UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

JADE CABESTRE VENANCIO

**Efeito da dieta hiperlipídica sobre a responsividade de
neurônios kisspeptidérgicos à leptina.**

RIBEIRÃO PRETO

2015

JADE CABESTRE VENANCIO

**Efeito da dieta hiperlipídica sobre a responsividade de neurônios
kisspeptidérgicos à leptina.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias

RIBEIRÃO PRETO

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Venancio, Jade Cabestre.

Efeito da dieta hiperlipídica sobre a responsividade de neurônios kisspeptidérgicos à leptina./ Jade Cabestre Venancio; orientador: Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias - Ribeirão Preto, 2015.

122p: il;

Dissertação de mestrado (Fisiologia) -- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP -- Ribeirão Preto, 2015.

1.Leptina 2.Kisspeptina 3.Dieta Hiperlipídica 4.Maturação Sexual 5.Puberdade 6.Arqueado

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jade Cabestre Venancio

Efeito da dieta hiperlipídica sobre a responsividade de neurônios kisspeptidérgicos à leptina.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Aprovado em: _____ de _____ de _____

Banca Examinadora

Prof(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Prof(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

Prof(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura _____

“É preciso que eu suporte duas ou três lagartas se quiser conhecer as borboletas...”

Antoine de Saint-Exupéry - O pequeno príncipe.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me aceitar com minhas falhas e temores e me alcançar com sua maravilhosa graça! Por ser o descanso da minha alma e a certeza de que estou segura em suas mãos.

Aos meus pais, que são tão preciosos pra mim, pelo amor e dedicação dispensados em minha criação, pelos limites e pelo incentivo nos estudos. Ao meu pai, Jair da Luz Venancio por me ensinar a valorizar as pequenas coisas da vida, a disciplina e o compromisso no trabalho. À minha mãe, Maria Cristina Cabestre, pelo seu exemplo nos estudos, pelo seu colo consolador, pelos conselhos na minha caminhada e por me mostrar que sempre há uma saída para os nossos problemas diários.

Ao meu namorado, Matheus Garcia Brochi, pelo seu amor, sua parceria e pela força ao longo do desenvolvimento desse trabalho. Por não medir esforços para me ajudar, seja me buscando na USP à noite, seja me auxiliando na qualificação e na análise dos resultados. Por me ajudar a refletir nos momentos de decisão, pelo suporte emocional e pela sua doce companhia que trouxe mais sorrisos e cores aos meus dias.

À família Brochi, pelo amor, sorrisos e carinho com que me receberam na família, ajudando em minha adaptação e a me sentir bem e verdadeiramente em casa, em Ribeirão Preto.

A todos meus familiares e amigos que me rodearam de amor, carinho e alegria ao longo da minha formação. Em especial, a tia Lú, por conversar bastante comigo e sempre me aconselhar. Ao meu irmão e meu sobrinho, Caleb e Isaac, que me fizeram rir de mim mesmo em muitos momentos. Aos amigos de longe, Nathália, Helen, Paula, Rafaela, Nayra, Juliana, Samara e Cassandra. Aos amigos de perto, Maraine, Fernanda, Dafne, Ludmila, Junia, Clarissa, Sarai e Camila.

Aos queridos amigos da igreja Presbiteriana Ebenézer e da Aliança Bíblica Universitária, que me acolheram em Ribeirão Preto e fortaleceram a minha caminhada com Cristo.

À minha orientadora, Prof. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias, pela oportunidade de desenvolver o mestrado em seu laboratório, pela sua competente orientação, pelo seu exemplo de pesquisadora, médica, professora e mãe. Pela disposição em auxiliar em experimentos mesmo depois de um longo dia de trabalho, pelo incentivo constante na conclusão de cada etapa e por me incentivar a buscar novas abordagens para este projeto. Agradeço também pelas contribuições na elaboração dessa dissertação.

À minha coorientadora, Dra Lisandra Oliveira Margatho, pela oportunidade de trabalhar com os camundongos Kiss1-hrGFP, por investir tempo em ensinar todas as técnicas e ter ajudado efetivamente na execução dos protocolos experimentais. Pelas contribuições na elaboração do projeto e dessa dissertação. E por todas as vezes que me ajudou para que eu pudesse visitar minha família ou estudar.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues por inicialmente me indicar para a prof^a Lucila, pelo seu auxílio nos experimentos e pelo seu grande exemplo de amor e dedicação à pesquisa e ao nosso laboratório. À dupla, Profa Lucila e Prof Antunes, agradeço por buscarem dar a todos no laboratório as melhores condições para executarmos a nossa pesquisa!

Aos Professores da banca, Renata Frazão e Sonir Roberto Rauber Antonini por aceitarem o convite e pelas contribuições na elaboração da versão definitiva deste trabalho.

À pesquisadora Dra Roberta Rosales, por me apresentar o multifóton, realizar o meu treinamento para a captura das imagens, no auxílio nas análises e por me mostrar as numerosas informações que uma imagem pode fornecer.

Ao excelente apoio técnico da Maria Valci e Milene Mantovani, que contribuíram, direta e indiretamente, para cada resultado obtido nesse trabalho e pelo conhecimento técnico-científico que me ajudaram a construir ao longo desses dois anos.

Ao laboratório do Prof. Fernando de Queiróz Cunha por disponibilizar o aparelho Luminex e ao excelente apoio técnico da Giuliana Bertozzi Francisco na dosagem hormonal de LH, que se dispôs prontamente a nos ajudar na execução dessa técnica.

Aos amigos do laboratório, André, Beatriz, Carla, Ernane, Fabiana, Fernanda, Gislaine, Helen, Juliana, Lucas, Márcia, Mariana, Paula, Priscila, Ricardo, Rodrigo, Silvia, Suzana, Tatiane e Vanessa, por compartilharem a experiência na pesquisa, pelos conselhos de quem já passou pelo mestrado e pela amizade e apoio nesse período! Em especial, agradeço ao Rodrigo Rorato por contribuir na elaboração dos protocolos de imunofluorescência. À Gislaine e ao Ricardo, por compartilharem o rico conhecimento em estatística, contribuindo com a análise dos dados e pela paciência em tirar as minhas recorrentes dúvidas!

Aos queridos professores da Escola Batista de Educação Integral, da Universidade Estadual de Maringá e do departamento de Fisiologia da FMRP que contribuíram e foram essenciais para minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Apoio Técnico e Financeiro da CAPES, Cnpq e FAPESP.

