOH 0,04N em tampão fosfato de potássio 1M e EDTA 10mM, pH 6,9.
  
- ❖ **Ensaio enzimático:** realizado em tampão fosfato de potássio 100mM e EDTA 1mM, pH 6,9, em presença de rT3 e DTT (ditiotreitól), PTU (propiltiouracil) ou T4. Adicionamos  $50\mu\text{l}$  do traçador purificado às amostras, seguido de incubação em banho-maria sob agitação constante, a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após o tempo de incubação, específico para cada tecido, a reação foi interrompida pela adição de BSA 8% e PTU 10mM, seguido de ácido tricloroacético (TCA) 20% gelado. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. A tabela abaixo (1), mostra as principais condições para a determinação da atividade D1 e D2.

	Proteína	Isoforma	rT <sub>3</sub>	DTT	Inibição da D1	Inibição da D2	Tempo de Incubação
<b>microssoma TAM</b>	13-21 $\mu\text{g}$	D2	2 nM	400 mM	-	-	2 h
<b>homogenato sóleo</b>	95-134 $\mu\text{g}$	D1	2 nM	400 mM	-	T <sub>4</sub> 100 nM	2 h
	89-134 $\mu\text{g}$	D2	2 nM	400 mM	PTU 10 mM	-	2 h
<b>microssoma hepático</b>	66-75 $\mu\text{g}$	D1	2 nM	100 mM	-	-	30 min

Tabela 1: Metodologia para determinação da atividade D1 e D2 em ratos. A reação enzimática atingiu a linearidade utilizando a concentração protéica indicada, conforme inicialmente testado.

- ❖ **Separação do  $^{125}\text{I}$  liberado na incubação:** após a centrifugação, cerca de 80% do sobrenadante foi aplicado em coluna com resina de troca catiônica (Dowex 50W-X2 Bio-Rad), eluindo o  $^{125}\text{I}$  livre com 2 ml ácido acético a 10%. A radioatividade do eluato foi determinada em um contador gama de fase sólida. A atividade específica foi expressa em nanomoles e femtomoles de rT3 desiodado por hora e mg de ptn.

## 5. Radioimunoensaios (RIEs)

A leptinemia foi avaliada através de RIE, utilizando o kit específico para murinos (Linco Research, Inc., Missouri, EUA). Os valores foram expressos em ng/ml.

A corticosteronemia foi avaliada através de RIE, utilizando o kit específico kit para murinos (ICN Biomedicals). Os valores foram expressos em ng/dl.

As concentrações séricas e no meio de  $T_3$  e  $T_4$  livres foram determinadas através de RIE comercial (ICN Pharmaceuticals, Inc, NY, EUA), adaptado para determinação de HTs em ratos. Os valores foram expressos em ng/dl e  $\mu\text{g/dl}$ , respectivamente.

O TSH foi quantificado RIE de duplo anticorpo, conforme descrito anteriormente (Moura et al., 2001), utilizando reagentes fornecidos pelo National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDKD, Bethesda, EUA). O TSH sérico foi expresso em ng/ml e o TSH intrahipofisário foi expresso em  $\mu\text{g/mg}$  de proteína.

## 6. Dosagem de proteínas

Utilizamos o método de Bradford (1976) para a determinação do conteúdo de proteína em hipófise, fígado, sóleo e TAM. A albumina foi usada para a construção de uma curva padrão e a leitura da absorbância foi realizada a 595nm.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado, exceto para

os dados de TSH e de captação de  $^{125}\text{I}$ , para os quais utilizamos o teste não paramétrico de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

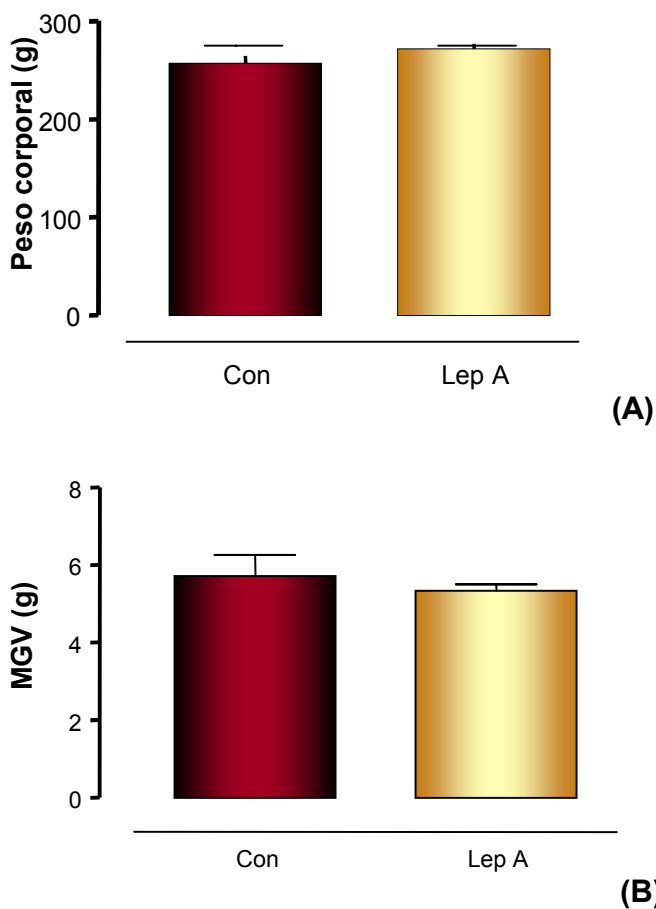
**Resultados**



## I) TRATAMENTO AGUDO COM LEPTINA

### Peso corporal (PC) e massa de gordura visceral (MGV) de ratos submetidos ao tratamento agudo com leptina

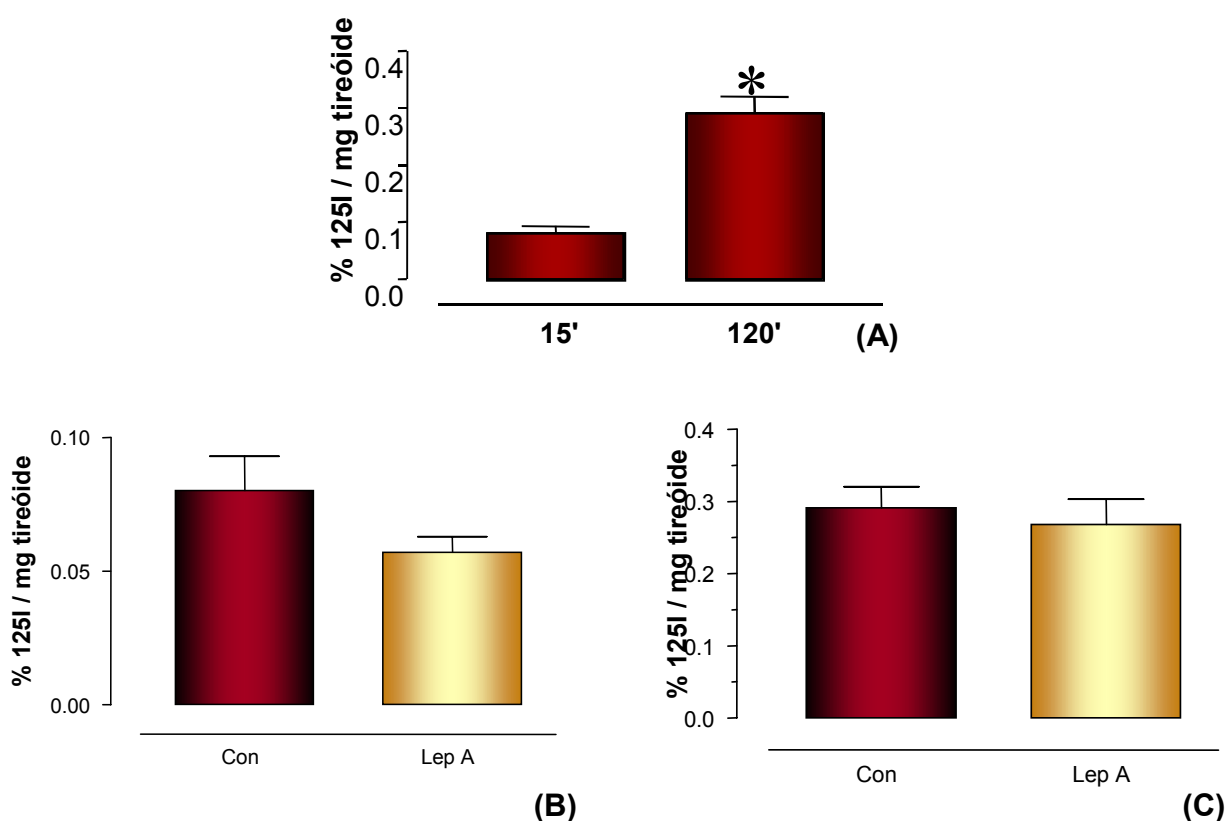
O gráfico 1 mostra que o PC e a MGV dos animais não se modificaram após 2 horas da administração sistêmica de leptina na dose de  $8\mu\text{g}/100\text{g}$  PC.



**Gráfico 1:** PC (A) e MGV (B) de animais após 2 horas da injeção com leptina (Lep A) ou não (Con), na dose de  $8\mu\text{g}/100\text{g}$  PC s.c. Dados expressos como média  $\pm$  EPM (n=7).

## Captação tireoideana de <sup>125</sup>I de ratos submetidos ao tratamento agudo com leptina

Os animais controles apresentaram captação tireoideana de <sup>125</sup>I em 120 minutos significativamente maior (+64%) que em 15 minutos (gráfico 2A). Após 2 horas da injeção de leptina (8μg/100g PC s.c.) a captação tireoideana de <sup>125</sup>I de 15 minutos tendeu a diminuir (-29%) e não foi diferente após 120 minutos (gráficos 2B e 2C respectivamente). O tratamento não modificou o peso tireoideano (ver anexo).



**Gráfico 2:** Percentual de captação de 15 e 120 minutos de <sup>125</sup>I pelo tecido tireoideano de ratos controles (A). Captação tireoideana de <sup>125</sup>I após 15 (B) e 120 (C) minutos de administração nos animais tratados (Lep A) ou não (Con) com leptina (8μg/100g PC s.c.). Dados expressos como média ± EPM, \*p<0,05 (n=7).

**Concentrações hormonais**  
**de ratos submetidos ao tratamento agudo com leptina**

Como pode ser verificado na tabela 1, o grupo Lep A apresentou aumento significativo de leptina (1,2 vezes), T4 (+34%), T3 (+64%), TSH (+64%) e corticosterona (+20%) séricos. A relação T3/T4 apresentou-se maior em 25% (Con=  $0,838 \times 10^{-3} \pm 0,12 \times 10^{-3}$  vs Lep A=  $1,05 \times 10^{-3} \pm 0,13 \times 10^{-3}$  - n=6), embora não significativamente. Não observamos alteração no TSH intrahipofisário entre os grupos Con e LepA (Con=  $9,43 \pm 0,901$  vs Lep A=  $7,73 \pm 0,513$  -  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de ptn - n=7).

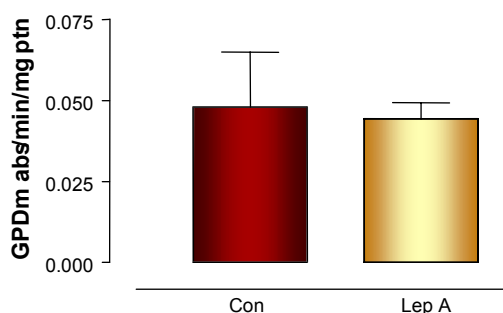
**TABELA 2: Concentrações séricas de leptina, HTs, TSH e corticosterona de ratos adultos submetidos ao tratamento agudo com leptina**

Grupos	Leptina (ng/ml)	T3 livre (pg/ml)	T4 livre (ng/ml)	TSH (ng/ml)	Corticosterona (ng/dl)
<b>Con</b>	1,79 ± 0,12	1,54 ± 0,23	1,69 ± 0,07	1,21 ± 0,07	226 ± 13,6
<b>Lep A</b>	3,92 ± 0,27*	2,53 ± 0,35*	2,27 ± 0,18*	1,99 ± 0,21*	270 ± 4,5*

Dados expressos como média ± EPM, \*p<0,05 ou menos (n=6-7).

**Atividade da enzima GPDm em fígado**  
**de ratos submetidos ao tratamento agudo com leptina**

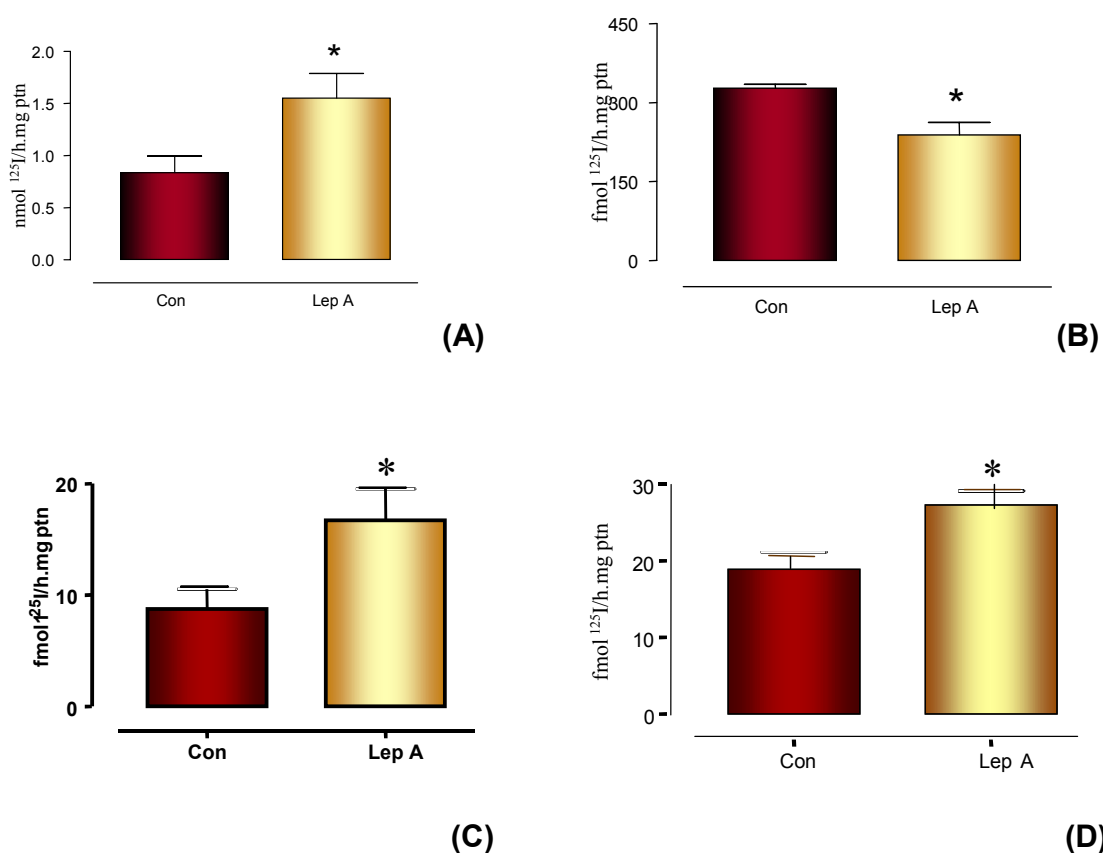
No gráfico 3, podemos verificar que o tratamento agudo com leptina não alterou a atividade da GPDm hepática dos animais.



**Gráfico 3 :** Atividade da enzima GPD em fração mitocondrial hepática de ratos adultos após 2 horas da administração de leptina (8 $\mu\text{g}/100\text{g}$  PC s.c.). Dados expressos como média ± EPM (n=7).

