

LEPTINA

CARLA BAPTISTA

Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Hospitais da Universidade de Coimbra. Coimbra

RESUMO/SUMMARY

A leptina é uma hormona sintetizada nos adipócitos e codificada pelo gene *ob*. Desde a sua recente descoberta, a leptina tem sido amplamente estudada e numerosos trabalhos publicados. Os autores fazem uma revisão acerca da fisiopatologia e das possíveis acções desta hormona, nomeadamente, na etiologia da obesidade.

Palavras-chave: leptina, obesidade

Em 1953, Kennedy formulou a hipótese de que o tecido adiposo produziria uma substância que, ao actuar a nível central, controlava o peso¹. Nascia a teoria lipostática. Cinco anos mais tarde, Hervey demonstrou, em ratinhos, a presença desta substância. Para isso utilizou experiências de parabiose (circulação cruzada): o surgimento de obesidade, através da destruição do hipotálamo, em um membro de um par de ratos parabióticos levava à morte, por fome, do outro membro cujo hipotálamo não estava lesado². Desde essa altura muitos investigadores se dedicaram a tentar compreender os mecanismos que estariam na génese da obesidade. Mas, é a partir de 1994, quando Zhang et al identificaram o gene *ob* no ratinho e o seu homólogo humano³, que surgiu o que já foi classificado como os *anos gordos* do estudo da obesidade. Isto porque a identificação do gene permitiu a identificação da proteína por ele codificada. A esta proteína foi dado o nome de leptina (*leptus*, palavra grega que significa magro). Inicia-se uma verdadeira *leptinomania*. Numerosos investigadores em todo o mundo começaram a *olhar* para esta hormona como sendo o que à muito procuravam: a causa da obesidade. Este interesse traduz-se não só no número impressionante

LEPTIN

Leptin is a product of the *ob* gene. It is synthesized by the adipocytes. This review will summarize the current findings of the pathophysiology and actions of leptin.

Key words: leptin, fatness

de publicações existentes sobre este tema mas também no facto de, em relativamente pouco tempo, se terem efectuado novas descobertas à sua volta. Em 1995, Stephens et al demonstraram a grande afinidade que a leptina tem para o hipotálamo⁴ e Tartaglia et al identificaram o receptor através do qual actua (receptor *ob*)⁵. Em 1996, identificou-se o gene que codifica este receptor (gene *db*)⁶.

A leptina é uma hormona polipeptídica, formada por 167 aminoácidos (a.a.). A forma circulante tem só 146 a.a. (peso molecular 16 kDa), uma vez que a sequência amino terminal (21 a.a.) é removida aquando da sua secreção para a corrente sanguínea^{6,7}. Apresenta uma estrutura terciária homóloga à das citocinas, nomeadamente à das interleucinas (IL)^{6,7}. É codificada pelo gene *ob*. No homem, este gene está situado a nível do braço longo do cromossoma 7 (cr 7q31.3)⁷. É no tecido adiposo que o RNA do gene *ob* se encontra em maiores quantidades. Pequenos níveis foram detectadas no coração e na placenta⁷.

A leptina é sintetizada pelo tecido adiposo em proporção ao número e tamanho dos adipócitos⁶⁻⁸. O seu armazenamento nestas células é considerado insignificante, uma vez que é, praticamente, toda secretada para o sangue⁷.

Aqui, circula em duas formas: livre e ligada a proteínas de transporte⁶. Sabe-se, ainda, que é transportada através da barreira hemato-encefálica (B.H.E.) por um sistema de transporte unidireccional (sangue líquido cefalo-raquídeo) e saturável (limiar será de 25 ng/ml)^{6,7}. O local principal da sua acção é o hipotálamo, tendo-se verificado uma grande afinidade da leptina marcada com I¹²⁵ para com as membranas hipotalâmicas⁷.