RESUMO

VENANCIO, J. C.; **Efeito da dieta hiperlipídica sobre a responsividade de neurônios kisspeptidérgicos à leptina.** 2015,122 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O aumento da obesidade infantil tem sido correlacionado com a prevalência da puberdade precoce. Em animais pré-puberes verifica-se que a administração da dieta hiperlipídica induz a antecipação da puberdade. Estudos sugerem que a leptina pode influenciar o eixo reprodutivo por meio de sua ação em neurônios que expressam kisspeptina, no hipotálamo. Uma subpopulação de neurônios kisspeptidérgicos do núcleo arqueado coexpressa a dinorfina e neuroquinina B, que exercem uma ação autorreguladora sobre a secreção de kisspeptina. Considerando que a leptina, a kisspeptina, neuroquinina B e dinorfina são apontados como reguladores do início da puberdade e da função reprodutiva, este trabalho investigou como a dieta hiperlipídica (HFD) pode influenciar esses moduladores ao longo do início do desenvolvimento puberal e após a maturação sexual. Camundongos fêmeas Kiss1-hrGFP foram tratadas com a HFD ou dieta controle a partir do desmame e foram decapitadas aos 28, 32 e 63 dias (Diestro II) e o sangue coletado para dosagem plasmática de leptina, LH e estradiol. Um segundo grupo de fêmeas, tratadas com HFD ou dieta controle, receberam com 32 e 63 dias (Diestro I) uma injeção intraperitoneal de leptina (0,5 mg/kg) ou de veículo, 45 minutos após a injeção foram anestesiadas e submetidas à perfusão cerebral. Cortes hipotalâmicos foram utilizados para realização da técnica de imunoistoquímica para dupla marcação: Kiss1-p-STAT3/ p-STAT3-CART/ Kiss1-Dyn e Kiss1-NKB. Verificamos que a HFD administrada após o desmame, quando comparada à dieta controle, antecipou a abertura vaginal, o primeiro estro e o início da ciclicidade em fêmeas Kiss1-hrGFP. Como indicativo de ativação do eixo reprodutivo neste grupo, foi observado aumento do peso do útero e ovário, aos 32 dias. Esses efeitos estiveram associados com: a) o aumento da concentração plasmática de leptina; b) aumento da ativação de p-STAT3 no núcleo arqueado (ARC) e c) aumento de p-STAT3 em neurônios Kiss1-hrGFP e em neurônios CART do ARC em resposta ao estímulo da leptina. A HFD não afetou a colocalização entre Kiss1-Dyn e Kiss1-NKB em fêmeas no início do desenvolvimento puberal. Em fêmeas Kiss1-hrGFP (63 dias) a administração da HFD por 6 semanas não alterou a regularidade do ciclo estral, houve elevação da leptina plasmática associada com diminuição da expressão da p-STAT3 no ARC em resposta ao estímulo com leptina, sem alterar a responsividade dos neurônios Kiss1-hrGFP a este hormônio. Em conclusão,

os resultados demonstram que a antecipação da puberdade induzida pela HFD está associada com o aumento da ação central da leptina, que ao estimular o sistema kisspeptidérgico, direta ou indiretamente, por meio de neurônios CART, pode aumentar o tônus excitatório sobre o eixo reprodutivo. A administração da HFD após o desmame (6 semanas) promoveu uma redução à resposta da leptina no ARC na vida adulta, porém não afetou a responsividade dos neurônios Kiss1-hrGFP a este hormônio e nem a regularidade do ciclo estral nas fêmeas Kiss1-hrGFP. Em conjunto, esses resultados indicam que as ações da leptina nesses neurônios foram preservadas, mesmo com a resistência parcial de suas ações no ARC. Estudos adicionais deverão ser realizados para se avaliar os efeitos a longo prazo da HFD sobre o eixo reprodutivo.

Palavras Chaves: 1. Leptina 2. Kisspeptina 3. Dieta Hiperlipídica 4. Maturação Sexual 5. Puberdade. 6. Núcleo Arqueado.

ABSTRACT

VENANCIO, J. C.; **Effect of high fat diet on the responsiveness of Kiss1-hrGFP neurons to leptin.** 2015, 122f. Dissertation (Master) -Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The increase of childhood obesity has been correlated with the early onset of puberty. In prepubertal animals it appears high fat diet (HFD) induces anticipation of puberty. Several studies have indicated that the effect of leptin on reproductive axis can be mediated by its action on Kiss1 neurons in the hypothalamus. A subpopulation of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus also shows co-expression of neurokinin B and dynorphin A, presenting a self-regulatory action kisspeptin secretion. Since leptin, kisspeptin, neurokinin B and dynorphin are identified as regulators of puberty onset and reproductive function, this study investigated the influence of high fat diet on these modulators along puberty onset and after sexual maturation. A group of Kiss1-hrGFP-female mice received the HFD or regular chow after weaning. The Kiss1-hrGFP females were decapitated at 28, 32 and 63 days old (Diestrus II) and blood was collected for measurement of plasma leptin, LH and estradiol. A second group of females, treated with HFD or chow after weaning, received at 32 and 63 days old (Diestrus I) an intraperitoneal injection of leptin (0.5 mg / kg) or vehicle, and 45 minutes after they were anesthetized and subjected to cerebral perfusion. Immunohistochemistry was performed for double labeling: Kiss1-p-STAT3/ p-STAT3-CART/ Kiss1-Dyn and Kiss1-NKB in the hypothalamus. It was found that, compared to controls; the HFD anticipated the vaginal opening, the first estrus and the beginning of cyclicity in Kiss1-hrGFP females. An increase in the uterine weight and ovaries, confirmed the activation of reproductive axis in the HFD group at 32 days old. These effects were associated with: a) an increase in plasma leptin concentration; b) the activation of p-STAT3 in the arcuate nucleus (ARC) and c) the increase of p-STAT3 in Kiss1-hrGFP neurons and in CART neurons of the ARC in response to the stimulus of leptin. HFD didn't affect colocalization between Kiss1-Dyn and Kiss1-NKB in females mice at the pubertal onset. Kiss1-hrGFP female mice (63 days old), exposed to HFD for 6 weeks, exhibited regular estrous cycles, increased plasma levels of leptin associated with a decreased p-STAT3 expression in the ARC after leptin stimulation, with no changes in the responsiveness of Kiss1-hrGFP neurons to this hormone, compared to controls. In conclusion,

the results demonstrate that the early puberty induced by the HFD is associated with increased central leptin action, by stimulating the kisspeptidergic system, directly or indirectly, through CART neurons that can increase the excitatory tone in the reproductive axis. The administration of HFD after weaning (6 weeks) induced a decrease on the response to leptin in the ARC in adulthood, but without changes in the responsiveness of Kiss1-hrGFP neurons to this hormone and the regularity of the estrous cycle in Kiss1-hrGFP females. Taken together, these results indicate that the actions of leptin in kisspeptin neurons were preserved after 6 weeks of HFD, despite the partial resistance to this hormone in the ARC. Additional studies should be conducted to evaluate the long-term effects of HFD in the reproductive axis.