## Atividade desidase em diferentes tecidos de ratos submetidos ao tratamento agudo com leptina

O grupo injetado com a dose aguda de leptina apresentou maior atividade D1 hepática (+85%,  $P < 0,05$ , gráfico 4A), D1 e D2 muscular (1,3 vezes e +45% respectivamente,  $P < 0,05$ , gráficos 4C e 4D) e menor atividade D2 no TAM (-28%,  $p < 0,05$ , gráfico 4B).

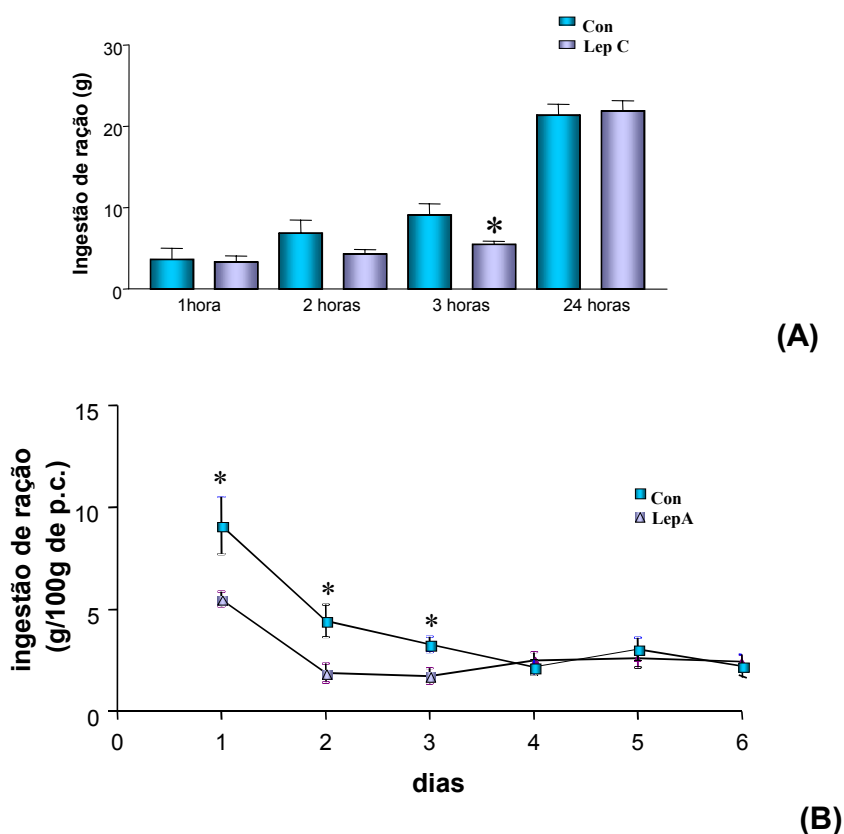


**Gráfico 4:** Atividade D1 hepática (A), D2 do TAM (B), D1 e D2 muscular (C e D) de ratos adultos após 2 horas da administração de leptina ( $8\mu\text{g}/100\text{g PC s.c.}$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $*p < 0,05$  ( $n = 5-7$ ).

## II ) TRATAMENTO CRÔNICO COM LEPTINA

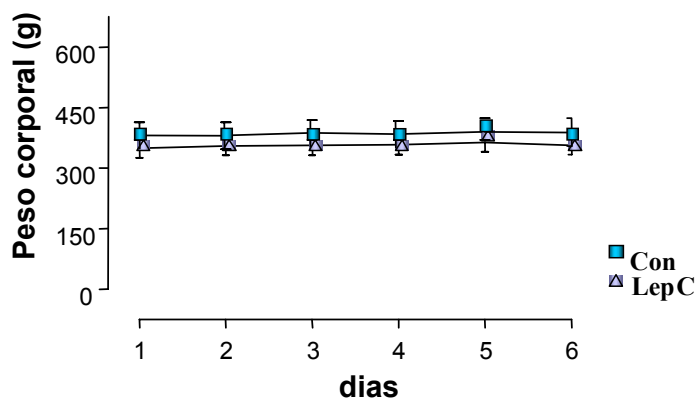
### Avaliação nutricional de ratos injetados com leptina durante 6 dias consecutivos

A evolução da ingestão de ração de ratos tratados cronicamente com leptina é mostrada no gráfico 5. A leptina, após 3 horas de sua administração, reduziu a ingestão alimentar no grupo Lep C (-47%,  $p < 0,05$ , gráfico 5A), sendo este efeito observado apenas nos 3 primeiros dias do tratamento. No 4º, 5º e 6º dias de tratamento com leptina, os grupos não apresentaram mais essa diferença no consumo de ração (gráfico 5B).



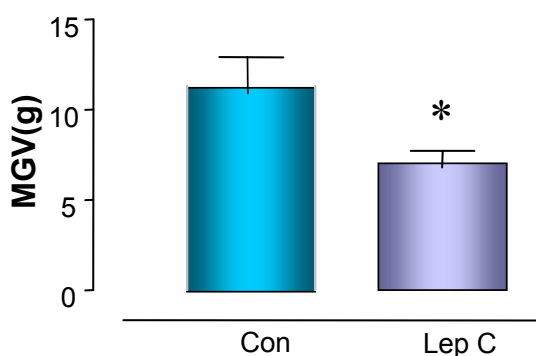
**Gráfico 5:** Ingestão de ração de ratos tratados cronicamente com leptina ( $8\mu\text{g}/100\text{g PC s.c.}$ ) no primeiro dia de tratamento (A), sendo que nos dois outros dias subsequentes o padrão de resposta foi mantido. Evolução da ingestão alimentar na terceira hora após injeção diária de leptina (B). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $*p < 0,05$  ( $n=8$ ).

Verificamos que a evolução do peso corporal durante o tratamento crônico com leptina, após 24 horas de aplicação, não foi diferente entre os grupos (gráfico 6).

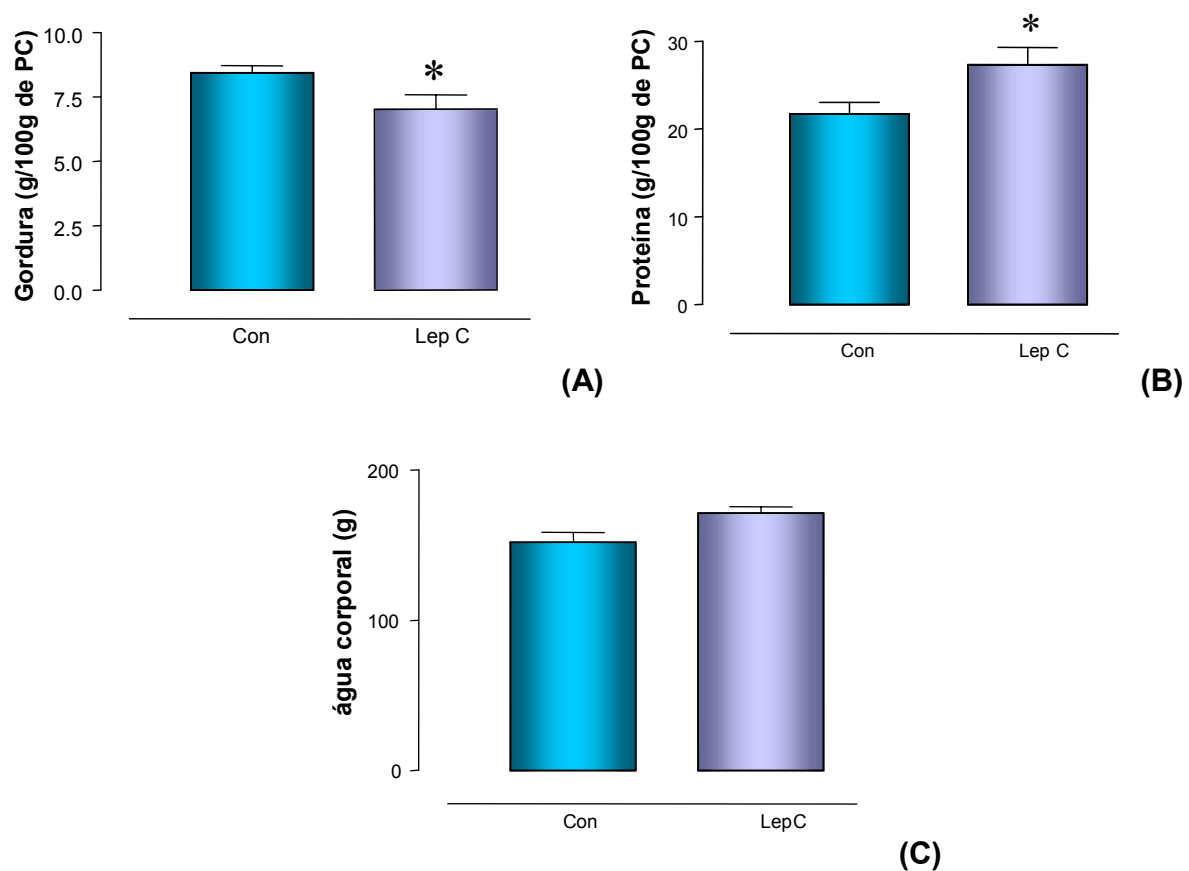


**Gráfico 6:** Evolução do peso corporal de ratos tratados cronicamente com leptina ( $8\mu\text{g}/100\text{g PC s.c.}$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=8$ ).

Apesar de não ter ocorrido alteração no PC dos ratos tratados por 6 dias com leptina, estes exibiram diferença quanto a composição corporal. No dia do sacrifício, grupo Lep C apresentou menor MGV (-38%  $p<0,05$ , gráfico 7) e menor gordura corporal total (-17%,  $p<0,05$  gráfico 8A). Estes animais exibiram maior quantidade de proteína na carcaça (+26%,  $p<0,05$ , gráfico 8B), sem alteração na quantidade de água corporal (gráfico 8C).



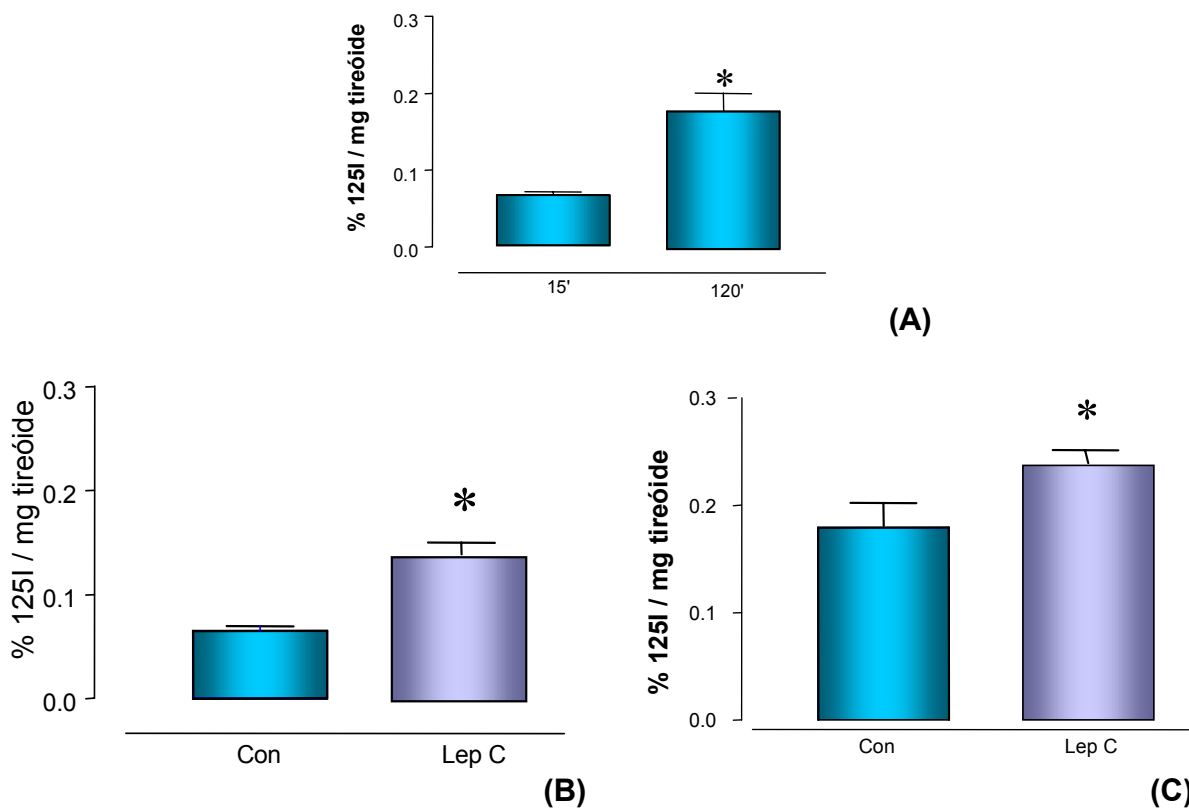
**Gráfico 7:** MGV de ratos tratados cronicamente com leptina ( $8\mu\text{g}/100\text{g PC s.c.}$ ) Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $*p<0,05$  ( $n=7$ ).



**Gráfico 8:** Gordura (A), proteína (B) e água (C) corporais por 100g de PC de ratos tratados cronicamente com leptina (8µg/100g PC s.c.). Dados expressos como média ± EPM, \*p<0,05 (n=7).

### Captação tireodeana de <sup>125</sup>I de animais injetados com leptina durante 6 dias consecutivos

Os animais controles apresentaram captação tireodeana de <sup>125</sup>I em 120 minutos maior (+72%, p<0,05) que em 15 minutos (gráfico 9A). O grupo Lep C apresentou maior captação tireodeana de <sup>125</sup>I tanto em 15 (+1,3 vezes) quanto em 120 (+33%) minutos (gráficos 9B e 9C respectivamente, p<0,05). Não observamos modificação no peso tireoideo com o tratamento crônico com leptina (ver anexo)



**Gráfico 9:** Percentual de captação de 15 e 120 minutos de  $^{125}\text{I}$  pelo tecido tireoideano de ratos controles (A). Captação de  $^{125}\text{I}$  após 15 minutos (B) e 120 minutos (C) de sua administração nos animais tratados (Lep C) ou não (Con) cronicamente com leptina ( $8\mu\text{g}/100\text{g}$  PC s.c.). Dados expressos como média  $\pm$  EPM \* $p < 0,05$ , ( $n=7-8$ ).

### Concentrações hormonais dos animais injetados com leptina durante 6 dias consecutivos

Na tabela 3, mostramos que o grupo Lep C apresentou maior leptinemia (+36%) e corticosteronemia (+1,1 vezes,  $p < 0,05$ ). O tratamento crônico com leptina não alterou o T4 circulante e tendeu a aumentar tanto o T3 sérico (33%), como a relação T3/T4 em 61% (Con=  $1,047 \times 10^{-3} \pm 0,09 \times 10^{-3}$  vs Lep C  $1,69 \times 10^{-3} \pm 0,33 \times 10^{-3}$  -  $p < 0,091$  -  $n=6$ ). Estes animais apresentaram menor TSH intra-hipofisário (-45%, Con=  $8,69 \pm 1,26$  vs Lep C=  $4,82 \pm 0,65$  -  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de ptn -  $n=7$  -  $p < 0,05$ ) e somente tendência a menor TSH sérico (-25%).