A leptina actua unindo-se a receptores, cuja estrutura secundária é homologa à dos receptores das citocinas, sobretudo à sub-unidade GP130 do receptor da IL-6^{6,7}. Os receptores estão codificados no gene *db*. Pensa-se que este gene, no homem, se localiza no braço curto do cromossoma 1 (cr 1p31)⁷. Várias isómeros do receptor *ob* já foram identificadas: *ob-Ra*, *ob-Rb*, *ob-Rc*, *ob-Rd*, *ob-Re*. Cada uma das isoformas terá uma determinada função. Exceptuando o *ob-Re*, todos são formados por três domínios: extra-celular, transcelular e intra-celular. O número de a.a. da porção intra-celular é variável. O *ob-Rb* ou receptor *longo*, já que o domínio intra-celular é constituído por 304 a.a., foi detectado, sobretudo, no hipotálamo. Será através dele que a leptina exerce a sua acção biológica^{7,9}. Este receptor funciona de forma semelhante ao das citocinas. O domínio intracelular possui tirosinocinases denominadas Jaks. Estas, uma vez activadas, fosforilam o receptor e também factores de transcrição intracitoplasmáticos (STATs) que, por sua vez, a nível do núcleo, activam a transcrição de determinados genes⁷. O *ob-Ra* (domínio intra-celular com 34 a.a.) ou receptor *curto*, funcionará como transportador através da B.H.E. já que se encontra, sobretudo, a nível do plexo coróide^{7,9}. O *ob-Re* é formado sómente pelo domínio extra-celular. É a forma solúvel do receptor. Estudos com anticorpos sugerem que este receptor será uma das proteínas de transporte da leptina^{7,9}. O *ob-Rc* (domínio intracelular com 32 a.a.) funcionará, também, como transportador^{7,9}. No rato, os receptores já foram detectados em outros tecidos para além do plexo coróide e do hipotálamo^{6,7}, nomeadamente: rim, coração, pulmão, fígado, tecido adiposo, testículos⁷. No Homem, ainda não se detectou o receptor *curto*. O *longo* foi já identificado no hipotálamo⁷.

Foram os estudos efectuados em animais que trouxeram alguma luz sobre os possíveis efeitos da leptina. Há dois modelos genéticos básicos: o rato *ob/ob* e o rato *db/db*. No primeiro caso há, actualmente, duas mutações conhecidas. Ambas são recessivas. A mutação na estirpe C57BL/6J *ob/ob* verifica-se a nível do codão 105 com a substituição do nucleotídeo timina por citosina. Deste modo, forma-se um codão prematuro de *stop* que leva à acumulação de RNAm na célula e à formação de uma hormona mutilada, não funcionante^{7,10}. A mutação na estirpe

SM/CKC-+^{Dac} *ob^{2j}/ob^{2j}* deve-se a um polimorfismo na região promotora do gene, não havendo síntese de RNAm⁷. Em ambos os casos não há leptina circulante⁷. Estes ratinhos são obesos, esteréis e diabéticos, apresentando glicemias e insulinemias elevadas^{6,10,11}. O outro modelo é o rato *db/db* (equivalente ao rato de Zucker). Este, tem uma mutação recessiva no gene que codifica o receptor da leptina. O segmento intracelular do receptor *ob*, necessário à transdução do sinal, está incompleto⁷. Apesar de ter concentrações elevadas de leptina no sangue, o fenótipo deste rato é semelhante ao do *ob/ob* (6,10). Isto explica-se pelo facto de o receptor *ob* não ser funcionante. A administração de leptina no rato *ob/ob* corrige muitas das alterações que apresenta, nomeadamente metabólicas, com a normalização das glicemias e das insulinemias^{7,10,11} e, ainda, origina uma diminuição acentuada do peso (cerca de 40% em 33 dias)^{6,7,10-12}. Esta deve-se a uma diminuição do apetite e, conseqüentemente, da ingestão de alimentos, a uma elevação da termogénese, do consumo de oxigénio e da actividade locomotora^{6,7,10,12}. A perda de gordura é essencialmente à custa da massa gorda, uma vez que a massa magra fica, praticamente, inalterável¹⁰. Verifica-se, também, o restabelecimento da fertilidade: as fêmeas engravidam e nos machos há elevação dos níveis de testosterona. No rato *db/db* não obtemos nenhuma resposta à administração de leptina^{6,7,10,12}, pois o seu problema verifica-se a nível do receptor e não da deficiência em hormona. De salientar que, a administração de leptina em ratinhos magros ou em normoponderais associa-se, também, a uma diminuição do peso e da ingestão de alimentos. Mas, a intensidade da resposta é menor do que a verificada nos *ob/ob*^{6,10}. É como se tivéssemos uma escala na qual a resposta obtida após a administração de leptina é inversamente proporcional à quantidade de leptina circulante⁶.