Key Words: 1. Leptin 2. Kisspeptin 3.High fat diet 4. Sexual Maturation 5. Puberty. 6. Arcuate nucleus.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Animais.....	34
3.2 Dieta	35
3.3 Procedimentos cirúrgicos.....	35
3.4 Genotipagem de camundongos Kiss1-hrGFP	35
3.5 Imunoistoquímica.....	36
3.6 Dosagem de leptina, estradiol e LH no plasma	40
3.7 Análise da Ingestão Alimentar	40
3.8 Análise do Ciclo Estral	41
3.9 Análise estatística.....	42
3.10 Protocolos Experimentais	43
4. RESULTADOS	48
Estudo 1: Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ingestão alimentar, peso corporal e índices da maturação puberal.	49
Estudo 2. Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a concentração plasmática de leptina, LH e estradiol e peso do útero e ovário de camundongos Kiss1-hrGFP fêmeas.....	53
Estudo 3- Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ativação de STAT3 em neurônios kisspeptidérgicos e neurônios CART de camundongos fêmeas Kiss1-hrGFP em resposta ao estímulo com leptina no início da puberdade.	57
Estudo 4. Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a coexpressão de Neuroquinina B e Dinorfina em neurônios Kiss1-hrGFP de fêmeas durante o início da puberdade.	67
Estudo 5- Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ativação de STAT3, em neurônios kisspeptidérgicos em resposta ao estímulo com leptina após a maturação sexual.	74
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES.....	96
7. BIBLIOGRAFIA	98

1.INTRODUÇÃO

A puberdade consiste no processo que conduz à maturação física e sexual, envolvendo o desenvolvimento das características sexuais secundárias, crescimento corporal, bem como, mudanças comportamentais (EBLING, 2005; TANAKA et al., 2008). As alterações físicas resultam do aumento da atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal no início da puberdade. O aumento da atividade deste eixo evidencia-se pela reativação da secreção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), resultando em aumento do número e amplitude dos pulsos espontâneos de secreção das gonadotrofinas (hormônio luteinizante, LH, e o hormônio folículo estimulante, FSH), e também pelo incremento do pico de liberação do LH e FSH em resposta à estimulação pelo GnRH (OERTER et al., 1990). O LH e FSH atuam em células somáticas das gônadas para aumentar a biossíntese e liberação de hormônios esteroides sexuais que promovem o desenvolvimento puberal e da função reprodutiva (PLANT; BARKER-GIBB, 2004; PLANT e WITCHEL, 2006; TERASAWA et al., 2010).

O início da puberdade é regulado por sistemas neurais que reativam a secreção de GnRH, no entanto, os fatores responsáveis por este evento ainda não foram bem estabelecidos (EBLING, 2005; PLANT AND BARKER-GIBB, 2004, PLANT AND WITCHEL, 2006, TERASAWA et al., 2010). Como descrito por Charles Darwin(1868 apud CHEUNG et al., 1997), a disponibilidade de reservas energéticas no organismo é capaz de afetar a fertilidade e o início da puberdade em mamíferos. De acordo com estudos clássicos de Kennedy e Mitra, 1963)e Frisch et al. (1970), o tempo da maturação reprodutiva associa-se com o peso e composição corporal. Frisch (1980) defende que há um peso corporal crítico ou uma quantidade de tecido adiposo crítica que possibilitam o início da puberdade, de tal forma que alterações na dieta ou na prática de exercícios influenciam o tempo da maturação puberal (FRISCH; et al., 1980; WARREN, 1980). Estudos demonstram que o início da puberdade tem ocorrido mais precocemente em meninas na Europa e nos Estados Unidos (AKSGLAEDE et al., 2009; BIRO; WIEN, 2010; EULING et al., 2008; SØRENSEN et al., 2012). Paralelamente, existem evidências de uma crescente epidemia global de obesidade entre as crianças em idade escolar nos últimos 40 anos (WANG; LOBSTEIN, 2006). A observação de que meninas com peso acima da faixa correspondente da normalidade tendem a entrar na puberdade mais cedo do que meninas magras (GARN; HASKELL, 1959) sugere que a quantidade de adiposidade corporal pode promover eventos neuroendócrinos que dão início à maturação sexual (FRISCH; MCARTHUR, 1974).

Tem sido observada a relação entre o aumento da obesidade e a ocorrência da puberdade precoce nos últimos anos. Estudos epidemiológicos demonstram que a obesidade infantil ou no período peripuberdade associa-se com a puberdade precoce em meninas (AHMED; ONG; DUNGER, 2009; AKSGLAEDE et al., 2009; DAVISON; SUSMAN; BIRCH, 2003; HE; KARLBERG, 2001; KAPLOWITZ, 2008; LEE et al., 2007; MAISONET et al., 2010; ROSENFELD; LIPTON; DRUM, 2009). Nos Estados Unidos da América a investigação de Herman-Giddens et al. (1997) revelou o aparecimento precoce de manifestações da puberdade em meninas, como o desenvolvimento das mamas, presença de pelos pubianos e menarca, o que foi correlacionado com o aumento da prevalência de sobrepeso entre os adolescentes no país. Em 1994, 25 % dos adolescentes nos EUA estavam acima do peso comparado com 15% em 1980 (TROIANO; FLEGAL, 1998). Estudo de Davison et al. (2003), demonstrou que meninas que tinham maior peso corporal ou índice de massa corpórea apresentaram maior probabilidade de iniciar precocemente o desenvolvimento reprodutivo.

A puberdade precoce está associada com redução da estatura final, aumento do risco de câncer de mama, doenças cardiovasculares, diabetes e disfunções reprodutivas na vida adulta (AHMED; ONG; DUNGER, 2009; CASTELLANO et al., 2011; DUNGER; AHMED; ONG, 2006; MONTE; LONGUI; CALLIARI, 2001). Além disso, a obesidade na transição da puberdade associa-se com o desenvolvimento da síndrome dos ovários policísticos em adolescentes (FRANKS, 2008). Em suma, tem sido preconizado que o início da puberdade e a maturação sexual dependem da sinalização da leptina, que tem sido amplamente estudada e reconhecida como um fator permissivo para o começo da puberdade (APTER, 2003; FAROOQI et al., 2002; GUEORGUIEV; GÓTH; KORBONITS, 2001; SCHNEIDER, 2004). Roedores alimentados com dieta obesogênica representam um modelo experimental que mais se aproxima da obesidade humana (ENRIORI et al., 2007b; TORTORIELLO; MCMINN; CHUA, 2004). Este modelo é uma condição poligênica, que semelhante à obesidade humana, reflete a interação da predisposição genética com o ambiente (TORTORIELLO; MCMINN; CHUA, 2004). Esses animais apresentam aumento simultâneo dos níveis circulantes de leptina e insulina, mas diminuição da sensibilidade aos efeitos fisiológicos desses hormônios relacionados com o metabolismo energético (VAN HECK et al., 1997; WANG et al., 2001).

Puberdade, Dieta Hipercalórica e Leptina

A prevalência da obesidade tem aumentado nos últimos anos e possivelmente resulta da complexa interação de fatores genéticos, dieta, atividade física e do ambiente (BIRO et al., 2010). A obesidade infantil relaciona-se com a mudança dos hábitos alimentares que acompanharam o processo de industrialização, incluindo a ingestão de alimentos com maior quantidade de gordura (BOWMAN et al., 2004) e o aumento da frequência de pequenas refeições de alto conteúdo energético (JAHNS; SIEGA-RIZ; POPKIN, 2001; MCCONAHY et al., 2004).

Em roedores, a composição da dieta foi correlacionada com a antecipação da puberdade, evidenciada pela abertura vaginal e pelo início do ciclo estral (BRILL; MOENTER, 2009; FRISCH; HEGSTED; YOSHINAGA, 1975, 1977; KIRTLEY; MAHER, 1979). Ratas que receberam dieta hiperlipídica após o desmame apresentaram antecipação da abertura vaginal e do início do ciclo estral, em relação ao grupo de ratas que recebeu a dieta com baixo teor de lipídeos (KIRTLEY e MAHER, 1979). Frisch et al. (1975) também verificaram que a administração da dieta hiperlipídica (com substituição isocalórica de lipídeos por carboidratos) promoveu antecipação da abertura vaginal e do primeiro estro em ratas em relação ao grupo controle. Em camundongos da linhagem C57Bl6/J, a administração de dieta hiperlipídica após o desmame, antecipou a abertura vaginal; indicando a antecipação da puberdade (BRILL E MOENTER, 2009). Nesse sentido, os autores desses estudos sugerem que existem sinais metabólicos relacionados com a adiposidade corporal que podem estar envolvidos com o início da puberdade. Dentre os sinais metabólicos, a leptina tem sido amplamente estudada e reconhecida como um fator permissivo para a maturação puberal (APTER, 2003; FAROOQI et al., 2002; GUEORGUIEV; GÓTH; KORBONITS, 2001).