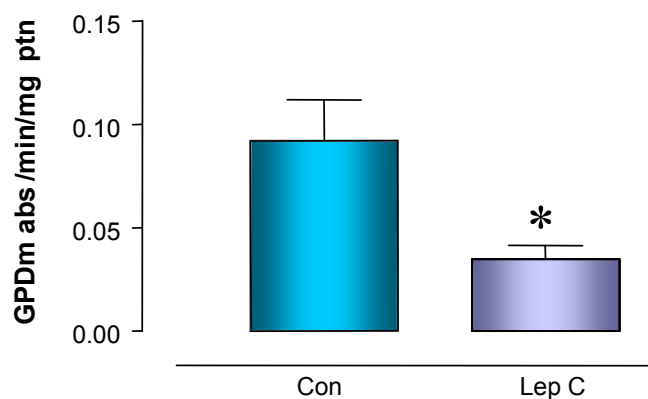
**TABELA 3: Concentrações séricas de leptina, HTs, TSH e corticosterona de ratos injetados cronicamente com leptina**

Grupos	Leptina (ng/ml)	T3 livre (pg/ml)	T4 livre (ng/ml)	TSH (ng/ml)	Corticosterona (ng/dl)
Con	3,50 ± 0,42	2,43 ± 0,24	2,07 ± 0,15	1,53 ± 0,21	215 ± 37,6
Lep C	4,78 ± 0,79	3,25 ± 0,47	2,29 ± 0,18	1,15 ± 0,28	450 ± 43,5*

Dados expressos como média ± EPM, \*p<0,05 (n = 7).

### **Atividade da enzima GPDm em fígado de animais injetados com leptina durante 6 dias consecutivos**

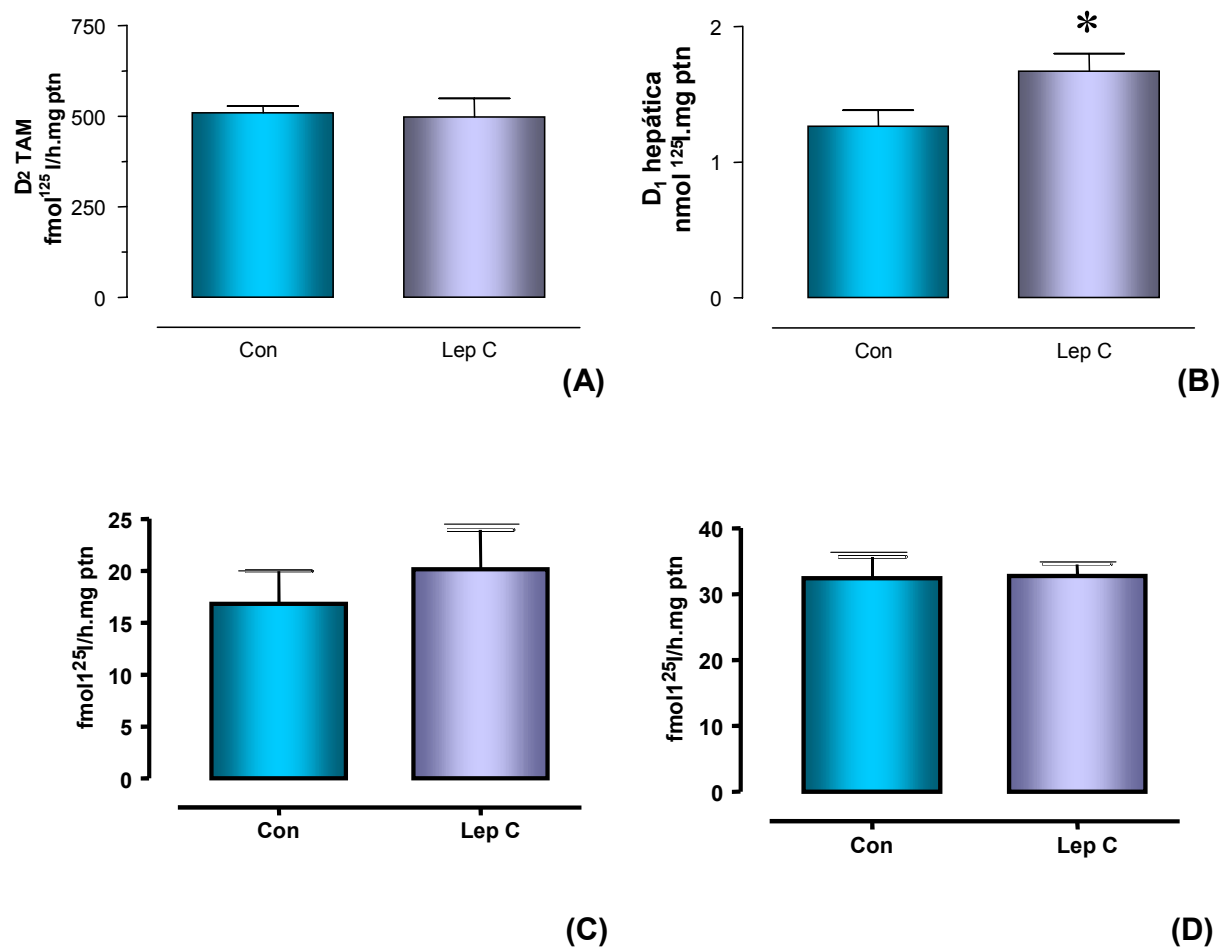
O tratamento crônico com leptina provocou queda (-1,7 vezes, p<0,05) na atividade da enzima GPDm hepática, como pode ser visto no gráfico 10.



**Gráfico 10:** Atividade da enzima GPDm em fração mitocondrial hepática de ratos adultos que receberam injeção crônica leptina (8µg/100g PC s.c.). Dados expressos como média ± EPM, \*p<0,05 (n=7).

## Atividade desidase em diferentes tecidos de animais injetados com leptina durante 6 dias consecutivos

O tratamento crônico com leptina promoveu aumento significativo (+32%,  $P < 0,05$ ) da atividade D1 hepática (gráfico 11B). Não detectamos alteração das atividades D2 no TAM, D1 e D2 muscular (gráficos 11A, 11C e 11D, respectivamente).

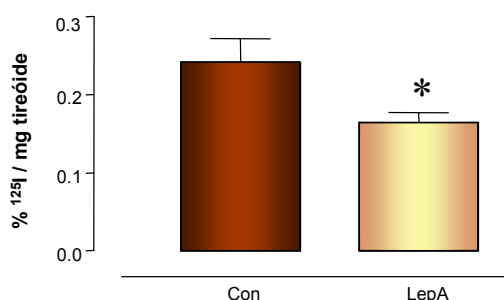


**Gráfico 11:** Atividade D2 do TAM (A), D1 hepática (B), D1 e D2 muscular (C e D) de ratos injetados cronicamente com leptina ( 8 $\mu$ g/100g PC s.c.). Dados expressos como média  $\pm$  EPM, \* $p < 0,05$  (n=5-7).

### III) EXPERIÊNCIA “IN VITRO”

#### Avaliação da captação “in vitro” de $^{125}\text{I}$ por tireóides de ratos tratados agudamente com leptina

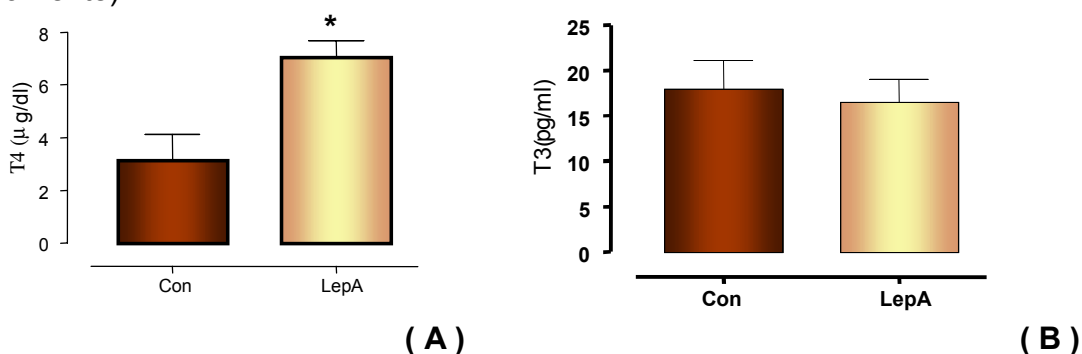
As tireóides de ratos tratados com uma única injeção de leptina ( $8\mu\text{g}/100\text{g}$  PC s.c.) apresentaram diminuição ( $-32\%$ ,  $p<0,05$ ) na captação “in vitro” de  $^{125}\text{I}$  (gráfico 12).



**Gráfico 12:** Captação “in vitro” de  $^{125}\text{I}$  /g de tecido tireoideano de ratos tratados agudamente com leptina ( $8\mu\text{g}/100\text{g}$  PC s.c.). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $*p<0,05$  ( $n=7$ ).

#### Secreção “in vitro” de T3 e T4 de tireóides de ratos tratados agudamente com leptina

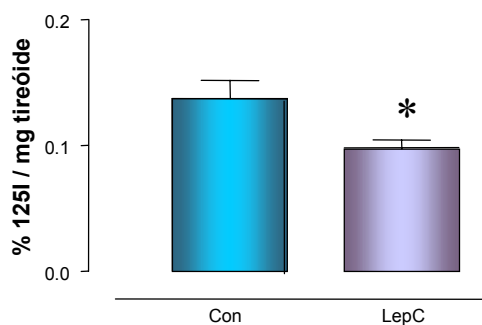
O tratamento agudo com leptina promoveu aumento na secreção “in vitro” de T4 ( $+1,25$  vezes,  $p<0,05$ ), mas não alterou a secreção de T3 (gráficos 13A e 13B respectivamente).



**Gráfico 13:** Liberação de T4 (A) e T3 (B) para o meio de incubação de explantes tireoideanos de ratos tratados com dose única de leptina 2 horas antes do sacrifício. Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $*p<0,05$  ( $n=7$ ).

### Avaliação da captação “in vitro” de <sup>125</sup>I por tireóides de ratos tratados cronicamente com leptina

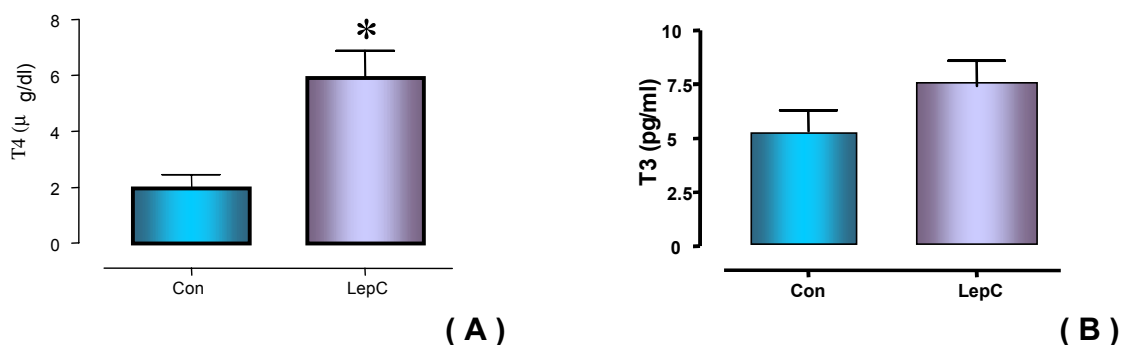
As tireóides de ratos tratados cronicamente com leptina (8µg/100g PC/ 6 dias s.c.) apresentaram redução (-29%, p<0,05) na captação “in vitro” de <sup>125</sup>I (gráfico 14).



**Gráfico 14:** Captação “in vitro” de <sup>125</sup>I / g de tecido tireoideana de ratos tratados cronicamente com leptina (8µg/100g PC/ 6 dias s.c.). Dados expressos como média ± EPM, \*p<0,05 (n=7).

### Secreção “in vitro” de T3 e T4 de tireóides de ratos tratados cronicamente com leptina

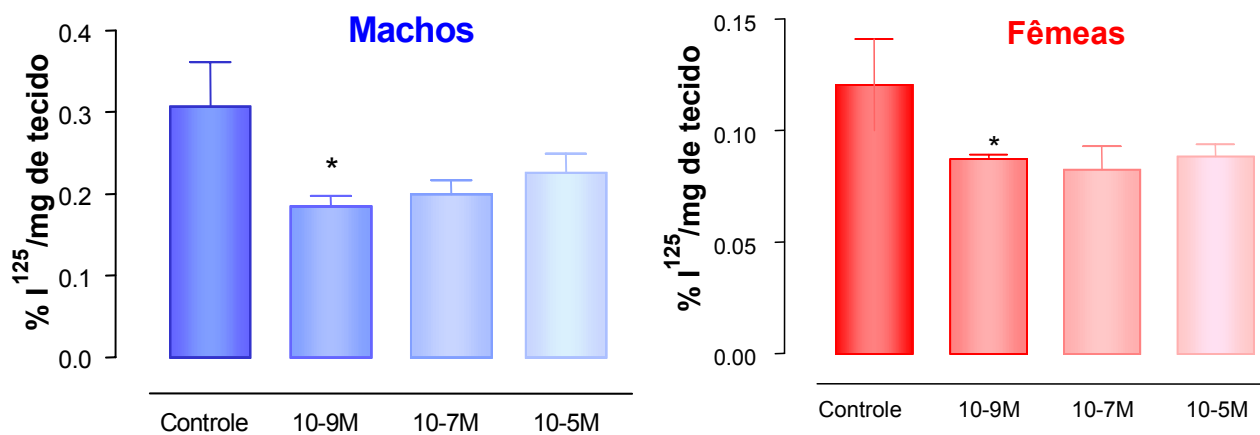
O tratamento crônico com leptina promoveu elevação significativa na secreção “in vitro” de T4 (+2 vezes), além de elevar a liberação de T3 em 40%, embora este não tenha sido significativo (gráficos 15A e 15B respectivamente).



**Gráfico 15:** Secreção de T4 (A) e T3 (B) para o meio de incubação de explantes tireoideanos de ratos tratados com leptina durante 6 dias consecutivos. Dados estão expressos como média ± EPM, \*p<0,05 (n=7).

## Captação de $^{125}\text{I}$ “in vitro” por tireóides de ratos adultos eutireoideos incubadas com leptina

A adição de concentrações distintas de leptina provocou redução da captação “in vitro” de  $^{125}\text{I}$  por explantes tireoideanos de ratos machos ( $10^{-9}\text{M}$ : 35%  $p < 0,05$ ,  $10^{-7}\text{M}$ : 30%,  $10^{-5}\text{M}$ : 20%) e fêmeas ( $10^{-9}\text{M}$ : 28%  $p < 0,05$ ,  $10^{-7}\text{M}$ : 32%,  $10^{-5}\text{M}$ : 27%) como mostrado no gráfico abaixo (16).



**Gráfico 16:** Captação “in vitro” de  $^{125}\text{I}$  /g de explantes tireoideanos isolados de ratos eutireoideos, incubados na ausência (controle) ou presença de leptina em diferentes concentrações ( $10^{-9}\text{M}$ ,  $10^{-7}\text{M}$ ,  $10^{-5}\text{M}$ ). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  vs C (n=7).