Os neurotransmissores e/ou neuropeptídeos que medeiam a acção da leptina, a nível central, ainda não foram identificados. Um dos mais estudados é o neuropeptídeo Y (NPY). Por um lado, sabe-se, de longa data, que este é um potente estímulo para o apetite, que diminui a termogénese e que provoca uma elevação plasmática do cortisol e da insulina⁴. Por outro lado, a administração de leptina em ratinhos *ob/ob* associa-se a uma diminuição da concentração de RNAm e da libertação de NPY a nível hipotalâmico⁴. A administração exógena, nestes ratinhos, de NPY associa-se a um aumento do consumo de comida. Este resultado é antagonizado com a administração, posterior, de leptina⁶. Assim, a regulação do metabolismo do NPY no hipotálamo pode ser o mecanismo através do qual a leptina influencia o metabolismo energético. Mas, deve haver

outros mediadores, já que os ratinhos com peso normal e que têm deficiência em NPY respondem à administração de leptina⁶. Um destes mediadores poderá ser a CRH. A administração de leptina em ratos magros associa-se não só à diminuição do RNAm do NPY mas, também, a um aumento do RNAm da CRH. Sabe-se que a administração da CRH, em roedores, inibe o apetite⁶.

Em relação aos factores que regulam a produção de leptina entramos, uma vez mais, no campo das hipóteses. Como atrás já foi referido, esta hormona é sintetizada pelo tecido adiposo em proporção ao número e tamanho dos adipócitos. Daí que o próprio tamanho do adipócito poderá ser um factor importante na expressão do gene *ob*. *In vitro*, os adipócitos dos obesos continuam a produzir mais leptina que os dos magros. É fundamental perceber-se como é que o microambiente, na ausência de estímulos extracelulares, fornece as informações para o promotor da leptina⁹. Será através do estiramento da parede? da quantidade de triglicédeos armazenados? ou é pela presença de determinado metabolito intracelular?⁷ Mas, no Homem, a redução do peso em 10% associa-se a uma diminuição da leptina em 53%⁸. Esta diminuição tão acentuada, face à pequena alteração do peso, sugere que a sua produção é regulada por outros factores que não o tamanho dos depósitos adiposos. Isto é apoiado pelo facto de em indivíduos, obesos ou normoponderais, submetidos a um jejum prolongado (52h) se ter verificado uma diminuição da leptinemia às 24h de 50%, enquanto que a perda de gordura corporal foi só de 0,5%. A infusão de glicose preveniu a diminuição da leptinemia. Isto sugere, igualmente, que outros factores, como a relação insulínia/glicémia ou o sistema nervoso autónomo, regulam a libertação de leptina¹³. Parece haver, de facto, uma acção inibitória do SNC a nível da produção da leptina. A exposição de ratinhos ao frio associou-se ao desaparecimento do RNAm da leptina. Isto pode ser mimetizado com a administração de adrenalina ou de outro agonista β -adrenérgico (por ex: isoprenalina)¹². Também a estimulação dos receptores β_3 diminui a expressão do gene *ob* em ratinhos A/J¹³. Os glicocorticóides poderão, também, estar implicados, já que a sua administração quer no rato quer no homem, se associa a uma elevação de RNAm do gene *ob* e, conseqüentemente, a hiperleptinemia^{12,14,15}. Finalmente, vejamos qual o papel da insulina. A sua acção tem sido amplamente estudada. Os dados obtidos apontam para um papel importante na regulação da leptina, tanto nos animais como no homem. Há vários factos que apoiam esta hipótese. A administração de insulina^{7,10} em ratinhos, provoca uma elevação dos níveis plasmáticos de leptina. Verificou-se, por exemplo, que em ratos submetidos a *clamps* hiperinsulinémicos e euglicémicos havia uma