Participação da Leptina na Fertilidade

A inibição da função reprodutiva em situações de balanço energético negativo foi demonstrada em roedores e primatas que, sob jejum, apresentaram diminuição da fertilidade, dos níveis de hormônios esteróides e da secreção pulsátil de LH (CAGAMPANG et al., 1990; PARFITT; CHURCH; CAMERON, 1991; WEIGLE et al., 1997). No entanto, a administração de leptina promove melhoria na fertilidade, demonstrando que este hormônio pode atenuar os efeitos do balanço energético negativo na atividade reprodutiva (GONZALEZ

et al., 1999). Uma das maiores evidências da associação da leptina com o eixo reprodutivo é constatada em camundongos com mutações no gene que codifica a leptina (*ob/ob*) ou o receptor da leptina (*db/db*), os quais são inférteis (CHEN et al., 1996; ZHANG et al., 1994). A influência da leptina no eixo reprodutivo é mediada por receptores de isoforma longa LepRb, e relaciona-se ao aumento da liberação de LH que ocorre em várias espécies e em ambos sexos em resposta a este hormônio (LEBRETHON et al., 2000; PARENT et al., 2000; WÓJCIK-GLADYSZ et al., 2009; YU et al., 1997). Sugere-se que a leptina estimule o eixo reprodutivo por aumentar a liberação de GnRH, no entanto, essa ação deve ser indireta, uma vez que a maioria dos neurônios GnRHérgicos não expressa receptores para leptina (DONATO et al., 2011a; LOUIS et al., 2011; QUENNELL et al., 2011). Como a deleção dos receptores para leptina no prosencéfalo de camundongos resulta em infertilidade, é possível que a leptina atue sobre aferências dos neurônios GnRHérgicos para regular a função reprodutiva (QUENNELL et al. 2009). A administração crônica de leptina promove elevação da secreção de LH e impede o atraso do estro em camundongos fêmeas, que ficaram 48 horas em privação alimentar (período no qual observou-se diminuição dos níveis de LH) (AHIMA et al., 1996). Ratas sob jejum não apresentaram diminuição da secreção de LH após a administração crônica de leptina, além disso, a manutenção da concentração de leptina circulante nos níveis fisiológicos normais permitiram o surgimento dos picos pré-ovulatórios de LH (NAGATANI et al., 1998; WATANOBÉ et al., 1999). A administração aguda de leptina em ratos sob privação alimentar induz rápido aumento na amplitude e na frequência de pulsos de LH (DONATO et al., 2009; GONZALEZ et al., 1999).

Camundongos *ob/ob* e *db/db* além de desenvolverem hiperfagia, obesidade e diabetes, não entram na puberdade, são inférteis e apresentam desenvolvimento incompleto dos órgãos reprodutivos (COLEMAN, 1978; TARTAGLIA et al., 1995; ZHANG et al., 1994). A administração de leptina para camundongos *ob/ob* induz o início da puberdade e a maturação dos órgãos reprodutivos, aumentando a secreção de LH e restaurando a fertilidade (BARASH et al., 1996; CHEHAB; LIM; LU, 1996; MOUNZIH; LU; CHEHAB, 1997). Em indivíduos deficientes de leptina, o tratamento com este hormônio induz um aumento nos níveis de gonadotrofinas e de esteróides sexuais, bem como, desenvolvimento das gônadas e desenvolvimento puberal (FAROOQI et al., 1999, 2002). Além disso, altos níveis circulantes de leptina em crianças obesas são correlacionados com um início precoce da puberdade (AHIMA et al., 1997; CONSIDINE et al., 1996; MAFFEI et al., 1995; YURA et al., 2000),

por outro lado, estudos também demonstraram que o excesso de leptina pode suprimir a função reprodutiva. Camundongos fêmeas transgênicos que superexpressam leptina apresentam puberdade precoce e hipogonadismo hipotalâmico em fases mais tardias da vida (YURA et al., 2000). Mulheres obesas têm baixos níveis séricos de gonadotrofinas e estrógenos e apresentam diminuição da secreção em resposta à administração crônica de GnRH exógena (SANTORO et al., 2004). A obesidade em camundongas da linhagem DBA/2J induzida por dieta hiperlipídica promove hiperleptinemia e diminuição da taxa de fecundidade, com normalização da função reprodutiva após a estimulação com GnRH exógeno (TORTORIELLO; MCMINN; CHUA, 2004). Esses autores sugeriram que a disfunção do eixo reprodutivo na obesidade seja causada pela resistência à leptina (TORTORIELLO; MCMINN; CHUA, 2004).

Diante desses estudos, atualmente, considera-se que o papel da leptina em sinalizar o estado energético do organismo, regula não só a ingestão alimentar, como também a função reprodutiva.

Participação da leptina no controle da ingestão alimentar

A descoberta da leptina em 1994 por Zhang e colaboradores possibilitou a identificação do fator periférico envolvido primariamente na homeostase energética. O núcleo arqueado do hipotálamo é o alvo da leptina melhor descrito, porém recentes pesquisas demonstram que a leptina atua em diferentes locais dentro do sistema nervoso central (SNC) para influenciar o peso corporal e o comportamento alimentar (OSWAL; YEO, 2009). A leptina consiste em um hormônio produzido e secretado principalmente pelo tecido adiposo branco, de forma que a concentração de leptina circulante é proporcional aos depósitos de tecido adiposo no organismo (CONSIDINE et al., 1996). Os níveis de leptina circulante, além de serem proporcionais às reservas de tecido adiposo branco, são também correlacionados com o estado alimentar, aumentando após uma refeição e diminuindo durante o jejum. Isso ocorre, pois a síntese e liberação de leptina pelo tecido adiposo dependem do estado alimentar (BECKER et al., 1995; HARDIE et al., 1996; TRAYHURN; BING, 2006). Assim, baixos níveis de leptina podem sinalizar que há um balanço energético negativo, promovendo respostas contra-regulatórias para preservar e acumular energia, aumentando o apetite e

diminuindo a termogênese, por exemplo (AHIMA, 2006). Além disso, nessas condições há ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, inibição do eixo tireoidiano e da função reprodutiva (AHIMA, 2006).