**Quadro 2:** resumo dos dados dos experimentos em ratos adultos tratados com dose única de leptina (8µg/100g PC/2h) ou com dose crônica (8µg/ 100g PC/6 dias)

<b>Ratos adultos tratados com leptina</b>		
<b>PARÂMETROS</b>	<b>DOSE AGUDA</b>	<b>DOSE CRÔNICA</b>
Peso corporal	N	N
MGV	N	↓
Gordura Corporal	-	↓
Proteína Corporal	-	↑
Água Corporal	-	N
Leptinemia	↑	N
Corticosteronemia	↑	↑
<b>Conteúdo Tiroideano de <sup>125</sup>I</b>		
Conteúdo Tiroideano de <sup>125</sup> I ("in vivo" - 15')	N	↑
Conteúdo Tiroideano de <sup>125</sup> I ("in vivo" - 2h)	N	↑
Conteúdo Tiroideano de <sup>125</sup> I ("in vitro")	↓	↓
T <sub>3</sub> sérico livre	↑	N
T <sub>4</sub> sérico livre	↑	N
T <sub>3</sub> (meio)	N	N
T <sub>4</sub> (meio)	↑	↑
TSH sérico	↑	↓
TSH intrahipofisário	N	↓
<b>Atividade D<sub>1</sub> hepática</b>		
GPDm	N	↓
Atividade D <sub>1</sub> hepática	↑	↑
<b>Atividade D<sub>2</sub> muscular</b>		
Atividade D <sub>2</sub> TAM	↓	N
Atividade D <sub>1</sub> muscular	↑	N
Atividade D <sub>2</sub> muscular	↑	N

N - normal    ↑ - aumentado    ↓ - diminuído

**Discussão**

A detecção da expressão do receptor de leptina de forma longa (Ob-Rb) na tireóide “in vivo” por imunohistoquímica, “western blotting” e RT-PCR (Nowak et al., 2002) e em cultura de células FRTL-5 por RT-PCR (Isozaki et al., 2004) sugere um efeito modulatório direto da leptina sobre esta glândula. Porém, estudos associando leptina e função tireoideana, tanto em humanos como em animais experimentais, ainda são muito limitados e controversos. Alguns estudos consideram não existir uma relação relevante entre leptina e função tireoideana (Song et al., 2000; Simo et al., 2000; Tagliaferri et al., 2001; Gomez et al., 2002). Mas estes, tratam-se de estudos clínicos e, portanto, englobando todas as limitações características deste tipo de estudo. Por outro lado, diversos estudos experimentais bem conduzidos demonstram a íntima relação entre leptina e função tireoideana (Ahima et al., 1996; Escobar-Morreale, 1997; Yoshida et al., 1997; Legradi et al., 1997, Yoshida et al., 1998; Baskin et al., 1998; Baskin et al., 1999; Nillni et al., 2000; Baskin et al., 2000; Seoane et al., 2000; Harris et al., 2001; Rosenbaum et al., 2002; Nowak et al., 2002; Ortiga-Carvalho et al., 2002, Lisboa et al., 2003, Isozaki et al., 2004; Da Veiga et al., 2004, Lins et al., 2005)

Recentemente, em nosso laboratório (Lins et al. 2005) foi observado que o tratamento de ratas lactantes com leptina ao fim da lactação provocou um aumento na captação de <sup>125</sup>I pela tireóide, sugerindo um estímulo da leptina sobre a transferência de iodo neste tecido. Em um modelo de programação pelo tratamento da prole com leptina nos 10 primeiros dias de lactação, detectou-se uma hiperleptinemia na idade adulta da prole, entretanto sem qualquer alteração correspondente da captação tireoideana de iodo (Teixeira et al., 2003). Nestes dois estudos, a hiperleptinemia ocorre em situações particulares e em outros modelos que estudamos, onde detectamos variações de leptina circulante, sem termos injetado previamente leptina, tivemos modificações da captação tireoideana, porém nem sempre no mesmo sentido (Passos et al., 2002; Bonomo, 2004; Santos, 2005). Portanto, resolvemos verificar o efeito da leptina em ratos adultos eutireoideos sobre a captação tireoideana, já que esta comprovadamente afeta a função tireoideana.



Realizamos, também, um estudo mais abrangente do papel da leptina sobre a modulação de diversos parâmetros relacionados à função tireoideana, os quais não foram abordados antes e sua repercussão sobre o peso corporal.

### EFEITO DIRETO E INDIRETO DA LEPTINA NA TIREOIDE

Em nosso modelo experimental, ambos os tratamentos com leptina (agudo e crônico) provocaram hiperleptinemia, o que comprova o acerto em dosar a leptina sérica duas (agudo) a três (crônico) horas após a injeção.

Na hiperleptinemia aguda, observamos que a captação tireoideana “in vivo”, 15 minutos após administração do  $^{125}\text{I}$ , que reflete a atividade do NIS (Ferreira et al., 2005), apresenta-se discretamente diminuída, sem significância estatística. Após 2 horas de injeção “in vivo” de  $^{125}\text{I}$  (que corresponde a atividade do NIS e da TPO), não detectamos alteração da captação tireoideana nos animais do grupo LepA. Contudo, quando analisamos a captação de  $^{125}\text{I}$  das tireóides isoladas do grupo LepA, verificamos que estas glândulas apresentam menor conteúdo intra-tireoideano de  $^{125}\text{I}$ , sugerindo menor captação. Uma possível explicação para estes achados discordantes seria o aumento de TSH circulante, no experimento “in vivo”, visto este ser um conhecido modulador positivo da atividade do NIS, contra-regulando o efeito inibitório da leptina.

Demonstramos também que a hiperleptinemia crônica estimula a captação tireoideana de  $^{125}\text{I}$ , após 15 minutos ou 2 horas de sua administração “in vivo”. Efeito este, aparentemente, independente do TSH, que se encontra em concentrações normais no soro destes animais. Já no sistema “in vitro” de incubação dos explantes tireoideanos dos animais LepC, detectamos inibição da captação de  $^{125}\text{I}$ , comparado aos animais controles, novamente sugerindo um papel supressório da leptina sobre a tireóide. “In vivo”, é possível que a exposição prolongada a leptina provoque a liberação de fatores desconhecidos que estimulam a captação de  $^{125}\text{I}$ , e que sobrepujam seu efeito inibitório sobre o NIS. Como os nossos dados da incubação de tireóides de ratos eutireoideos de ambos os sexos com leptina “in vitro” mostraram uma ação inibitória direta deste hormônio (gráfico 16, página 45), acreditamos que o efeito “in vivo” (estimulatório) seja,

realmente, indireto. Além disso, não podemos descartar que um destes fatores seja o próprio TSH, que apesar de normal na circulação, pode estar biologicamente mais ativo, visto que o TRH estimula a produção de moléculas de TSH bioativas (Magner, 1990; Magner et al., 1992) e este hormônio é estimulado pela leptina (Legradi et al., 1998). Outra possibilidade é o estímulo ao aumento do número de receptores de TSH na tireoide causado pela exposição crônica à leptina, porém não temos evidências na literatura sobre este provável efeito.

Uma outra explicação possível para a diminuição da captação de  $^{125}\text{I}$  na incubação “in vitro” das glândulas dos ratos tratados com leptina por 6 dias, é a retirada da influência dos fatores estimulatórios endógenos. E ainda, se “in vivo” estas glândulas possuem um conteúdo maior de iodo frio pela captação aumentada, então “in vitro”, ainda com um elevado conteúdo de iodo frio, reflexo do tratamento “in vivo”, poderia haver maior dificuldade de captar  $^{125}\text{I}$  devido ao gradiente eletroquímico.

É relevante destacar que além do nosso estudo, outros também já encontraram ações opostas “in vivo” e “in vitro”, quanto a diferentes parâmetros investigados (Mitsuma & Nogimori, 1984; Ottlecz et al., 1988; Rettori et al., 1992; Moura et al., 1999; Ortiga et al. 2002).

Recentemente, Isozaki et al. (2004) realizaram um estudo verificando a ação direta da leptina sobre a proliferação celular tireoideana, expressão da Tg, bem como atividade e expressão do NIS, utilizando cultura de células FRTL-5. Foi constatado que a transcrição do gene c-fos, que indica uma resposta precoce a sinais relacionados à proliferação e diferenciação de tireócitos, foi estimulada pela leptina de forma similar ao efeito do TSH. Já a expressão da Tg foi suprimida pela leptina. Na experiência de avaliação do NIS, as células foram mantidas por 2 dias em meio com TSH ou cAMP, na presença ou ausência de leptina. Estas células receberam  $\text{Na}[^{125}\text{I}]$ , com ou sem perclorato de sódio por 1h, sendo a captação definida pela diferença de radioatividade intracelular total com e sem perclorato de sódio. Foi verificada menor atividade e expressão do NIS induzidas pelo TSH e cAMP, após a incubação com leptina. Quanto a produção de AMPc estimulada pelo TSH, esta foi potencializada pela leptina. E mais,

quando as células FRTL-5 foram incubadas em meio enriquecido com TSH e insulina, a leptina promoveu inibição da síntese de DNA (incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina). Este estudo mostra que na tireóide, ao mesmo tempo, a leptina pode ter efeitos estimulatórios e inibitórios, que provavelmente ocorrem por mecanismos intracelulares distintos. Estes achados ajudam a explicar a aparente contradição de nossos resultados da administração crônica “in vivo” e “in vitro”. Acreditamos que o efeito da leptina sobre a atividade do NIS seja inibitório, porém como “in vivo” pode estar ocorrendo um aumento da proliferação folicular tireoideana, a captação total está aumentada.

Como a leptina é uma citocina, um aspecto interessante a se considerar, é que certas citocinas, como o  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\alpha$  e  $\text{IFN-}\gamma$ , inibem a expressão do NIS basal ou induzida por TSH e a captação de iodo em células FRTL-5 (Ajjan et al., 1998). Carrasco et al. (1999) criaram um camundongo transgênico que super-expressa  $\text{INF-}\gamma$  na tireóide. A presença desta citocina não afetou a expressão de Tg, elevou a expressão da TPO e do receptor de TSH e reduziu a expressão do NIS, que refletiu em menor acúmulo de iodo.

Como já comentamos, Nowak et al. (2002) detectou pela primeira vez o Ob-Rb em tireóides de ratas normais, demonstrando a existência de uma ação direta da leptina sobre esta glândula. Neste estudo, o tratamento com leptina por 6 dias resultou em aumento do volume da tireóide e de HTs séricos, com redução do TSH sérico. Já em nosso trabalho, o tratamento com leptina pelo mesmo período não alterou o peso glandular, nem a concentração sérica de HTs ou TSH. Ressaltamos que o nosso estudo foi conduzido em ratos machos, e assim sugerimos uma influência gênero-dependente na ação da leptina sobre a tireóide. Apesar de muitas controvérsias, inúmeros autores relatam a modulação dos esteróides sexuais sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, visto que doenças tireoideanas são bem mais freqüentes em mulheres do que em homens (Mason et al, 1996; Correa da Costa 2000; Moura et al., 2001; Lisboa et al 2001; Lisboa et al 1997; Moreira et al 1997; Borges et al., 1998, Moreira et al., 2005). Portanto, é possível que o efeito direto da leptina na tireóide seja mais exacerbado em fêmeas,

talvez por uma diferença no número de Ob-Rb, porém na literatura, não há dados que abordem a detecção deste receptor para leptina em tireóide de ratos machos.

Em nosso modelo experimental, vários fatores podem eventualmente participar da modulação da entrada de iodeto na tireóide murina, desencadeados em resposta a hiperleptinemia aguda e crônica, como por exemplo, insulina e/ou glicocorticóides, entre outros.

Segundo Gregory et al. (1992), insulina potencializa o efeito do TSH sobre a captação e a organificação de iodo em cultura de tireócitos, e de acordo com outros autores (Burikhanov et al., 1996; Deleu et al., 1999), insulina e IGF-1 são importantes para a ação mitogênica do TSH. Contudo, Trapasso et al. (1999) mostrou que a insulina reduz o RNAm para NIS em cultura de células tireoideanas. Estes dados mostram que a insulina pode aumentar o efeito positivo do TSH, embora tenha um efeito supressor direto sobre o NIS, da mesma forma que estamos sugerindo para a leptina. É pouco provável que a insulina seja um mediador deste efeito da leptina, visto que a leptina inibe a secreção de insulina (Kieffer & Habener, 2000) e reduz seus níveis plasmáticos (Malendowicz et al., 2004).

O cortisol estimula o efeito do TSH sobre o NIS, porém diferente da insulina, não tem efeito direto sobre este co-transportador (Gregory et al., 1992). Os animais LepA e LepC apresentam hipercorticosteronemia e, portanto, a corticosterona pode ajudar a explicar o efeito estimulatório da captação de  $^{125}\text{I}$  "in vivo" observado no experimento crônico.

Assim, estes resultados sugerem que existam vias alternativas e interligadas (*crosstalking*) no controle da captação tireoideana pela leptina.

Nossos resultados "in vitro" sugerem que a leptina atue diretamente no tireócito gerando uma inibição da captação de  $^{125}\text{I}$ , porém estimulando a liberação de T4. Já "in vivo", a leptina apresenta diferentes efeitos sobre a tireóide, de acordo com o período de

exposição, o que pode indicar que assim como para a captação tireoideana, mecanismos contra-regulatórios estejam envolvidos nos processos de secreção de HTs.

Vários estudos demonstram um efeito estimulatório da leptina sobre a síntese e secreção de TSH em modelos experimentais (Ahima et al., 1996; Legradi et al., 1997; Legradi et al., 1998; Seoane et al., 2000; Ortiga-Carvalho et al., 2000; Ghizzonni et al., 2001). Uma resposta inibitória “in vitro”, contrária ao que ocorre “in vivo”, foi observado tanto em adeno-hipófises de ratos eutireoideos (Ortiga-Carvalho et al., 2000) quanto em hipertireoideos (Da Veiga et al., 2004). Em nosso modelo, também verificamos este efeito contrário, onde a leptina estimulou a captação tireoideana de  $^{125}\text{I}$  “in vivo”, contudo inibiu “in vitro”.

O tratamento agudo com leptina aumentou as concentrações séricas de TSH e de HTs livre, sem modificar o conteúdo de TSH intra-glandular. Tal perfil hormonal reflete a ação direta e/ou indireta da leptina sobre o eixo hipófise-tireóide. Quando quantificamos os HTs “in vitro” do grupo LepA, verificamos um aumento de T4 no meio de incubação, sem alteração na concentração de T3. Este achado indica um efeito da leptina sobre a secreção tireoideana de tiroxina. Assim, o alto T3 demonstrado na hiperleptinemia aguda “in vivo” pode ser resultante da desiodação periférica.

O tratamento crônico com leptina não foi capaz de alterar o TSH e os HTs circulantes. Apesar do efeito estimulatório “in vivo” da leptina sobre o TSH estar bem documentado, detectamos que a administração prolongada de leptina provocou uma redução significativa do conteúdo intra-glandular de TSH. Uma explicação possível para este achado seria uma menor atividade D2 hipofisária, reduzindo a conversão de T4 a T3, o T4 então estaria inibindo a síntese de TSH. Verificamos, que o grupo LepC apresentou aumento de secreção de T4 “in vitro”. Como este aumento da atividade secretória da glândula tireóide não foi evidenciada “in vivo”, acreditamos que isto se deva a outros fatores dependentes de leptina que poderiam modular negativamente a secreção de HTs, tais como as catecolaminas. Ou que mesmo em presença de uma secreção aumentada de T4, a exposição prolongada à leptina estaria de alguma forma aumentando a atividade das sulfotransferase hepática, levando uma maior sulfatação do

T4, fazendo com que a D1 hepática elevada, catalise preferencialmente o anel interno do T4, formando mais rT3. Uma outra explicação possível, a qual forneceremos mais subsídios quando discutirmos a ingestão alimentar é uma resistência à ação da leptina. Esta resistência tireoideana pode ser parcial, permitindo o efeito estimulatório sobre a captação de <sup>125</sup>I, provavelmente por se tratar de um efeito indireto e abolindo o efeito estimulatório sobre a secreção hormonal.

Previamente foi detectado que a administração de leptina por 2 horas não modificou os HTs séricos totais (Lisboa et al 2003), porém elevou o TSH (Ortiga et al., 2002; Lisboa et al., 2003). No estudo atual, apesar de não termos dosado os HTs totais, verificamos que a injeção aguda de leptina reproduziu o alto TSH sérico. Todavia, detectamos elevação de T3 e T4 livres. Então é possível crer que a leptina tenha algum papel inibidor sobre as proteínas carreadoras de HTs (TTR ou TBG) em animais normais, apesar de Legradi et al. (1997) não ter encontrado efeito em animais em jejum.