elevação acentuada do RNAm da leptina (três vezes mais)^{10,13}. Estudos *in vitro* em que se associou insulina a uma cultura de adipócitos, o RNAm da leptina duplicou em 24h¹⁰. Ratos com diabetes mellitus induzida pela estreptozotocina apresentam baixos níveis de RNAm da leptina, que se elevam após a infusão de insulina^{7,11,13}. Também se demonstrou que a secreção de leptina, no rato, tem uma certa ritmicidade que, por sua vez, está dependente da ingestão de comida. Isto é, a leptinemia é baixa durante o dia e eleva-se á noite, quando o rato começa a alimentar-se. Este ritmo é abolido pelo jejum¹⁰. Estes dados apoiam a ideia de que a insulina nestes animais desempenha um importante papel na regulação da produção de leptina. O que se desconhece é se ela actua directamente ou se a sua acção é secundária ao papel que desempenha, por exemplo, no metabolismo lipídico⁷. A insulina não parece ter, no homem, um efeito agudo^{14,15}. Por exemplo, não há elevação pós-prandial de leptina⁹. Esta não actuará, ao contrário do que sucede no ratinho, como um factor de saciedade. Cronicamente, no entanto, a insulina parece desempenhar um importante papel na expressão do gene *ob* e na secreção de leptina. A administração prolongada de insulina associa-se a uma elevação da leptinemia. É o que sucede nos diabéticos tipo 2 sob insulino-terapia. Estes, apresentam níveis de insulínia e de leptinemia superiores aos dos diabéticos tratados com dieta ou com anti-diabéticos orais¹¹. Em estudos com *clamps* hiperglicémicos com duração de três dias, só houve elevação da leptina nas últimas 24h⁹. A corroborar a acção crónica temos o facto de nos adipócitos, em estudos *in vitro*, a insulina só induzir a expressão do gene *ob* e a síntese de leptina às 48 h⁹.

Como podemos constatar, a maioria dos estudos são realizados em animais, sobretudo em ratinhos *ob/ob* ou *db/db*. No entanto, um número cada vez maior de estudos estão a ser efectuados no homem. Neste a leptina correlaciona-se com a percentagem de gordura corporal^{16-8,14,16-18}, de forma exponencial, e com o índice de massa corporal^{7,11,14,17,18}. Bastante controverso é a sua correlação com a insulínia em jejum^{8,11,14,16,18} e a idade^{8,16}. Há estudos recentes que demonstram uma diminuição na concentração de leptina nos pacientes com idade superior a 60 anos (diminuição na produção? alteração na excreção?)¹⁶. Menos controverso são os recentes estudos que atribuem uma variação sexual^{6,7,11,14,16,19}. Isto é, os homens têm menos leptina que as mulheres (independentemente de factores como a percentagem de gordura corporal). Esta diferença pode ser devida a uma determinada acção, ainda desconhecida, das hormonas sexuais a nível do sistema efector da leptina¹⁹. Há, também, uma variação circadiana da leptina com níveis mais elevados à noite.