A leptina é codificada pelo gene *Lep/LEP* (previamente chamado de gene *ob*, de obeso) e circula no plasma livremente ou ligada a transportadores (TARTAGLIA et al., 1995). Receptores de leptina estão presentes em vários tecidos, mas estão expressos em maior nível em neurônios da região mediobasal do hipotálamo, incluindo o núcleo arqueado (ARC), núcleo dorsomedial hipotalâmico (DMH) e núcleo ventromedial hipotalâmico (VMH) (BALTHASAR et al., 2005; BASKIN et al., 1999; ELMQUIST et al., 1998; STERNSON; SHEPHERD; FRIEDMAN, 2005). Entre os outros alvos hipotalâmicos está o núcleo paraventricular (TUNG et al., 2008). No núcleo arqueado, o receptores de leptina localizam-se em neurônios que coexpressam proopiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) e em neurônios que coexpressam neuropeptídeo Y e proteína relacionada à proteína Agouti (AgRP) (HOHMANN et al., 2000; VAN DE WALL et al., 2008), os quais se relacionam com a função da leptina no controle da ingestão alimentar. No ARC a leptina estimula a expressão e secreção de peptídeos anorexígenos derivados da pró-opiomelanocortina, ao passo que, bloqueia a síntese e secreção do peptídeo orexígeno relacionado à agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY) em neurônios específicos do ARC que expressam esses peptídeos (BATES; MYERS, 2003). Dessa forma, a leptina aumenta a expressão de fatores anorexígenos e diminui os orexígenos, resultando em menor ingestão alimentar, aumento do gasto energético e diminuição do peso corporal (COWLEY et al., 2001; ELIAS et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2000).

A função da leptina no controle da homeostase energética não ocorre somente no núcleo arqueado, mas também em outras regiões encefálicas. No tronco encefálico, a leptina atua no núcleo do trato solitário, onde há integração de uma variedade de sinais referentes à alimentação pelas aferências vagais e hormônios gastrointestinais (COLL et al., 2008). Adicionalmente, a leptina atua no hipotálamo lateral regulando mecanismos de recompensa associados com a alimentação. Também, a leptina influencia o sistema dopaminérgico mesolímbico, inibindo a busca de recompensa por meio da ingestão alimentar (FULTON; WOODSIDE; SHIZGAL, 2000; FULTON et al., 2004; YAMANAKA et al., 2003). A leptina também tem um papel importante em modificar as conexões sinápticas entre os neurônios. Estudo de Pinto et al, (2004), demonstrou que a leptina induz mudanças nas aferências

sinápticas excitatórias e inibitórias de neurônios que expressam pró-opiomelanocortinas e aqueles que expressam neuropeptídeo Y, o que poderia contribuir para diminuir o limiar de resposta desses neurônios à outros estímulos, contribuindo para seus efeitos a longo prazo na regulação do peso corporal. Sua influência em conexões sinápticas também foi demonstrada por trabalhos que apontam um importante papel da leptina na potenciação sináptica a longo prazo, que relaciona-se com mecanismos de aprendizagem e memória dentro do hipocampo (HARVEY; SOLOVYOVA; IRVING, 2006; MOULT; MILOJKOVIC; HARVEY, 2009). Ressalta-se também, que o pico de secreção deste hormônio no período pós natal (dos 8 aos 12 dias em camundongos) (AHIMA; PRABAKARAN; FLIER, 1998) está envolvido no desenvolvimento peri- e neonatal de circuitos neurais específicos no hipotálamo envolvidos com a homeostase energética, como o desenvolvimento de projeções do núcleo arqueado para o núcleo paraventricular (BOURET, 2013; OSWAL; YEO, 2009). Além disso, a leptina tem ação neurogênica no desenvolvimento de circuitos neuronais no hipocampo e córtex (O'MALLEY et al., 2007; UDAGAWA et al., 2006).

Resistência à Leptina

Atualmente, estima-se que um bilhão de adultos esteja com sobrepeso e cerca de 475 milhões sejam obesos (IASO; 2012). A obesidade caracteriza-se por um estado de aumento excessivo do tecido adiposo associado ao aumento do ganho de peso corporal, e se constitui um importante fator de risco para carga global de doenças, tornando-se assim um problema de saúde pública (SPIEGELMAN et al., 2001; WHO, 2003).

O desenvolvimento da obesidade é influenciado pela interação de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e psicossociais, que atuam alterando o balanço entre a ingestão e gasto de energia (SPIEGELMAN et al., 2001). No contexto dos estudos sobre a patogênese da obesidade, verifica-se a evolução da resistência à leptina em humanos e roedores obesos, de tal forma que, embora obesos apresentem altos níveis de leptina circulante, os efeitos deste hormônio na redução do apetite, aumento do gasto energético e diminuição do ganho de peso corporal são atenuados (ENRIORI et al., 2007a). Este estado pode ser decorrente de uma falha da leptina circulante em atingir seus alvos no sistema nervoso central por um defeito no seu transporte (BANKS, 2003); ou de defeitos na cascata de sinalização intracelular desencadeada pela ligação da leptina em seu receptor de membrana (LepR) (MÜNZBERG; MYERS, 2005).

A leptina acessa o cérebro por mecanismos que incluem um transporte específico pela barreira hematoencefálica, difusão pelos órgãos circunventriculares (como na eminência mediana), e acesso direto do sangue para neurônios neuroendócrinos. O transporte da leptina através da barreira hematoencefálica envolve um sistema saturável (BANKS, 2004), de forma que, em roedores que receberam uma dieta obesogênica, há diminuição da atividade deste sistema (LEVIN; DUNN-MEYNELL; BANKS, 2004). No entanto, como o núcleo arqueado encontra-se próximo de uma região não protegida pela barreira hematoencefálica, a eminência mediana, a resistência à leptina, característica dessa região, deve envolver outros mecanismos (KRISCH; LEONHARDT, 1978; PERUZZO et al., 2000).

Os receptores para leptina (LepR) são do tipo transmembrana, pertencentes à classe I de receptores de citocinas (FRÜHBECK, 2006) e apresentam seis isoformas expressas em uma variedade de órgãos e tipos celulares, como nas ilhotas pancreáticas, tecido adiposo, ósseo, muscular e hepático (MORRIS; RUI, 2009). De acordo com os domínios intracelulares, esses receptores são classificados como curtos ou longos. A isoforma longa do receptor de leptina parece ser o receptor que medeia as ações fisiológicas mais relevantes da leptina (BJØRBAEK et al., 1997; FEI et al., 1997; LEE et al., 1996a). O LepR não contém atividade enzimática intrínseca, mas associa-se à enzima tirosina quinase da família JAK quinase (JAK2) (IHLE; KERR, 1995; TANIGUCHI, 1995). Uma vez que a leptina liga-se a este receptor ocorrem alterações conformacionais em sua estrutura que permitem a transfosforilação e ativação da JAK quinase associada, que então fosforila resíduos específicos de tirosina do complexo LepR /JAK2, promovendo o recrutamento de proteínas sinalizadoras (BANKS et al., 2000; COUTURIER; JOCKERS, 2003; DEVOS et al., 1997; TARTAGLIA, 1997; WHITE et al., 1997). A fosforilação dos resíduos de tirosina na posição 985 (Tyr985) em LepR recruta a tirosina fosfatase 2 (SHP-2), a qual é mediadora de uma via de ativação ERK (BJORBAK et al., 2000). A fosforilação de Tyr 1077 promove a ativação da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição, STAT 5, que também atua na regulação gênica estimulada pela leptina (BANKS et al., 2000). A fosforilação do resíduo de tirosina na posição 1138 (Tyr1138) resulta no recrutamento do fator de transcrição STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição) ao complexo LepR/JAK2, resultando em fosforilação e subsequente translocação nuclear de STAT3 para regular a transcrição gênica (WHITE et al, 1997; BANKS et al., 2000). Entre os genes regulados por STAT3 está o gene para SOCS3, supressor inibitório de sinalização de citocinas 3 (BANKS et al., 2000;

BJØRBAEK et al., 1998). A proteína SOCS3 está envolvida em um mecanismo de retroalimentação negativa da sinalização da leptina, pois liga-se à JAK2 e à Tyr 985 do LepR e mediando a inibição da via de STAT3 (BJORBAK et al., 2000; SASAKI et al., 1999, 2000).