No presente estudo, quantificamos a atividade da enzima GPDm hepática, considerada um importante marcador do estado tireoideano, visto encontrar-se diminuída no hipotireoidismo e elevada no hipertireoidismo (Coleoni et al., 1983; Brown et al., 2002). Observamos que a atividade GPDm dos animais tratados agudamente com leptina, não foi diferente dos animais controles, apesar da elevação de T4 e T3 livres séricos. Já o tratamento crônico com leptina ocasionou uma acentuada diminuição da atividade GPDm hepática, embora não tenhamos detectado alterações nos níveis de HTs. Já foi relatado que a leptina tem um efeito inibitório sobre enzimas lipogênicas, como por exemplo, a enzima málica (Nogalska et al., 2003). Nossos dados sugerem que a leptina suprime a GPDm, mesmo na vigência de HTs altos, como no caso do tratamento agudo. Assim na hiperleptinemia aguda, a hipertiroxinemia deve estar equilibrando o efeito supressor da leptina, mantendo normal a função da GPDm, enquanto na hiperleptinemia crônica, como o T4 está inalterado, o efeito predominante é a regulação negativa da função desta enzima.

Estudos demonstraram que a leptina é capaz de modular a atividade desidase em diferentes tecidos (Hillgartener & Romsos, 1985; Kates & Himms-Hagen, 1985;

Kaplan & Young, 1987; Diano et al., 1998; Cusin et al., 2000; Cettour et al., 2001; Cettour-Rose et al., 2002; Cabanelas, 2003; Lisboa et al., 2003a; Lisboa et al., 2003b; Coppola et al., 2005). Em camundongos ob/ob, onde há ausência de leptina, verificou-se menor atividade D1 hepática e maior atividade D2 no TAM (Hillgartener & Romsos, 1985; Kates & Himms-Hagen, 1985; Kaplan & Young, 1987).

Verificamos que a leptina, aguda e cronicamente, estimulou a atividade D1 hepática, corroborando com estudos anteriores (Cusin et al., 2000; Cabanelas, 2003; Lisboa et al., 2003). Detectamos um aumento da atividade D1 e D2 muscular no tratamento agudo com leptina, enquanto que o tratamento crônico não alterou a atividade destas isoformas. Assim, na hiperleptinemia aguda, o aumento da atividade desidrase no músculo, associada ao aumento da atividade D1 no fígado, pode contribuir para a conversão periférica de T4 a T3, elevando o T3 circulante.

Recentemente demonstrou-se que a D1 é um marcador sensível do estado tireoideano periférico (Zavacki et al., 2005). Camundongos com TR $\alpha$ 1 mutado apresentam aumento de T3 sérico (1,9 vezes) e da expressão e atividade D1 (4 a 5 vezes), enquanto outros marcadores, como a GPDm aumentou apenas 1,7 vezes. A administração de T3 no hipotireoidismo elevou a D1 cerca de 175 vezes e a GPDm, somente 3 a 6 vezes. Assim acreditamos que a leptina acima dos valores normais, como no hipotireoidismo (Escobar-Morreale et al, 1997; Casimiro Lopes, 2004), mesmo que sendo reduzida pelo reposição com T3 é capaz de bloquear efetivamente a GPDm, sem afetar a ação do T3 sobre a D1, ou até mesmo em queda pela ação do T3, continuar sendo capaz de sinergizar o efeito do T3 sobre a D1.

Já a atividade D2 no TAM foi inibida pelo tratamento agudo com leptina, e manteve-se inalterada no tratamento crônico. Nosso achado agudo é condizente com a atividade D2 elevada no TAM de animais ob/ob (Kaplan & Young, 1987). Além disso, em um trabalho recente do nosso laboratório, ratos programados pela hipertiroxinemia na lactação, quando adultos, tornaram-se hiperleptinêmicos e apresentaram diminuição da atividade D2 no TAM, mesmo sendo hipotireoideos (Santos, 2005). Todavia, Cettour-

Rose et al. (2002) descreveu aumento da atividade D2 no TAM pelo tratamento i.c.v. com leptina durante 6 dias, entretanto, o mais provável, é que este efeito seja indireto através do estímulo noradrenérgico central.

Vários dados mostram a importância da ação da leptina sobre o sistema adrenérgico. A leptina estimula diretamente a síntese de catecolaminas, o que justifica a presença da isoforma Ob-Rb em células cromafins da medula adrenal em murinos, humanos, suínos e bovinos (Heggard et al., 1997, Glasow et al., 1998, Takekoshi et al., 1999, Nobuyula et al., 2000).

Anteriormente, Cabanelas (2003) observou que a injeção aguda de leptina reduziu a atividade D2 na adeno-hipófise. Recentemente, esta autora demonstrou que a injeção aguda de leptina reduziu a atividade D2 no TAM de animais adultos hipo e hipertireoideos (Cabanelas, 2005). Em nosso estudo, também detectamos este efeito nos ratos eutireoideos. É possível crer que este evento rápido seja por ação direta da leptina, uma vez que o Ob-Rb já foi identificado neste tecido (Kutoh et al., 1998). Contudo, a menor atividade D2 no TAM do grupo LepA, pode indiretamente ser causada pela hipertiroxinemia, pois está bem caracterizado que em diversos tecidos, a D2 é regulada inversamente pelos HTs, sendo diminuída no hipertireoidismo e aumentada no hipotireoidismo (Croteau et al., 1996; Burmeister et al., 1997).

Podemos ainda aventar a hipótese de que a menor atividade D2 no TAM dos ratos LepA, pode se dever a provável hipoinsulinemia ou ao aumento de GH. Dados mostraram que a insulina modula positivamente a D2 no TAM (Silva & Larsen, 1986; Mills et al., 1987). Como se sabe que a leptina causa hipoinsulinemia (Kieffer & Habener, 2000; Malendowicz et al., 2004), é possível que esta seja a causa da menor atividade D2 encontrada após a injeção aguda de leptina. Também se sabe que o GH modula negativamente a atividade D2 no TAM (Silva e Larsen; 1986b). E como a leptina estimula a secreção de GH (Carro et al., 1997), os animais do grupo LepA podem apresentar maior concentração de GH e assim, aconteceria a supressão da atividade D2 do TAM. Para confirmar tal hipótese, deveremos quantificar estes hormônios após o tratamento agudo com leptina.



Assim, sugerimos que a ação da leptina na modulação da atividade desidase seja tecido-específico e que o tempo de exposição à leptina também influencie o seu efeito sobre o metabolismo periférico dos HTs. É possível, assim como discutido anteriormente, que o tratamento crônico com leptina estimule fatores contra-reguladores que bloqueiam seu efeito agudo ou que a hiperleptinemia provoque cronicamente resistência dissociada à leptina. Desta forma, agudamente, além de estimular a produção de HTs, a leptina aumenta a sua ação tecidual no fígado e no músculo, contudo diminui seu efeito no TAM, modificando a quantidade de T<sub>3</sub> que interage com os receptores nestes tecidos. Este efeito agudo pode ter importância fisiológica na regulação do metabolismo pós-prandial, nestes tecidos.

## LEPTINA E CÓRTEX ADRENAL

Alguns estudos demonstram uma íntima relação entre leptina e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Nobuyuki et al., 2000; Akirav et al., 2004; Chanoine et al., 2004).

A presença das isoformas Ob-Ra e Ob-Rb no córtex adrenal porcino, demonstra um efeito direto da leptina sobre a secreção de corticosterona (Malendowicz et al 2004). O tratamento com leptina causa hipocorticosteronemia em camundongos ob/ob (Stephens et al., 1995). A leptina inibe a secreção de CRH na resposta a hipoglicemia e restrição calórica (Heiman et al., 1997; Huang et al., 1998), porém estimula a secreção basal de CRH (Costa et al., 1997). No jejum, onde temos maior corticosterona e menor leptina, a reposição de leptina diminui a elevação da corticosterona (Ahima et al., 1996). Contrariando estes achados, o tratamento com leptina eleva a corticosteronemia em ratos diabéticos (Akirav et al., 2004). Apesar, da relação entre leptina e corticosterona, na maioria das vezes ser inversa, ratos submetidos a uma dieta pobre em selênio por um período de 4-10 semanas apresentaram uma redução de corticosterona e leptina circulantes (Chanoine et al., 2004). Da mesma forma, encontramos em nosso estudo o mesmo tipo de relação, onde a administração de leptina aguda ou crônica elevou a corticosteronemia. Assim, nossos dados corroboram os achados de Akirav et al. (2004)

em ratos diabéticos e pela primeira vez demonstram o efeito em animais alimentados normalmente.

Broulik et al. (1991) e Santos (2004) demonstraram que a injeção de T4 aumenta a corticosteronemia. Assim, como na hiperleptinemia aguda evidenciamos uma hipertiroxinemia, esta poderia ser a razão para a maior concentração sérica de corticosterona. Todavia, a mesma explicação não se aplica para a hipercorticosteronemia observada após 6 dias de tratamento com leptina, visto não termos encontrado alterações de T4 circulante. Portanto, acreditamos que este efeito seja direto da leptina sobre a corticosteronemia.

A corticosterona inibe o TSH, mas não tem efeito direto sobre o NIS (Gregory et al., 1992). Entretanto, o cortisol estimula o efeito do TSH sobre o NIS (Gregory et al., 1992). Os animais LepA e LepC apresentam hipercorticosteronemia e, portanto, a corticosterona pode ajudar a explicar o efeito estimulatório da captação de  $^{125}\text{I}$  "in vivo" observado no experimento crônico. Apesar da corticosterona exercer um efeito inibitório sobre as desidases do tipo 1 (Kaplan, 1986; Refetoff & Nicoloff, 1995), o efeito da leptina parece ser mais importante. Entretanto, a hipercorticosteronemia em Lep C também pode ajudar a explicar a inibição do efeito estimulatório da leptina sobre o eixo hipófise-tireóide.

## LEPTINA E COMPOSIÇÃO CORPORAL

A obesidade humana, na maioria dos casos, não é atribuída a defeitos na produção de leptina ou mesmo em seu receptor (Cheung et al., 1997; Considine et al., 1995; Considine et al., 1996; Gotoda et al., 1997). Como humanos obesos são hiperleptinêmicos (Caro et al., 1996; Chung et al., 1997; Considine et al., 1995; Hassink et al., 1996; Lonnqvist et al., 1995; Maffei et al., 1995; Schwartz et al., 1996), sugere-se que estes são geralmente resistentes à ação da leptina, podendo o defeito ser no receptor, no transporte pela barreira hemato-encefálica ou no mecanismo de sinalização. Tanto humanos quanto ratos obesos mantêm uma ingestão alimentar normal, apesar de hiperleptinêmicos (Chung et al., 1997; Halaas et al., 1997; Maffei et al., 1995).

Para verificar a eficácia de nosso modelo experimental de exposição prolongada à leptina, resolvemos testar o seu efeito anorexígeno. Para isto, avaliamos a ingestão de ração 1, 2, 3 e 24 horas após a injeção diária de leptina, durante o período de tratamento, que foi significativamente menor nos ratos tratados com leptina na 3ª hora após injeção de leptina. Todavia, este resultado não permaneceu até o último dia do tratamento crônico. O efeito anorexígeno da leptina foi mantido somente até o 3º dia de injeção, sendo que após este período os animais desenvolveram uma resistência ao efeito anorexígeno da leptina. Portanto, é provável que um período contínuo de exposição hipotalâmica a altos níveis de leptina resulte no desenvolvimento de uma resistência central a este hormônio. Contudo, segundo Cettour-Rose et al. (2002), a aplicação de 10µg de leptina no terceiro ventrículo hipotalâmico de ratos, por 6 dias, diminuiu em 40% no consumo alimentar. Isto pode ser explicado, porque esta via de administração desvia o mecanismo de transporte pela barreira hemato-encefálica, que pode ser o motivo da resistência anorexígena encontrada em nosso modelo.

Acredita-se que um transporte defeituoso de leptina para o hipotálamo seja uma das causas de sua resistência em indivíduos obesos. Isto é sustentado pelo fato de que em obesos há menor relação de leptina no fluido cerebrospinal / leptina plasmática, comparado aos indivíduos magros (Caro et al., 1996; Schwartz, 1996). Além disso, a injeção periférica de leptina em ratos hiperleptinêmicos com obesidade induzida por dieta (DIO), não afetou a ingestão ou peso. Anteriormente foi observado em nosso laboratório, que o tratamento com leptina na lactação programou um aumento no peso corporal (Cravo et al., 2002), hiperleptinemia e resistência central à sua ação anorética, devido à menor expressão do Ob-Rb hipotalâmico (Toste, 2004).

Ao final do tratamento crônico com leptina, analisamos a composição corporal dos animais. Apesar dos animais LepC não terem apresentado alteração no peso corporal durante todo o período experimental, verificamos a ocorrência de uma modificação de sua composição corporal. Ao final do tratamento detectamos diminuição na massa de gordura visceral, assim como no conteúdo de gordura corporal, corroborando com

estudos anteriores, que mostraram na exposição crônica com leptina, uma queda considerável da massa de adipócitos (Levin et al., 1996). Em ratos infundidos com adenovírus recombinante, expressando elevação do gene de leptina, a gordura retroperitoneal não foi sequer identificada após 1 semana de exposição (Chen et al., 1996).

Os animais tratados cronicamente com leptina, também exibiram maior proporção de proteína total na carcaça, demonstrando um aumento na massa livre de gordura, provavelmente de massa muscular, já que não verificamos alteração no conteúdo de água corporal. Isto não deve ser decorrente de um aumento na massa óssea, já que foi demonstrado que a leptina é um potente inibidor da formação óssea (Nilson et al., 2003; Elefteriou et al., 2004). A expressão de leptina foi detectada no músculo esquelético (Wang et al., 1998) e parece aumentar agudamente a incorporação de aminoácidos no músculo, em murinos (Carbo et al., 2000). Alguns autores demonstraram um efeito direto da leptina sobre o músculo, aumentando o metabolismo de glicose e ácidos graxos (Ceddia et al., 2001; Steinberg et al., 2003) e estimulando a termogênese neste tecido (Dulloo et al., 2002). Este efeito é suportado pela presença do receptor Ob-Rb no tecido muscular (Maroni et al., 2003, Steinberg et al., 2003). Portanto, é possível que este aumento de massa muscular observada em nosso estudo nos ratos LepC seja mediada por uma ação direta da leptina neste tecido. Também já foi descrito que a leptina aumenta a secreção de GH, direta e indiretamente (Carro et al., 1997; Vuagnat et al., 1997; Cocchi et al., 1999; Saleri et al., 2004). Assim, a maior massa muscular pode ocorrer em função do efeito estimulatório da leptina sobre a secreção hipotalâmica de GHRH ou hipofisária de GH, aumentando a captação de aminoácidos musculares e a síntese protéica. Assim, pela primeira vez estamos mostrando um efeito da leptina sobre o aumento da massa protéica corporal, que pode ser direto ou indireto. Em um modelo de animal hiperleptinêmico programado pela administração de leptina na lactação, também observamos aumento da proporção de proteína corporal (Toste, 2004).

Mostramos assim, haver uma aparente dissociação entre o efeito central (anorexígeno) da leptina e seu efeito periférico (diminuição da massa adiposa e aumento da massa protéica) no tratamento crônico. Entretanto, como só medimos a composição

corporal ao final da experiência crônica, não podemos descartar que estes efeitos ocorreram em sua totalidade até o terceiro dia. Novos experimentos são necessários comparando a composição corporal no terceiro e sexto dias de tratamento.