Em relação aos ratinhos ob/ob e db/db já existe, como atrás já foi referenciado, uma explicação para o facto de serem obesos. Essa explicação passa pela leptina. No homem a situação não é tão clara. Sabe-se que os obesos têm cerca de 4 vezes mais leptina que os magros ($31,3 \pm \pm 24,1$ versus $7,5 \pm 9,3$ ng/ml)⁸, sendo o tempo de semi-vida semelhante nos dois casos ($24,9 \pm 4,4$ min)¹⁷. Consequentemente, as elevadas concentrações encontradas nos obesos deve-se a um aumento da produção e não a alterações na eliminação. Actualmente, ainda não se conhece nenhuma mutação a nível do gene db. Em relação ao gene ob, foi descrito, recentemente, uma mutação em dois familiares paquistaneses com obesidade grave e com concentrações plasmáticas de leptina muito baixas. A mutação envolve a deleção do nucleótido guanidina no codão 133²⁰. Nenhuma outra mutação foi encontrada. O que se tem verificado no estudo genético é a existência de polimorfismos, quer do gene ob (por ex: substituição de valina por metionina na posição 94)²¹ quer do gene db (por ex: substituição da glutamina por arginina na posição 223)^{7,22}, mas que não se correlacionam com o fenótipo. Todos estes dados levam a formular a hipótese de que a maioria dos obesos serão resistentes à leptina endógena. Vários mecanismos foram propostos na tentativa de se explicar esta resistência: existência de antagonistas ou de auto-anticorpos anti-leptina; diminuição de leptina na forma livre, por aumento da sua ligação às proteínas plasmáticas (de salientar que o que se doseia actualmente é a leptina total, com todas as consequências práticas que isto acarreta); diminuição do transporte através da B.H.E^{7,9}. A saturação do sistema de transporte poderia contribuir para a resistência à leptina nos obesos, uma vez que nestes a concentração plasmática é muito superior à encontrada no L.C.R.⁷. Mas, provavelmente, isto não é a causa do início da doença pois, a saturação do transportador (25 ng/ml) ocorre, nos obesos, a uma concentração que é três vezes superior à dos magros⁷. Ou seja, o limiar de transporte parece ser suficientemente amplo para prevenir a obesidade antes do sistema ficar saturado. O mais provável é que a resistência se verifique a nível central, mais concretamente que seja alguma alteração pós-receptor, nomeadamente na transdução ou na integração do sinal. serão resistentes à leptina endógena. Só uma pequena percentagem das obesidades é que poderá ser explicada pela deficiência em leptina (5% dos obesos são hipoleptinemicos)⁹.

Outro aspecto importante é o drama dos obesos não conseguirem manter o peso perdido. Tal facto, poderá ser explicado pela diminuição acentuada da leptina circulante. A relação leptina/percentagem gordura corporal diminui muito nas mulheres obesas que perdem peso, ficando prati-

camente inalterável nas normoponderais que emagrecem¹⁴. É como se estivessem programados para um dado peso. Ao emagrecerem há uma diminuição da produção de leptina. Consequentemente, voltam a engordar até ao seu peso. Nos obesos isto faz-se sentir de forma mais marcada já que a diminuição da leptinemia é maior.

Como já foi dito, a leptina criou um verdadeiro interesse, quer dos médicos quer da comunidade científica em geral. Este interesse transpôs o problema da obesidade. Há quem a veja como uma hormona que permite ao homem adaptar-se ao meio ambiente. É a teoria evolucionista que sugere que a leptina permite conservar a energia durante períodos de escassez de alimento e previne a obesidade em épocas em que este haja em excesso¹⁰. Outros vêem-na como o sinal à muito procurado para o começo e manutenção da puberdade. Flier et al constataram, em oito rapazes, uma elevação da concentração plasmática de leptina (duas a três vezes os valores basais) na altura em que a testosterona começa a ser doseável⁶. De referir que os níveis de leptina correlacionam-se, também, com os estádios de Tanner⁷. A administração de leptina, no ratinho antecipa o início da puberdade e no ob/ob restabelece a fertilidade^{6,10}, associando-se a uma elevação dos níveis plasmáticos de LH na fêmea e FSH no macho²³. Para finalizar, esta hormona pode ser o elo que relaciona a quantidade de gordura corporal e o começo e manutenção da ovulação e da menstruação. Várias observações apoiam esta teoria. Frish et al notaram, à cerca de vinte anos, que a menarca surgia quando a gordura corporal atingia um certo limiar. As atletas, nomeadamente as corredoras de longa distância, as bailarinas, as mulheres desnutridas (por ex: com anorexia nervosa), são hipoleptinemicas^{18,24}. Têm níveis de gordura abaixo do limiar defendido por Frish e, associadamente, têm amenorreia. De notar, também, a ausência do ritmo circadiano da leptina nas atletas com amenorreia²⁴. No outro extremo, temos as obesas cujas irregularidades menstruais são corrigidas com pequenas perdas de peso.