Sugere-se que a via inibitória de SOCS3 seja um mecanismo envolvido na resistência à leptina, na obesidade (BJØRBAEK; KAHN, 2004). Estudos demonstram que capacidade da leptina em desencadear a sinalização celular em núcleos hipotalâmicos é diminuída na indução da obesidade pela dieta (EL-HASCHIMI et al., 2000; MÜNZBERG; FLIER; BJØRBÆK, 2004; VAN HEEK et al., 1997). A inibição da sinalização celular pelo LepR foi demonstrada, e *in vivo*, pela ação das proteínas SOCS3 (supressor de sinalização de citocina 3) e PTP1B (fosfatase de tirosina proteica) (BJORBAK et al., 2000; CHENG et al., 2002; MORI et al., 2004).

A PTP1B está envolvida com a contraregulação da sinalização da insulina, modulando a sensibilidade a este hormônio e o metabolismo energético (ELCHEBLY et al., 1999). Além disso, alguns estudos mostram que a PTP1B pode participar no desenvolvimento da resistência à leptina (CHENG et al., 2002; KASZUBSKA et al., 2002; ZABOLOTNY et al., 2002). Kaszubska et al., (2002) demonstrou em cultura de células que a PTP1B influencia a via de sinalização da leptina pois desfosforila a JAK2 e assim diminui a sinalização via LepRb. A deleção da PTP1B em camundongos, em todo organismo ou somente em neurônios, resulta em um fenótipo magro, aumento da sensibilidade à leptina, e resistência à indução da obesidade pela dieta (BENCE et al., 2006; ZABOLOTNY et al., 2002). No entanto, como somente os níveis de SOCS 3 e não os de PTP1B são aumentados em modelos de obesidade induzida pela dieta (BJØRBAEK et al., 1998), a ação da SOCS 3 pode explicar a diminuição da efetividade da leptina nessa condição (MÜNZBERG; MYERS, 2005).

A ativação de STAT3 pela sinalização da leptina tem papel importante na homeostase energética (MORRIS; RUI, 2009). Defeitos na sinalização mediada pela via da STAT3 resultam em severa hiperfagia e obesidade (BATES; MYERS, 2003; CUI et al., 2004; GAO et al., 2004; JIANG et al., 2008) além de diminuir a expressão da proteína pró-opiomelanocortina em camundongos (MÜNZBERG et al., 2003; XU et al., 2007), indicando que a ativação da via LEPRb/JAK2/STAT3 tem importante papel nos efeitos anorexígenos da leptina. O sinal da ativação de LepR pela leptina estimulando a fosforilação de STAT3 é necessária para o controle da alimentação e do gasto energético, no entanto, outras vias de

sinalização ativadas pela leptina, independentes de STAT3, parecem estar envolvidas na regulação deste hormônio sobre o crescimento, a reprodução, função imunológica e controle glicêmico (BATES; MYERS, 2003; BATES et al., 2005). Estudos utilizando células em cultura sugerem que altos níveis de ativação do receptor LepR estimula uma diminuição da intensidade de seu sinal por um processo de retroalimentação negativa, o que limita a eficácia de altas concentrações de leptina em uma exposição crônica (BJORBAEK et al., 1998; 2000). A retroalimentação negativa da sinalização de LepR depende da via STAT3, que estimula a expressão de SOCS3, e também, pela expressão de SOCS3 independente da via STAT3 (DUNN et al., 2005). A expressão aumentada da molécula SOCS3, decorrente da maior sinalização desencadeada pelos altos níveis de leptina, resultam em aumento da ação de SOCS3 em se ligar-se à JAK2 e à Tyr 985 do LepR, causando inibição da via de sinalização LepR/JAK2/ STAT3 (BJORBAEK et al., 2000; SASAKI et al., 1999, 2000).

A resistência central à leptina, induzida pela administração da dieta hiperlipídica, pode acontecer especificamente em determinadas regiões do sistema nervoso central, como por exemplo, o núcleo arqueado e a área tegmental ventral (MÜNZBERG; FLIER; BJØRBÆK, 2004; MATHENY et al., 2011). O núcleo arqueado é a região mais sensível à resistência à leptina induzida pela dieta, demonstrado pela redução significativa da expressão de STAT3 após a administração de leptina em camundongos que receberam dieta obesogênica (ENRIORI et al., 2007a; MÜNZBERG; FLIER; BJØRBÆK, 2004). No estudo de Enriori et al.(2007), a obesidade induzida pela dieta em camundongos da linhagem C57BL/6J aumentou a adiposidade e os níveis de leptina circulantes, no entanto, a hiperleptinemia falhou em impedir a progressão da obesidade. Além disso, verificou-se insensibilidade, central e periférica, uma vez que os animais não apresentam nem diminuição de peso nem diminuição da ingestão alimentar após injeção de leptina (ENRIORI et al., 2007a). O desenvolvimento de obesidade e de resistência à leptina em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta hiperlipídica pode ser dividida em três estágios, no estágio inicial, há ganho de peso mas manutenção da resposta ao efeitos anorexígenos da leptina; no estágio intermediário, desenvolve-se resistência periférica à leptina; e no último estágio desenvolve-se também a resistência central à leptina (EL-HASCHIMI et al., 2000).

Leptina e Kisspeptinas

Estudos sugerem que a influência da leptina no eixo reprodutivo possa ser mediada pela expressão das kisspeptinas (CASTELLANO et al., 2005; LUQUE; KINEMAN; TENA-SEMPERE, 2007; SMITH et al., 2006; WAHAB et al., 2011). Condições que afetam os níveis circulantes de leptina no organismo exercem efeitos na expressão de Kiss 1 do hipotálamo. Condições em que há diminuição dos níveis de leptina ou ausência total deste hormônio, como no balanço energético negativo ou em camundongos *ob/ob*, conduzem à uma diminuição na expressão de RNAm de Kiss1 no hipotálamo (CASTELLANO et al., 2005; LUQUE; KINEMAN; TENA-SEMPERE, 2007; SMITH et al., 2006; WAHAB et al., 2011) enquanto que a administração exógena de leptina aumenta a expressão de RNAm para Kiss1 (LUQUE; KINEMAN; TENA-SEMPERE, 2007; SMITH et al., 2006). No entanto, ainda não se investigou se a recuperação da expressão de Kiss1 pela administração exógena de leptina nesses modelos ocorre por uma sinalização direta ou indireta da leptina sobre neurônios Kiss1.