### **Análise final dos nossos achados**

Um de nossos principais questionamentos relacionava-se a tentativa de compreender a interação entre leptina e atividade do NIS nos diferentes modelos experimentais investigados em nosso laboratório. Assim, os dados do presente trabalho em ratos eutireoideos injetados aguda ou cronicamente com leptina, aliados aos dados anteriores do laboratório (em ratas lactantes e em animais programados), evidenciam que os efeitos da leptina sobre atividade do NIS “in vivo” parecem depender de fatores distintos, tais como, tempo de exposição a leptina, idade em que ocorreu esta exposição e presença de contra-reguladores que estariam atuando de forma particular em cada situação. Destacamos ainda que, como o tratamento com leptina foi realizado “in vivo”, não podemos confirmar se esta está agindo diretamente no tireócito, embora já tenha sido detectado o Ob-Rb na tireóide (Nowak et al., 2002; Isozaki et al., 2004). Entretanto, nossos experimentos “in vitro” evidenciaram a existência de um efeito supressor direto da leptina sobre o NIS, corroborando um achado recente (Isozaki et al., 2004).

Qual seria então o real impacto da leptina sobre a modulação da função tireoideana na situação de eutireoidismo, uma vez que sabemos que a leptina aumenta a secreção de TRH, TSH e HTs, contudo diminui a atividade do NIS?

Sabemos que a leptinemia correlaciona-se positivamente com a gordura corporal e com IMC, portanto, estando elevada em indivíduos obesos. Segundo Wesche et al. (1998), obesos apresentam aumento do tamanho tireoideano associado a maior TSH e menor T4 livre sérico. Sendo então possível assumir que nos obesos, a leptina aumenta a proliferação folicular tireoideana, e altera a relação de T3/T4. Encontramos, tanto no grupo LepA quanto no LepC, um aumento nesta relação, embora não significativo, que sugere uma produção preferencial de T3.

Ainda a ação aparentemente paradoxal da leptina sobre o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide pode desempenhar um papel importante na regulação diária da massa adiposa. É possível que em situações em que a leptina esteja aumentada, como no período pós-prandial, ocorra aumento na produção preferencial de T3, por diminuir a oferta de iodo para a tireóide, que está sendo hiper estimulada por TSH. Esta nossa hipótese esta baseada nos eventos que ocorrem na carência de iodo (Griffin, 2000; Greenspan, 2001). Nossos dados da concentração sérica de HTs não confirmam esta hipótese, entretanto o T3 sérico só reflete a metade da produção tireoideana e é aumentado pela desiodação periférica, especialmente da D1 hepática e, provavelmente muscular.

**Conclusão**

Nossos dados mostram como são complexos e distintos os mecanismos envolvidos na ação direta e indireta da leptina sobre a função tireoideana, que parece ser multifatorial. Assim concluímos, que:

1. A leptina age diretamente na tireóide murina, suprimindo a atividade do NIS.
2. A leptina ~~atua diretamente no tireócito~~ estimulando a liberação de T4.
3. A exposição a leptina modula negativamente a atividade GPDm hepática.
4. A administração aguda de leptina modula de forma diferencial o metabolismo periférico dos hormônios tireoideanos, estimulando, inibindo ou não alterando a atividade desidase, de acordo com o tecido analisado. Já na administração crônica de leptina há uma contra-regulação ao seus efeitos agudos, exceto quanto ao estímulo da atividade D1 hepática, repercutindo nas concentrações séricas de hormônios tireoideanos.
5. A hiperleptinemia aguda e crônica provoca aumento da corticosterona sérica.
6. Após o quarto dia de tratamento com leptina, os ratos desenvolvem uma resistência ao seu efeito anorético e, provavelmente sobre parte da sua ação sobre a função tireoideana.
7. A hiperleptinemia crônica embora não tenha modificado o peso corporal total dos ratos adultos, foi capaz de reduzir a gordura central e total, e aumentar a massa magra corpórea, caracterizando uma dissociação de seus efeitos.



## Referências

Ahima RS, Kelly J, Elmquist JK, Flier JS. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology*, v. 140, p. 4923-4931, 1999.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier SJ. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, v. 382, p.250-252, 1996

Ahima RS, Saper CB, Flyer JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 20, p. 317-363, 2000.

Ajjan RA, Findlay C, Metcalfe RA, Watson PF, Crisp M, Ludgate M, Weetman AP. The modulation of the human sodium iodine symporter activity by Graves sera. *J Clin Endocrinol Metab.*,v.83, p.1217-1221,1998.

Arase K., York DA., Shimizu H. Shargill N., Bray GA. Effect of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am. J. Physiol.*, v.255, p.E255-E259, 1988.

Akbarav EM, Chan O, Inouye K, Riddell MC, Matthews SG, Vranic M. Partial leptin restoration increases hypothalamic-pituitary-adrenal activity while diminishing weight loss and hyperphagia in streptozotocin diabetic rats. *Metabolism.*, v.12, p.1558-1564, 2004.

Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.14563–14572, 2000.

Baqui MM, Botero D, Gereben B, Curcio C, Harney JW, Salvatore D, Sorimachi K, Larsen PR, Bianco AC. Human type 3 iodothyronine selenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n. 2, p. 1206-1211, 2003.

Baqui MM, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*, v.141, p.4309-4312, 2000.

Baskin DG, Breininger JF, Bonigut S, Miller MA. Leptin binding in the arcuate nucleus is increased during fasting. *Brain Res.*, v.828, p.154–158, 1999.

Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW. SOCS-3 expression in leptin-sensitive neurons of the hypothalamus of fed and fasted rats. *Regul. Pept.*, v.92, p.9–15, 2000.

Baskin DG, Seeley RJ., Kuijper JL., Lok S., Weigle DS., Erickson JC., Palmiter RD., Schwartz MW. Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes*, v.49, p.538–543, 1998.

Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG Jr. STAT3 signaling is

required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*, v.421, p.856–859, 2003.

Bates JM, St Germain DL, Galton VA. Expression Profiles of the Three Iodothyronine Deiodinases, D1, D2 and D3, in Developing Rat. *Endocrinology*, v.140, p.844-851, 1999.

Bates JM, Spate VL, Morris JS, St Germain DL, Galton VA. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid economy in the rat during development. *Endocrinology*, v.141, p.2490-2500, 2000.

Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, p.8374–8378, 1996.

Baur A, Bauer K, Jarry H, Kohrle J. Effects of proinflammatory cytokines on anterior pituitary 5'-deiodinase type I and type II. *J Endocrinol.*, v. 167, p. 505-515, 2000.

Bayne K. Revised Guide for the Care and Use of laboratory Animals available. *Am Phys Soc Physiol.*, v.39, n.4, p.208-211, 1996.

Becker KB. Mapping deiodinase gene expression in rat pituitary utilizing a novel reverse transcription PCR in situ hybridization technique. *Thyroid*, v. 6, S-91, 1996.

Beckett GJ, Beddows SE, Morrice PC, Nicol F, Arthur JR. Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. *Biochem J.*, v.248, p. 443-447, 1987.

Beckett GJ, MacDougall DA, Nicol F, Arthur JR. Inhibition of type I and II iodothyronine deiodinase activity in rat liver, kidney and brain produced by selenium deficiency. *Biochem J.*, v.259, p.887-892, 1989.

Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Kohrle J. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 173, p.1143-1149, 1990.

Berry MJ, Kieffer JD, Larsen PR. Evidence that cysteine, not selenocysteine, is in the catalytic site of type II deiodinase. *Endocrinology*, v.129, p.550-552, 1991a.

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry M, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews*, v.23, n.1, p.38-89, 2002.

Bjorbaek C, Buchholz RM, Davis SM, Bates SH, Pierroz DD, Gu H, Neel BG, Myers MG Jr, Flier JS. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol. Chem.*, v.276, p.4747–4755, 2001.

Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J. Biol. Chem.*, v.274, p.30059–30065, 1999.

Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol. Cell*, v.1, p.619–625, 1998.

Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.32686–32695, 1997.

Bonomo IT. Efeito da administração de bromocriptina durante a lactação sobre a função tireóidea e peso corporal a curto e longo prazo. Rio de Janeiro: Dissertação de Mestrado - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, 2003.

Borges PP, Curty FH, Pazos-Moura CC, Moura EG. Effect of testosterone propionate treatment on thyrotropin secretion of young and old rats in vitro. *Life Sci.*, v.62, p.2035–2043, 1998.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248–254, 1976.

Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNA in food-restricted and food deprived rats. *Neuroendocrinology*, v.52, p.441–447, 1990.

Braverman LE, Utiger RD, eds: *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. Philadelphia, PA: Lippincott Co; 1991.págs

Broberger C., Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, v. 95, p.15043–15048, 1998

Brown LJ, Koza RA, Everett C, Reitman ML, Marshall L, Fahien LA, Kozak LP, MacDonald MJ. Normal thyroid thermogenesis but reduced viability and adiposity in mice lacking the mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem.*, v.277, p. 32892–32898, 2002.

Brent G. Thyroid hormones (T4, T3). In: Conn, P.M., Melmed, S. *Endocrinology basic and clinical principles: (Ed) Humana Press Inc, Totowa, NJ, cap 19, p. 291–306, 1997.*

Broulik PD, Marek J, Schreiber V. The effect of experimental hyperthyroidism on renal and adrenal weight increase in mice. *Physiol Res.*, v.40, p.527–532, 1991.

Burikhanov R, Coulonval K, Pirson I, Lamy F, Dumont JE, Roger PP. Thyrotropin via cyclic AMP induces insulin receptor expression and insulin Co-stimulation of growth and

amplifies insulin and insulin-like growth factor signaling pathways in dog thyroid epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, v.271, p.29400-29406, 1996.

Cabanelas A Efeito da leptina sobre a atividade 5'-iodotironina desiodase murina in vivo. Monografia para obtenção de grau de bacharel em ciências biológicas. UFRJ, 2003

Cabanelas A Leptina modula a atividade desiodase "in vivo" em animais hipo- e hipertireoideos. Dissertação de mestrado. UFRJ, Instituto de Biofísica, 2005

Campfield LA., Smith FJ., Guisez Y., Devos R., Bum P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, v.269, p. 546-549, 1995.

Carbo N, Ribas V, Busquets S, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Short-term effects of leptin on skeletal muscle protein metabolism in the rat. *J Nutr Biochem.*, v.11, p.431-135, 2000.

Cardoso LC, Martins DCL, Campos DVB, Santos LM, Costa VMC, Rosenthal D, Vaisman M, Violante AHD, Carvalho D.P Effect of iodide or iopanoic acid on thyroid  $Ca^{++}$ /NADPH<sup>-</sup> dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating activity and thyroperoxidain toxic diffuse goiters. *European Journal of Endocrinology*, v. 147, p. 293-298, 2002.

Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-uid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*, v.348, p.159–161, 1996.

Carro E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF & Dieguez C. Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology*, v.138, p.2203-2206, 1997.

Carvalho DP, Dupuy C, Gorin Y, Legue O, Pommier J, Haye B, Virion A. The  $Ca^{++}$  and Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent Hydrogen Peroxide Generating System Is Induced by Thyrotropin in Porcine Thyroid Cells. *Endocrinology*, v.137, p.1007-1012, 1996.

Carrasco N. Iodine transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta.*, v.1154, p.65-82, 1993.

CASIMIRO-LOPES G. Medida de tolerância ao exercício agudo máximo em modelos de desnutrição e disfunção tireoidiana. Rio de Janeiro, *Dissertação de mestrado*: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, 2004.

Chanoine JP, Braverman LE, Farwell AP, Safran M, Alex S, Dubord S, Leonard JL. The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat. *J Clin Invest*, v.91, p.2709-2713, 1993a.

Chanoine JP, Veronikis I, Alex S, Stone S, Fang SL, Leonard JL, Braverman LE. The postnatal serum 3,5,3'-triiodothyronine (T3) surge in the rat is largely independent of extrathyroidal 5'-deiodination of thyroxine to T3. *Endocrinology*, v.133, p.2604-2609, 1993b.

Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*, v.138, p.855-858, 1997.

Chen G, Koyama K, Yuan X, Lee Y, Zhou YT, O'Doherty R, Newgard CB, Unger RH. Disappearance of body fat in normal rats induced by adenovirus-mediated leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci.*, v.93, p.14795-14799, 1996.

Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, v.278, p.1803-1805, 1997.

Chopra JJ. Nature, source, and relative significance of circulating thyroid hormones. In Braverman, L.E. & Utiger, R.D. eds., *The Thyroid - A Fundamental and Clinical Text* 7th ed, Philadelphia, p.111-124, 1996.

Chua Jr. SC, Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science.*, v.271, p.994-996, 1996.

Cocchi D, De Gennaro Colonna V, Bagnasco M, Bonacci D. Leptin regulates GH secretion in the rat by acting on GHRH and somatostatinergic functions. *J Endocrinology*, v.162, p.95-99, 1999.

Coleoni AH, Munaro N, Recupero AR, Cherubini O. Nuclear triiodothyronine receptors and metabolic response in perinatally protein-deprived rats. *Acta Endocrinol.*, v.104, p.450-455, 1983.

Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Nyce MR, Magosin SA, Bauer TL, Rosato EL, Colberg J, Caro JF. Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J. Clin. Invest.*, v.95, p.2986-2988, 1995.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, Mckee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.*, v.334, p.292-295, 1996.

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.

Correa da Costa VM, Moreira DG & Rosenthal D. Thyroid function and aging: gender-related differences. *J Endocrinol.*, v. 171, p.193-198, 2001.

Costa A, Poma A, Martignoni E, Nappi G, Ur E, Grossman A. Stimulation of corticotrophin-releasing hormone release by the obese (ob) gene product, leptin, from hypothalamic explants. *Neuroreport.*, v.24, p.1131-1134, 1997.

Cravo CO, Teixeira CV, Passos MC, Dutra SC, Moura EG, Ramos C. Leptin treatment during the neonatal period is associated with higher food intake and adult body weight in rats. *Horm. Metab. Res.*v.34, n.7, p. 400-405, 2002.

Croteau W, Davey JC, Galton VA, St. Germain DL. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest*, v.98, p. 405-417, 1996.

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

Dai G, Levy O & Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodine transporter. *Nature*, v.379, p.458-460,1996.

Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science*, v.277, p.1630–1635, 1997.

Da Veiga MA, Oliveira Kde J, Curty FH, de Moura CC. Thyroid hormones modulate the endocrine and autocrine/paracrine actions of leptin on thyrotropin secretion. *J Endocrinol.* V.183, p.243-247, 2004.

Davis PJ, Spaulding SW, Gregerman RI. The three thyroxine-binding proteins in rat serum: binding capacities and effects of binding inhibitors. *Endocrinology*, v.87, p. 978-986, 1970.

Davis PJ & Davis FB. In Braverman LE (ed) Contemporary endocrinology: diseases of the thyroid (ed) Humana Press Inc, Totowa, NY, cap. 2, p.17-34, 1997.

De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F Vassart G, Dumont JE, Miot F. Cloning of two human cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 23227-23233, 2000.

Deleu S, Pirson I, Coulonval K, Drouin A, Taton M, Clermont F, Roger PP, Nakamura T, Dumont JE, Maenhaut C. GF-1 or insulin, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. *Mol Cell Endocrinol.*, v.149, p.41-51, 1999.

Diano S, Naftolin F, Goglia F, Horvath TL. 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.

Dulloo AG, Stock MJ, Solinas G, Boss O, Montani JP, Seydoux J. Leptin directly stimulates thermogenesis in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, v.515, p.109-113, 2002.

Dumont JE & Vassant G. Thyroid regulation. In: Degroot LJ, ed. *Endocrinology*. v. 1. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; p. 543-559, 1995.

Elefteriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, Ogawa Y, Liu X, Ware SM, Craigen WJ, Robert JJ, Vinson C, Kakao K, Capeau J, Karsenty G. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.101 (9), p.3258-3263, 2004.

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron.*, v.23, p.775-786, 1999.

Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.*, v.22, p.221-232, 1999.

Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature*, v.381, p.415-418, 1996.