Desde a sua descoberta que a leptina tem sido amplamente estudada e numerosos estudos publicados na tentativa de se determinar exactamente quais os mecanismos fisiológicos que lhe estão subjacentes e quais as suas funções no Homem. Muitas dúvidas e incertezas ainda subsistem. Muitas especulações continuam a ser formuladas. E, como afirmou Richard Wurtman, em 1996, : ... *now let the search begin for what leptin really does...*

BIBLIOGRAFIA

1. KENNEDY GF: The role of the depot fat in the hypothalamic control of food intake in rat. Proc R Soc Lond 1953; 140: 578-592
2. HERVEY GR: The effects of lesions in the hypothalamus in prarbiotic rats. J Physiol 1958; 145: 336-352

3. ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432
4. STEPHENS TW, BASINSKI M, BRISTOW PK et al: The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995; 377: 530-2
5. TARTAGLIA LA, DEMBSKI BM, WENG X et al: Identification and expression cloning of a leptin receptor (ob-R). *Cell* 1995; 83: 1263-1271
6. CAMPFIELD LA, SMITH FJ, BURN P: Ob protein: a hormonal controller of central neural networks mediating behavioral, metabolic and neuroendocrine responses. *Endocrinol Metab* 1997; 4: 81-102
7. CONSIDINE RV, CARO JF: Leptin: genes, concepts and clinical perspective. *Horm Res* 1996; 46: 249-256.
8. CONSIDINE RV, SINHA MK, HEIMAN ML et al: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Eng J Med* 1996; 334 (5): 292-295
9. CARO JF, SINHA MK, KOLACZYNSKI JW, ZHANG PL, CONSIDINE RV: Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996; 45: 1455-1462
10. WOLF G: Leptin: the weight-reducing plasma protein encoded by the obese gene. *Nutr Rev* 59; 3: 91-93
11. WIDJAJA A, STRATTAON IM, HORN R, HOLMAN RR; TURNER R, BRABANT G: UKPDS 20: plasma leptin, obesity and plasma insulin in type 2 diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(2): 654-657
12. TRAYHURN P, RAYNER DV: Hormones and the ob gene product (leptin) in the control of energy balance. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 565-569
13. BODEN G, CHEN X, MOZZOLI M, RYAN I: Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(9): 3419- 3423
14. HAVEL PJ, KARAKAS SK, MUELLER W, JOHNSON PR, GINGERICH RL, STERN JS: Relationship of serum leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(12): 4406-4413
15. DAGOGO JS, SELKE G, MELSON AK, NEWCOMER JW: Robust leptin secretory response to dexamethasone in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(10): 3230-3232
16. OSTLUND RE, YANG JW, KLEIN S, GINGERICH R: Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(11): 3909-3913
17. KLEIN S, COPPACK SW, MOHAMED-ALI V, LANDT M: Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 1996; 45: 984- 987
18. GRINSPOON S, GULICK T, ASKARI H et al: Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(11): 3861- 3863
19. KENNEDY A, GETTYS TW, WATSON P et al: The metabolic significance of leptin in humans: gender-based differences in relationship to adiposity, insulin sensitivity and energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(4): 1293-1300
20. MONTAGUE CT, FAROOQI IS, WHITEHEAD JP et al: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997; 387 (6636): 903-8
21. CONSIDINE RV, CONSIDINE EL, WILLIAMS CJ et al: Mutation screening and identification of a sequence variation in the human ob gene coding. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 735-739.
22. CONSIDINE RV, CONSIDINE EL, WILLIAMS CJ, HYDE TM, CARO JF: The hypothalamic leptin receptor in humans. *Diabetes* 1996; 45: 992- 994
23. BUCHANAN C, MAHESH V, ZAMORANO P, BRANN D: Central nervous system effects of leptin. *Trends Endocrinol Metab*. 1998; 9 (4): 146-150
24. LAUGHLIN GA, YEN SSC: Hypoleptinemia in women athletes: absence of a diurnal rhythm with amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(1): 318- 321