Kisspeptinas são produtos do gene *Kiss 1* (LEE et al., 1996b) e exercem um papel essencial na regulação neuroendócrina da reprodução (SMITH; CLARKE, 2007). Estudos indicam a presença de receptor para kisspeptina em neurônios GnRHérgicos (CLARKSON; HERBISON, 2006; IRWIG et al., 2004; MESSENGER et al., 2005) e em outras áreas do hipotálamo (BRAILOIU et al., 2005; LEE et al., 1999; MUIR et al., 2001; WAHAB et al., 2011), o que sugere que a kisspeptina afeta esses neurônios direta e indiretamente (PATTERSON et al., 2006; PIELECKA-FORTUNA; CHU; MOENTER, 2008). A expressão do gene *Kiss1* no sistema nervoso central ocorre em altos níveis nos núcleos hipotalâmicos do arqueado, no periventricular ântero-ventral (AVPV), e periventricular anterior (PeN), e em baixos níveis no núcleo medial da amígdala e no núcleo pré-óptico anterodorsal, bem como no neocórtex (CRAVO et al., 2011; GOTTSCH et al., 2004). A expressão hipotalâmica do gene *Kiss-1* está sob o controle de esteroides sexuais, visto que apresentam receptores para estrógenos tipo α (ER α) e para andrógenos; assim neurônios Kiss-1 podem se constituir mediadores dos efeitos dos esteroides sexuais na retroalimentação positiva e negativa da secreção de GnRH e gonadotrofinas (SMITH et al., 2005b, 2005a). Mutações nos receptores de kisspeptina (GPR54), estão associadas com um fenótipo de hipogonadismo hipogonadotrófico em humanos e camundongos (DE ROUX et al., 2003; SEMINARA et al.,

2003). Além disso, a administração de kisspeptina intracerebroventricular estimula a liberação de GnRH em roedores, ovelhas e primatas (GOTTSCHE et al., 2004; IRWIG et al., 2004; MESSENGER et al., 2005; NAVARRO et al., 2005; SHAHAB et al., 2005). Smith *et al.* (2006) sugeriram que a leptina atua diretamente em neurônios Kiss1 do ARC regulando a expressão de RNAm para Kiss1 em camundongos adultos e, dessa forma, os neurônios Kiss1 representariam mediadores entre fatores metabólicos e o eixo reprodutivo, regulando a reprodução em função do estado energético do organismo. No entanto, estudos sobre a ação da leptina em neurônios Kiss1 do arqueado são controversos, Smith *et al.* (2006) verificaram que há colocalização de receptores para leptina em 40% dos neurônios Kiss1 do arqueado. Em cobaias 80% dos neurônios Kiss1 expressam receptores para leptina (QIU et al., 2011a). Por outro lado, True *et al.* (2011) verificaram ausência de colocalização de receptores para leptina em neurônios Kiss1, em ratas. Em camundongas expressando proteína fluorescente verde (GFP), sob o controle transcricional da enzima CRE, em neurônios Kiss1, a colocalização foi menor que 10%, e em camundongas ovariectomizadas foi de 15% (CRAVO et al., 2011, 2013; LOUIS et al., 2011). Elias e Purohit (2013) discutem que as diferenças entre os estudos de colocalização entre receptores de leptina e neurônios Kiss1 podem estar relacionadas com uma resposta diferenciada dos neurônios Kiss1 à leptina entre gêneros ou com as diferentes técnicas empregadas em cada estudo.

Donato *et al.*, (2011b) utilizando camundongos com deleção seletiva de receptores para leptina em neurônios Kiss1 verificaram que tanto machos como fêmeas não tinham a maturação sexual ou a reprodução afetadas, demonstrando assim, que a sinalização direta da leptina sobre os neurônios Kiss1 pode não ser essencial para a função reprodutiva normal. Além disso, esses autores demonstraram também, que o papel da leptina em induzir o início da puberdade pode ser mediado por neurônios do núcleo pré-mamilar ventral (PMV), não envolvendo a sinalização da leptina em neurônios Kiss-1. Outro estudo recente indica que os neurônios kisspeptidérgicos não são alvos diretos da leptina no período pré-puberdade em camundongos (CRAVO et al., 2013), de forma que o papel permissivo da leptina no início da puberdade pode estar relacionado com a estimulação dos neurônios kisspeptidérgicos, por uma via indireta. Cravo *et al.* (2013) sugerem que a ação da leptina sobre neurônios kisspeptidérgicos torna-se relevante, somente após a maturação sexual.

A demonstração de que a ação da leptina sobre os neurônios Kiss1 não seja essencial para a maturação sexual, sugere não só que a leptina possa influenciar a atividade de neurônios Kiss1 por interneurônios, como também, a presença de mecanismos redundantes que manteriam a função reprodutiva mesmo na ausência da sinalização da leptina nos neurônios Kiss1.

Leptina e CART

O transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) foi inicialmente descrito por ter sua produção aumentada pelo estímulo cerebral com cocaína e anfetamina, em roedores (DOUGLASS; MCKINZIE; COUCEYRO, 1995). O gene do CART codifica peptídeos de 129 ou 116 aminoácidos que resulta em peptídeos de CART longos ou curtos, com 102 ou 89 resíduos, respectivamente (DOUGLASS; MCKINZIE; COUCEYRO, 1995). Posteriormente, demonstrou-se que o CART era expresso tanto em tecidos periféricos como em regiões cerebrais, em especial no hipotálamo (COUCEYRO; KOYLU; KUHAR, 1997; KOYLU et al., 1997). No cérebro, o RNAm de CART e o CART são encontrados no núcleo paraventricular, no núcleo supra-óptico, na área hipotalâmica lateral, no núcleo dosomedial do hipotálamo (DMH), no núcleo arqueado (ARC), no núcleo periventricular (Pe) e no núcleo pré-mamilar ventral (PMV) (ELIAS et al., 2001). No núcleo arqueado, esses neurônios coexpressam RNAm para pró-ópiomelanocortina (POMC) (ELIAS et al., 1998).

Tendo em vista a ampla distribuição de grupos neuronais que expressam CART e a complexa circuitaria em que estes estão envolvidos, o CART tem sido apontado como um regulador de diversos processos fisiológicos, como a ingestão de alimentos, a reprodução, dor, recompensa, estresse, regulação dos eixos hipotálamo-hipófise e tireóide/gônada (ELIAS et al., 2001; KRISTENSEN et al., 1998; VRANG, 2006).

A expressão de CART no hipotálamo é influenciada pelo status energético do organismo e depende dos níveis de leptina circulante. Evidências de que o CART seja um importante inibidor do apetite originam-se de estudos que mostram que a injeção i.c.v. de CART inibe a alimentação e a administração i.c.v de anti-soro para CART tem efeito oposto (LAMBERT et al., 1998). Há redução da expressão de RNAm de CART no núcleo arqueado de camundongos deficientes de leptina (*ob/ob*) sendo normalizada pela reposição com este hormônio (KRISTENSEN et al., 1998). Além disso, neurônios CART hipotalâmicos do

ARC, DMH e PMV são sensíveis à leptina circulante, uma vez que expressam RNAm de LepR e SOCS-3 em resposta à administração diária de leptina, por 5 dias (ELIAS et al., 2001). Ademais, o RNAm de CART é coexpresso em neurônios hipotalâmicos que contém neuropeptídeos envolvidos no controle da ingestão alimentar e peso corporal, como o hormônio liberador de tireotrofina, o hormônio concentrador de melanina, dinorfina e neurotensina (ELIAS et al., 2001).