Escobar-Morreale HF, del Rey FE, Obregón MJ, Escobar GM. Only the Combined Treatment with Thyroxine and Triiodothyronine Ensures Euthyroidism in All Tissues of the Thyroidectomized Rat. *Endocrinology.*, v. 137, p.2490-2502, 1996.

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

Ferreira AC, Lima LP, Araújo RL, Müller G, Rocha RP, Rosenthal D, Carvalho DP. Rapid regulation of thyroid sodium-iodine symporter activity by thyrotrophin and iodine. *Journal of Endocrinology*, v.184, p.69-76, 2005.

Flier JS & Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: Novel peptides for new pathways. *Cell*, v.92, p.437-440, 1998.

Friedman JM & Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, v.395, p.763-770, 1998.

Friesema ECH, Ganguly S, Abdalla A, Fox JEM, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as specific thyroid hormone transporter. *J. Biol. Chem.* v. 278, p. 40129-40135, 2003.

Galton VA, Martinez E, Hernandez A, St. Germain EA, Bates JM, St. Germain DL. The type I iodothyronine deiodinase is expressed in the rat uterus and induced during pregnancy. *Endocrinology*, v.142, p.2123-2128, 2001.



Galton VA, McCarthy PT, St. Germain DL. The ontogeny of iodothyronine deiodinase systems in liver and intestine of the rat. *Endocrinology*, v. 128, p. 1717-1722, 1991.

Gardner JD, Rothwell NJ, Luheshi GN. Leptin affect food intake via CRF-receptor-mediated pathways. *Nat. Neurosci.*, V.1, p.103-108, 1998.

Gee CE, Chen CL, Roberts JL, Thompson R, Watson SJ. Identification of proopiomelanocortin neurones in rats hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridização. *Nature*, v.306, p.374-376, 1983.

Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93, n.13, p.6231-6235, 1996.

Ghizzoni L, Mastorakos G, Ziveri M, Furlini M, Solazzi A, Vottero A, Bernasconi S. Interactions of leptin and thyrotropin 24-hour secretory profiles in short normal children. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.86 ,p.2065-2072, 2001.

Glasow A, Hilbers HU, Breidert M, Gillespie J, Schebaum WA, Chrousos GP, Bomstein SR. Expression of OB receptor in normal human adrenals: Differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.8, p.4459-4466, 1998.

Goldim & Raymundo. Pesquisa em Saúde e os Direitos dos Animais. 2 ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

Gomez JM, Maravall FJ, Gomez N, Guma A, Casamitjana R, Soler J. Pituitary-thyroid axis, thyroid volume and leptin in healthy adults. *Horm Metab Res.*, v.34, p.67-71, 2002

Gouveia CH, Christoffolete MA, Zaitune CR, Dora JM, Harney JW, Maia AL, Bianco AC. Type 2 iodothyronine selenodeiodinase is expressed throughout the mouse skeleton and in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line during differentiation. Epub. *Endocrinology*, 2004.

Gotoda T, Manning BS, Goldstone AP, Imrie H, Evans AL, Strosberg AD, Mckeigue PM, Scott J, Aitman TJ. Leptin receptor gene variation and obesity: lack of association in a white British male population. *Hum. Mol. Genet.*, v.6, p.869-876, 1997

Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarost I, Stark KL. Overexpression of Agtr leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.*, v.17, p.273-274, 1997.

Gregory PB, Kevin DB, Jia-F W, Ian D. Phillips T, and David JH. Regulation of Thyroid Hormone Synthesis in Cultured Ovine Thyroid Follicles. *Endocrinology*, v.130, p.2789-2794, 1992.

Greenspan FS. The thyroid gland. In Greenspan FS & Gardner DG eds., *Basic & Clinical Endocrinology* 6th ed, p.201-272, 2001.

Griffin JE. The thyroid. In Griffin JE & Ojeda SR eds., *Textbook of Endocrine Physiology* 4th ed, New York, p.303-327, 2000.

Hakansson ML, Meister B. Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, v.68, p.420–427, 1998.

Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidahusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.94, p.8878–8883, 1997.

Halmi NS: Thyroidal iodine transport. *Vitam Horm.*, v.19, p.133-163, 1961.

Harris ARC, Fang, SL, Vagenakis, AG, Braverman LE. Effect of starvation, nutriment, replacement and hypothyroidism on in vitro hepatic T4 to T3 conversion in the rat. *Metabolism*, v.27, n.11, p.1680, 1978.

Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjorbaek C, Elmquist JK, Flier JS & Hollenberg NA. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *The Journal of Clinical Investigation.*, v.107, p. 111-120, 2001.

Hassink SG, Sheslow DV, De Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF. Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics*, v.98, p.201–203, 1996.

Heggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Trayhum P, Williams LM. Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridisation. *Biochem Biophys Res Commun*, v.232, p.383-387, 1997.

Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schonher B, Stephens TW, Flier JS. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology*, v.138, p.3859-3863, 1997.

Hernandez A & Obregon MJ. Triiodothyronine amplifies the adrenergic stimulation of uncoupling protein  $\beta$  expression in rat brown adipocytes. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, v.278, p.769-E777, 1996

Hillgartner FB & Romsos DR. Regulation of iodothyronine 5'-deiodinase in lean and obese (*ob/ob*) mice. *Am J Physiol*. v. 249, p. E209-E218, 1985.

Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form two structural classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p.114–119, 1998.

Hosoi Y, Murakami M, Mizuma H, Ogiwara T, Imamura M, Mori M. Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in cultured human skeletal muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab*, v.84, p.3293-3300, 1999.

Huang Q, Rivest R, Richard D. Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (*ob/ob*) mice. *Endocrinology*, v.139, p.1524-1532, 1998.

Iff HW, Wilbrandt W. Die Abhängigkeit der Jodakkumulation in Schilddrüsenschnitten von der ionalen Zusammensetzung des Inkubationsmediums und ihre Beeinflussung durch Herzglycoside. *Biochim Biophys Acta*, v.78, p.711-752, 1963.

Isozaki O, Tsushima T, Nozoe Y, Miyakawa M, Takano K. Leptin Regulation of the Thyroids: Negative Regulation on Thyroid Hormone Levels in Euthyroid Subjects and Inhibitory Effects on Iodide Uptake and Na(+)/I(-) Symporter mRNA Expression in Rat FRTL-5 Cells. *Endocrinology*, v.51, p.415-423, 2004.

Imai Y, Toyoda N, Maeda A, Kadobayashi T, Wang F, Kuma K, Mitsushige N, Iwasaka T. Type 2 iodothyronine deiodinase expression is upregulated by protein kinase A-dependent pathway and is downregulated by the protein kinase C-dependent pathway in cultured human thyroid cells. *Thyroid*, v. 11, p. 899-907, 2001.

Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and *energy* balance. *Ann N Y Acad Sci*, v.967, p.379-388, 2002.

Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*, v.141, p.333-339, 2000.

Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CO, Kalra PS. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.88, p.10931-10935, 1999

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvarth TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrinology*, v.20, p.68-100, 1991.

Kaminsky SM, Levy O, Garry MT, Carrasco N. Inhibition of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter by harmaline and TRP-P2 in thyroid cells and membrane vesicles. *Eur J Biochem*, v. 200, p.203-207, 1994.

Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, v.387, p.921-924, 1997.

Kaplan MM. Regulatory influences on iodothyronine deiodination in animal tissues. In: Hennemann G, ed. *Thyroid hormone metabolism*. New York: Marcel Dekker, Inc., p.231-253, 1986.

Kaplan MM, Pan C, Gordon PR, Lee JK, Gilchrest BA. Human Epidermal Keratinocytes in Culture Convert Thyroxine to 3, 5, 3', Triiodothyronine by Type II Iodothyronine Deiodination: A Novel Endocrine Function of Skin. *J Clin Endocrinol Metab*, v.66, p.815-822, 1988.

Kaplan MM & Yaskoski KA. Phenolic and Tyrosil Ring Deiodination of Iodothyronine in Rat Brain Homogenates. *J Clinl Invest*, v.66, p.551-562, 1980.

Kaplan MM & Young JB. Abnormal thyroid hormone deiodination in tissues of ob/ob and db/db obese mice. *Endocrinology*, v.120, p.886-893, 1987.

Kates AL & Himms-Hagen J. Defective cold-induced stimulation of thyroxine 5'-deiodinase in brown adipose tissue of the genetically obese (ob/ob mouse). *Biochem Biophys Commun.*, v. 130, p. 188-193, 1985.

Kelner, K.L., Levine, R.A., Morita, K., Pollard, H.B. A comparison of trihydroxyndole and HPLC/electrochemical methods for catecholamine measurement in adrenal chromaffin cells. *Neurochemistry International*, v.7, p. 373-378, 1985.

Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v.278, p.E1-E14, 2000.

Koenig RJ, Leonard JL, Senador D, Rappaport N, Watson A, Larsen PR. Regulation of thyroxine 5'-deidnase activity by 3,5,3'-triiodothyronine in cultured anterior pituitary cells. *Endocrinology*, v.115, p.324-329, 1984.

Köhrle J. Local activation and inactivation of thyroide hormones: the deidnase family. *Molecular and Endocrinology*, v.151, p.103-119, 1999.

Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE. Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res*, v.443, p.63-69, 1988.

Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christiansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorerctic peptide regulated by leptin. *Nature*, v.393, p.72-76, 1998.

Kutoh E, Boss O, Levasseur F, Giacobino JP. Quantification of the full length leptin receptor (OB-Rb) in human brown and white adipose tissue. *Life Sci.*, v. 62, p.445-451, 1998.

Larsen PR, Davies TF, Hay ID. The Thyroid Gland. In: Wilson J.D., Foster D.W., Kronenberg, H.M. and Larsen, P.R. eds *Williams Textbook of Endocrinology* 9th ed W.B.Saunders Company, Phyladelphia, p.389-515, 1998.

Larsen PR & Ingbar SH. The Thyroid. In Wilson, J.D. & Foster, D.W. eds., Williams Textbook of Endocrinology 8th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p.357-487, 1992.

Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev*, v. 14, n. 2, p. 184-193, 1993.

Lee YP, Lardy HA. Influence of thyroid hormones on l-alpha-glycerophosphate dehydrogenases and other dehydrogenases in various organs of the rat. *J Biol Chem*, v. 240, p. 1427-1436, 1965.

Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. 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.

Legradi, 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*, 68(2), p. 89-97, 1998.

Leonard JL & Korhle J. Intracellular Pathways of iodothyronine Metabolism. In Braverman, L.E. & Utiger, R.D. eds., The Thyroid - A Fundamental and Clinical Text 7th ed, Philadelphia, p.125-161, 1996.

Levin N, Nelson C, Gurney A, Vandlen R, de Sauvage F. Decreased food intake does not completely account for adiposity reduction after ob protein infusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.93, p.1726-1730, 1996.

Lins MC, Passos MC, Lisboa PC, Bonomo IT, de Moura EG. Leptin treatment during lactation increases transfer of iodine through the milk. *J Nutr Biochem.*, v.16, p.138-143, 2005.

Lisboa PC; Curty FH; Moreira RM; Oliveira KJ & Pazos-Moura CC. Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase. *Hormone and Metabolic Research*, v.33, p.532-535, 2001.

Lisboa PC; Curty FH; Moreira RM & Pazos-Moura CC. Effects of estradiol benzoate on 5'-iodothyronine deiodinase activities in female rat anterior pituitary gland, liver and thyroid gland. *Brazilian J Med Res*, v. 30, p.1479-1484, 1997.

Lisboa PC, Oliveira KJ, Ortiga- Carvalho TM, Cabanelas A, Pazos-Moura, CC. Acute cold exposure, leptin and somastostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'- deiodinase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 284, n.6, p. E1172-6, 2003a.

Lisboa PC, Passos MCF, Dutra SCPD, Santos R, Bonomo I, Cabanelas A, Pazosmoura CC, Moura EGM. Increased 5'-iodothyronine deiodinase activity is a maternal adaptative

mechanism in response to protein restriction during lactation. *Journal of Endocrinology*, v. 177, n.2, p. 261-267, 2003b.

Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese, ob gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat. Med.*, v1, p.950–953, 1995.

LoPresti JS, Eigen A, Kaptein E, Anderson KP, Spencer CA, Nicoloff JT. Alterations in 3,3',5'-triiodothyronine metabolism in response to propylthiouracil, dexamethasone, and thyroxine administration in man. *J Clin Invest.*, v. 84, p. 1650-1656, 1989.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Sarral, Randal,RJ- Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* v.193.p.265-275, 1951.

Ludwig DS, Tritos NA, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E. Melanin-concentration hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.*, v.107, p.379-386, 2001.

Maffei M, Hallas J, Ravussin E, et al: Leptin levels in human and redente: Mensurament of plasma leptin and ob RNA in obese weight-reduced subjects. *Nat. Med.*, v.1, p.1155-1161,1995.

Maglich JM, Watson J, McMillen PJ, Goodwin B, Willson TM, Moore JT. The nuclear receptor CAR is a regulator of thyroid hormone metabolism during caloric restriction. *J Biol Chem.* V. 279, p.19832-19838, 2004.

Magner JA. Thyroid-stimulating hormone: biosynthesis, cell biology and bioactivity. *Endocrine Reviews* 11: 354-385, 1990.

Magner JA; Kane J e Chou ET. Intravenous thyrotropin (TSH)- releasing hormone releases human TSH that is strutrally different from basal TSH. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74: 1306-1311, 1992.

Malendowicz LK, Gorska T, Tortorella C, Nowak M, Majchrzak M, Spinazzi R, Nussdorfer GG & Nowak KW. Acute in vivo effects of leptin and leptin fragments on corticosteroid hormone secretion and entero-insular axis in the rat. *International Journal of Molecular Medicine.*, v. 13, p. 829-834,2004.

Manganiello C, Degerman E, Taira M, Kono T, Belfrage P. Type III cyclic nucleotide phosphodiesterases and insulin action. *Curr. TopCell. Regul.*, v.34, p.63–100, 1996.

Mason ME, Evans WS & Dunn JT (1996) Relationship of thyroid size and function to the menstrual cycle. *Thyroid*, v. 6, Suppl 1, S-48.

Maroni P, Bendinelli P, Piccoletti R. Early intracellular events induced by in vivo leptin treatment in mouse skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol.*, v.201, p.109-121, 2003.

Masaki T, Yoshimichi G, Chiba S, Yasuda T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T,

Yoshimatsu H. Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding adiposity, and uncoupling protein to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. *Endocrinology*, v.144, p.3547-3554, 2003.

Marine D, Feiss HO. The absorption of potassium iodine by perfused thyroid glands and some of the factors modifying it. *J Pharmacol Exp Ther.*, v.7, p.557-576, 1915.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.*, v.3, p.1029-1033, 1997.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ, Trayhurn P. Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, v. 8, p.733-735, 1996.

Mills I, Barge RM, Silva JE, Larsen PR. Insulin stimulation of iodothyronine 5'-deiodinase in rat brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.143, p.81-86, 1987.

Miyashita K, Murakami M, Iriuchijima T, Takeuchi T, Mori M. Regulation of rat liver type I iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 115, p. 161-167, 1995.

Mitsuma T, Nogimori T. Related Articles, Changes in plasma thyrotrophin-releasing hormone, thyrotrophin, prolactin and thyroid hormone levels after intravenous, intranasal or rectal administration of synthetic thyrotrophin-releasing hormone in man. *Acta Endocrinol* , v.107, p.207-212, 1984.

Mobbs C, Mizuno T. Leptin regulation proopiomelanocortin. *Front. Horm. Res.*, v.26, p.57-70, 2000.

Molinero P, Osuna C, Guerrero JM. Type II thyroxine 5'-deiodinase in the rat thymus. *Nature*, v.305, p.712-713, 1995.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digh JE, Mohammed SN, Hurst JÁ, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, v.387, p.903-908, 1997.

Morand S, Chaaoui M, Kaniewski J, Dème D, Ohayon R, Noel-Hudson MS, Virion A, Dupuy C. Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and Duox2 protein expression in isolated porcine thyroid follicles. *Endocrinology*. v. 144, p. 1241-1248, 2003

Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology*, v.140, p.5995-5998, 1999.

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

Moreira RM; Lisboa PC; Curty FH & Pazos-Moura CC. Dose-dependent effects of 17 $\beta$ -estradiol on thyrotropin releasing hormone (TRH)-induced thyrotropin (TSH) release in vitro. *Brazilian J Med Res.*, v.30, p.1129-1134,1997.

Moura EG, Santos CV, Moreira RMM, Pazos-Moura CC. Aging and gender affect the response of thyrotropin (TSH) to gastrin releasing peptide (GRP) in rats. *Life Sciences*, v.68, p.1899-1904, 2001.

Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. Structure and function of a new STAT induced STAT inhibitor. *Nature*, v.387, p.924–929, 1997.

Nguyen TT, Chapa F, DiStephano JJ. Direct measurement of the contributions of type I and II 5'- deiodinases to whole body steady state 3,5,3'-triiodothyronine production from thyroxine in the rat. *Endocrinology* , v. 139:4626-4633, 1998.

Nicoloff JT, Lum SM, Spencer CA, Morris R. Peripheral autoregulation of thyroxine to triiodothyronine conversion in man. *Horm Metab Res*, v.14, p.74-79, 1984.

Nillni EA, Aslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C & Flier JS Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J. Biol. Chem.*, v. 275, p. 36124-36133, 2000.

Nilsson C, Swolin-Eide D, Ohlsson C, Eriksson E, Ho HP, Bjorntorp P, Holmang A. Reductions in adipose tissue and skeletal growth in rat adult offspring after prenatal leptin exposure. *Endocrinol.*, v.176 (1), p.13-21, 2003.

Nowak KM, Kaczmarek P, Mackowiak P, Ziolkowska A, Albertin G, Ginda WJ, Trejter M, Nussdorfer GG, Malendowicz LK. Rat thyroid gland expresses the long form of leptin receptors, and leptin stimulates the function of the gland in euthyroid non-fasted animals. *Int J Mol Med*, v.9, n.1, p.31-34, 2002.

Nogalska A, Pankiewicz A, Goyke E, Swierczynski J. The age-related inverse relationship between ob and lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue. *Exp Gerontol.*, v.38, p.415-422, 2003.

Okamoto S, Kimura K, Saito M,. Anorectic effect of leptin is mediated by hipothalamic corticotropin-releasing hormone, but not by urocortin, in rats. *Neurosci.*, v.307, p.179-182, 2001.

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kems JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vivo and in vitro by agouti-related protein. *Science.*, v.278, p.135-138, 1997.



Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Soares BA, Pazos-Moura CC. Leptin role in the regulation of thyrotropin secretion in fed state - in vivo and in vitro studies. *J. Endocr.*, v.174, p.121-125, 2002.

Ottlecz A, McCann SM. Concomitant inhibition of pulsatile luteinizing hormone (LH) and stimulation of prolactin release by prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) in ovariectomized (OVX) conscious rats. *Life Sci.*, v.43, p.2077-2085, 1988.

Pace N and E.N.Rathbun. Studies on body composition. III. The body water and chemically combined nitrogen content in relation to fat content. *J Biol. Chem.*, v.158, p.685-691, 1945.

Passos MCF, Ramos CF, Dutra SCP, Mouço T, Moura EG. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res*, v.34, p.40-43, 2002.

Passos MCF, Ramos CF, Dutra SCP, Moura EG. Transfer of iodine through the milk in protein-restricted lactating rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.12, p.300-303, 2001b.

Passos MCF, Ramos CF, Mouço T, Moura EG. Increase of T3 secreted through the milk in protein restricted lactating rats. *Nutrition Research*, v.21, p. 917-924, 2001a.

Pekary AE, Berg L, Santini F, Chopra I, Hershman JM. Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 101, p. R31-R35, 1994.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, v.269, p.546-549, 1995.

Pilo A, Iervasi G, Vitek F, Ferdeghini M, Cazzuola F, Bianchi R. Thyroidal and peripheral production of 3,5,3'-triiodothyronine in humans by multicompartmental analysis. *Am J Physiol.*, v.258, p. E715-E726, 1990.

Popovic V, Damjanovic S, Diegnez C, Casanueva FF. Leptin and the pituitary. *Pituitary.*, v.4, p.7-14, 2001.

Price DJ & Sherwin JR. Autoregulation of iodine transport in the rabbit: absence of autoregulation in fetal tissue and comparison of maternal and fetal thyroid iodination products. *Endocrinology.*, v.119, p.2547-2552, 1986.

Qu D, Ludwig DS, Gammeltoft S, Piper M, Pelleymounter MA, Cullen MJ, Przypek R, Kanarck R, Maratos-Flier E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature.*, v.380, p.243-247, 1996.

Ramos CF, Teixeira CV, Passos MCF, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Curty FH, Moura EG. Low-protein diet changes thyroid function in lactating rats. *Proc Soc Exp Biol. Med*, v.224, p.256-263, 2000.

Refetoff S & Nicoloff JT. Thyroid hormones transport and metabolism. In Degroot L.J. ed., *Endocrinology*, W.B.Saunders Company, Philadelphia, ,v. 1, 3rd ed, p.560-582, 1995.

Rettori V, Pazos-Moura CC, Moura EG, Polak J, McCann SM. Role of neuromedin B in control of the release of thyrotropin in hypothyroid and hyperthyroid rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v.89, p.3035-3039, 1992.

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

Riedel C, Levy O & Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodine symporter by thyrotropin. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.21458-21463, 2001.

Rosenblum CI, Tota M, Cully D, Smith T, Collum R, Qureshi S, Hess JF, Phillips MS, Hey PJ, Vongs A, Fong TM, Xu L, Chen HY, Smith RG, Schindler C, Van Der Ploeg LH. Functional STAT 1 and 3 signaling by the leptin receptor, OB-R, p; reduced expression of the rat fatty leptin receptor in transfected cells. *Endocrinology*, v.137, p.5178-5181, 1996.

Refetoff S & Nicoloff JT. Thyroid hormones transport and metabolism. *Endocrinology*, v. 1, p.560-582, 1995.

Rossi M, Choi SJ, O'shea D, Miyoshi T, Ghatel MA, Bloom SR. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology.*, v.138, p.351-355, 1997.

Salvatore D, Bartha T, Larsen PR. The guanosine monophosphate reductase gene is conserved in rats and its expression increases rapidly in brown adipose tissue during cold exposure. *J Biol Chem.*, v. 273, p. 31092-31096, 1998.

Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR. Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology*, v.137, p. 3308-3315, 1996.

Sanders JP, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kuhn ER, Leonard JL, Visser TJ. Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine affinity labels. *Mol Cell Endocrinol.*, v. 107, p.,173-180, 1997.

Santos RS. Programação da função tireóidea e do peso corporal em ratos adultos tratados com tiroxina durante o período neonatal. Rio de Janeiro: Dissertação de Doutorado - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, 2005.

Sahu A. Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology.*, v.139, p.795-798, 1998.

Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.24, p.225-253, 2004.

Sahu A, Kalra SP. Neuropeptidergic regulation of feeding behavior: neuropeptide Y. *Trends Endocrinol Metab.*, v.4, p. 217-224, 1993.

Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.*, v.2, p.589-593, 1996.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J.Clin.Invest.*, v.98, n.5, p.1101-1106, 1996a.

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

Segal-Lieberman G, Bradley RH, Kokkotou E, Carlson M, Carlson, Trombly D, Wang X, Bates SH, Myers Jr MG, Flier JS, Maratos-Flier E. Melanin-concentration hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci.*, v.100, p.10085-10090, 2003.

Seoane LM, Carro E, Tovar S, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation in vivo TSH secretion by leptin. *Regul. Pept.*, v.92, n.1-3, p.25-29, 2000.

Steinberg GR, Rush JW, Dyck DJ. AMPK expression and phosphorylation are increased in rodent muscle after chronic leptin treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, p.E648-654, 2003.

St. Germain DL & Croteau W. Ligand-induced inactivation of type I iodothyronine 5'-deiodinase: protection by propylthiouracil in vivo and reversibility in vitro. *Endocrinology*, v. 125, p. 2735-2744, 1989.

Shimada M, Tritos NA, Lowell BB, Flier JS, Maratos-Flier E. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature.*, v.396, p.670-674, 1998.

Silva JE & Larsen PR. Pituitary nuclear 3,5,3'-triiodothyronine and thyrotropin secretion: an explanation for the effect of thyroxine. *Science* v. 198, p.617-620, 1977.

Silva JE & Larsen PR. Comparison of iodothyronine 5'-deiodinase and other thyroid-hormone-depend enzyme activities in aptation to hypothyroidism. *J Clin Invest.*, v.70, p.1110-1123, 1983.

Silva JE & Larsen PR. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest*, v. 76, p. 2296-2305, 1985.

Silva JE, Larsen PR. Interrelationships among thyroxine, growth hormone, and the sympathetic nervous system in the regulation of 5'-iodothyronine deiodinase in rat brown adipose tissue. *J Clin Invest* .,v. 77,p.1214-1223, 1986b.

Simo R, Hernandez C, Zafon C, Galofre P, Castellanos JM, Mesa J. Short-term hypothyroidism has no effect on serum leptin concentrations. *Diabetes Obes Metab.*;v.2, p.317-321, 2000.

Smith-Kirwin, SM., O'Connor, DM., De Johnston, J., De Lancey, ED., Hassink, SG., Funanage, VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, v.83, p.1810-1813, 1998.

Song S, Sorimachi K, Adachi K, Oka T. Biochemical and molecular biological evidence for the presence of type II iodothyronine deiodinase in mouse mammary gland. *Mol Cell Endocrinol*, v.160, p.173-181, 2000.

Song YM, Sheu WH, Lee WJ, Wu CJ, Kao CH. Plasma leptin concentrations are related to body fat mass and gender but not to thyroid dysfunction. *J Med Sci.*,v.15, p.119-126, 1999.

Stansbie D, Browsey RW, Crettaz M, Demton RM. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of acids synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem J*, v.160, p.413-416, 1997.

Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signaling. *Nature*, v.387, p.917-921, 1997.

Stauffer CE. A Linear standard curve for the Folin Lowry determination of protein. *Anal Biochem*, v.69, p.646-648, 1975.

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, Mackeller W, Rosteck PR Jr, Schoner B, Smith D, Tinsley FC, Zhang X-Y, Heiman M. The role of neuropeptide Y in the anti obesity action of the obese gene product. *Nature*, v.377, p.530-532, 1995.

Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nosaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y. Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp 4) at the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 43489-43495, 2003.

Tagliaferri M, Berselli ME, Calo G, Minocci A, Savia G, Petroni ML, Viberti GC, Liuzzi A. Subclinical hypothyroidism in obese patients: relation to resting energy expenditure, serum leptin, body composition, and lipid profile. *Obes Res.*, v. 9, p.196-201, 2001.

Takekoshi K, Metooka M, Isobe K, Nomura F, Manmoku T, Ishii K, Nakai T. Leptin directly stimulates catecholamine secretion and synthesis in cultured porcine adrenal medullary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.261, p. 426-431, 1999.

Tanaka K, Murakami M, Greer MA. Type II Thyroxine 5' Deiodinase is Present in the Rat Pineal Gland. *Biochem Biophys Res Commun*, v.137,p.863-869, 1986.

Tartaglia LA. The leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.6093-6096, 1997.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.*, v.83, p.1263-1271, 1995.

Taurog A. Hormone synthesis: Thyroid metabolism. In: Braverman, LE, Utiger RD. The Thyroid. A Fundamental and Clinical Text. 7 ed. Philadelphia, p.47-52, 1996.

Teixeira CV, Ramos CD, Mouco T, Passos MC, De Moura EG. Leptin injection during lactation alters thyroid function in adult rats. *Horm Metab Res.*, .v.35, p.367-371, 2003.

Toyoda N, Harney JW, Berry MJ, Larsen PR. Identification of critical amino acids for 3,5,3'-triiodothyronine deiodination by human type 1 deiodinase based on comparative functional-structural analyses of the human, dog, and rat enzymes. *J Biol Chem.*, v. 269, p. 20329-20334, 1994.

Toste FP. Efeito do tratamento com leptina nos 10 primeiros dias de lactação sobre a resistência à ação da leptina, expressão de receptores de leptina, composição corporal e função tireóidea em ratas. Rio de Janeiro, Dissertação de mestrado: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, 2004.

Tsukahara F, Muraki, Nomoto T. Serum concentrations of thyroid hormones and activity of iodothyronine deiodinase in peripheral tissues of the house musk shrew, *Suncus murinus*. *J Endocrinology*, v.125, p.117-122, 1990.

Tsukahara F, Nomoto T, Maeda M. Properties of 5'-deiodinase of 3,3',5'-triiodothyronine in rat skeletal muscle. *Acta Endocrinologica*, v.120, p.69-74, 1989.

Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM. 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.

Uehara Y, Shimizu H, Ohtani K, Sato N, Mori M. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes.*, v.47, p.890-893, 1998.

Utiger RD. The thyroid : physiology, thyrotoxicoses, hypothyroidism, and the Painful Thyroid. In: Felig P, Baxter JD, Frohman LA. *Endocrinology and Metabolism*. 4.ed. New York, p. 435-519, 1996.

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat. Genet.*, v.14, p.95-97, 1996.

Van der Geyten S, Buys N, Sanders JP, Decuypere E, Visser TJ, Kuhn ER, Darras VM. Acute pretranslational regulation of type III iodothyronine deiodinase by growth hormone and dexamethasone in chicken embryos. *Mol Cell Endocrinol*, v.147, p.49-56, 1999.

Visser TJ, Leonard JL, Kaplan MM, Larsen PR. Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5'-deiodination in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.79, p.5080-5084, 1982.

Vuagnat BAM, Pierroz DD, Lalaoui M, Englaro P, Pralong FP, Blum WF & Aubert ML. Evidence for a leptin-neuropeptide Y axis for the regulation of growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, v.67, p.291-300, 1998.

Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N., Rossetti, L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*, v.393, p.684-688, 1998.

Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C, Kuijper JL. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest.*, v.96, p.2065-2070, 1995.

White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA. Leptin receptor, OB-R, signaling Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homooligomerization. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.4065-4071, 1997.

Woods AJ, Stock MJ. Leptin activation in hypothalamus. *Nature.*, v.381, p.745, 1998.

Wolff J. Transport of iodine and other anions in the thyroid gland. *Physiol Ver.*, v.44, p.45-90, 1964.

Wolff J & Chaikoff IL. Plasma inorganic iodine as a homeostatic regulator of thyroid function. *J. Biol. Chem.*, v.174, p.555-564, 1948.

Wondisford FE, Meier CA, Weintraub BD. Thyroid stimulating hormone in health and disease. In DeGroot LJP (ed) *Endocrinology* (3a ed) W B Saunders Co. Philadelphia, v.1, cap 12, p.208-217, 1994.

Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, v.141, p.4325-4328, 2000.

Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M, Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys.*, v.232, p.822-826, 1997.

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

Zavacki AM, Ying H, Christoffolete MA, Aerts G, So E, Harney JW, Cheng SY, Larsen PR, Bianco AC. Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. *Endocrinology*. v.146, p.1568-1575, 2005.

Zhang J & Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol*, v. 62, p. 439-466, 2000.

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

Zhao AZ, Bornfeldt KE, Beavo JA. Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J. Clin. Invest.*, v.102, p.869–873, 1998.

Zhao AZ, Huan JN, Gupta S, Pal R, Sahu A. A phosphatidylinositol 3-kinase phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nat. Neurosci.*, v.5, p.727–728, 2002.

Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, Beavo JA, Bornfeldt KE. Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.11348– 11354, 2000.