A dieta hiperlipídica induz aumento dos níveis plasmáticos de leptina e resulta no aumento da expressão hipotalâmica de CART em roedores (ROHNER-JEANRENAUD et al., 2002; WANG et al., 1999), assim a expressão de RNAm de CART estimulada pela HFD pode refletir um aumento na liberação de leptina (WANG et al., 1999).

Considerando que a leptina estimula a expressão de CART no hipotálamo, há estudos que apontam este peptídeo como um possível mediador de suas ações no eixo reprodutivo (LEBRETHON et al., 2000b, 2000a, 2007; LESLIE et al., 2001; PARENT et al., 2000; RONDINI et al., 2004; TRUE et al., 2013). Em ratos, neurônios CART do ARC e PMV projetam-se para áreas que contém neurônios GnRHérgicos (núcleo pré-óptico mediano, núcleo pré-óptico medial, e nos arredores do órgão vasculoso da lâmina terminal) e para o AVPV, também envolvido com a reprodução (RONDINI et al., 2004). Em hamsters, fibras CART são encontradas nas proximidades dos corpos celulares de neurônios GnRH na área pré-óptica (LESLIE et al., 2001). Em explantes hipotalâmicos, autores têm demonstrado que CART e leptina podem reduzir o intervalo de pulsos de GnRH em ratos pré-puberes e pode aumentar a amplitude de pulsos de GnRH em ratas fêmeas ciclando normalmente, eventos que são abolidos quando há administração de antissoro anti-CART (LEBRETHON et al., 2000b, 2000a; PARENT et al., 2000). Além disso, o CART aumenta a frequência de pulsos de GnRH em explantes hipotalâmicos de ratos deficientes do receptor de leptina (*fa/fa*) (LEBRETHON et al., 2000a) e registros eletrofisiológicos demonstram que o CART despolariza neurônios GnRHérgicos (TRUE et al., 2013).

O CART também pode mediar as ações da leptina sobre os neurônios kisspeptidérgicos e desta forma, sobre o eixo reprodutivo, uma vez que recentemente, True et al. (2013) demonstraram que, em ratos, 40% dos neurônios kisspeptidérgicos do AVPV e 65% do ARC possuem inervações de fibras CART, sendo que grande parte dessas fibras são

oriundas do núcleo arqueado. Além disso, o CART estimula a despolarização pós-sináptica de neurônios kisspeptidérgicos do núcleo arqueado, demonstrando que estes neurônios são mais sensíveis ao CART do que neurônios GnRHérgicos (TRUE et al., 2013).

Leptina, Kisspeptina, Dinorfina e Neurokinina B na Função Metabólica e Reprodutiva

A neurokinina B (NKB) e seu receptor (NK3R), são codificados respectivamente pelos genes *TAC3* e *TACR3*, genes humanos ortólogos dos genes *Tac2* e *Tacr3* em roedores (NAVARRO et al., 2012); mutações nesses genes são relacionadas com comprometimento da liberação de GnRH e consequente fenótipo de hipogonadismo hipogonatrófico em humanos, o que sugere a participação da NKB na regulação da maturação sexual e fertilidade (TOPALOGLU et al., 2009). O papel da sinalização da neurokinina B na função reprodutiva parece ser mediado pelo seu papel na regulação dos neurônios Kiss1 do núcleo arqueado (LEHMAN; COOLEN; GOODMAN, 2010; NAVARRO et al., 2011a; WAKABAYASHI et al., 2010) e é dependente da preservação do sistema de sinalização kisspeptidérgica (GARCÍA-GALIANO et al., 2012). Navarro et al. (2012) verificaram que ratas pré-púberes respondem com elevação dos níveis de LH após administração de um agonista de NKB. A expressão hipotalâmica dos genes *Tac2* e *Tacr3* aumentam durante o início da puberdade, ao passo que o bloqueio da sinalização pela NKB induz um pequeno atraso no início da puberdade (NAVARRO et al., 2012). Adicionalmente, estudo de Gill et al. (2012) demonstra que ao longo do desenvolvimento pós-natal de camundongos há um aumento da expressão de NKB que antecede a puberdade, sugerindo que a NKB possa ser um marcador da ativação puberal. A interação da neurokinina B com o estado metabólico, foi investigada por Li et al. (2012). Estes autores relacionaram a antecipação da puberdade observada em animais que recebem dieta hiperlipídica, com o aumento precoce dos níveis, não só da kisspeptina, como também da neurokinina B no núcleo arqueado. Por outro lado, a expressão dos genes *Tac2* e *Tacr3* no arqueado, diminuem em fêmeas púberes submetidas ao jejum de 48 h, e a administração de um agonista da neurokinina B recupera parcialmente indicadores da progressão puberal, como a abertura vaginal e a secreção de LH, que são comprometidas em condições de subnutrição crônica (NAVARRO et al., 2012). Assim, é possível que a

sinalização mediada pela NKB ao longo da progressão da puberdade seja influenciada por fatores metabólicos, e a regulação que exerce sobre a expressão de kisspeptina no núcleo arqueado podem estar relacionadas com o início da puberdade. Porém, há maior ênfase da influência de sinais metabólicos sobre a expressão da kisspeptina do que para neurokinina B, sendo amplamente investigado o papel da leptina sobre a atividade dos neurônios Kiss1 (CASTELLANO et al., 2006; LUQUE; KINEMAN; TENA-SEMPERE, 2007; QUENNELL et al., 2011; SMITH et al., 2006).

A dinorfina é um peptídeo opióide endógeno, seu papel na reprodução foi demonstrado em camundongos, com deleção do gene para dinorfina ou de seu receptor, que apresentaram redução da secreção de LH (GOODMAN et al., 2004; NAVARRO et al., 2009). A dinorfina, além de ter sua expressão diminuída pela ação do estradiol, também parece mediar a retroalimentação negativa da progesterona sobre a secreção de GnRH (GOODMAN et al., 2004). A dinorfina é um potente inibidor da secreção de GnRH e portanto, pode ter um papel em impedir o início da puberdade (NAVARRO et al., 2009; SCHULZ et al., 1981). Tendo em vista que a dinorfina também está envolvida na regulação da atividade dos neurônios kisspeptidérgicos (NAVARRO et al., 2009), torna-se importante investigar componentes que regulam a expressão da dinorfina e seu papel na regulação da puberdade (OJEDA et al., 2010).

Uma subpopulação de neurônios kisspeptidérgicos do núcleo arqueado coexpressa a dinorfina e neurokinina B (NKB) (GOODMAN et al., 2007; NAVARRO et al., 2009). Essa subpopulação, também denominada de “neurônios KND”, foi observada no núcleo arqueado de diferentes espécies de mamíferos, como em roedores (BURKE et al., 2006; NAVARRO et al., 2009), ovinos (GOODMAN et al., 2007) e caprinos (WAKABAYASHI et al., 2010). A coexpressão da dinorfina e neuroquinina B em neurônios kisspeptidérgicos também ocorre no AVPV de camundongos, demonstrada por hibridização *in situ*, porém, em menor grau do que ocorre no núcleo arqueado (NAVARRO et al., 2009).

Um modelo proposto por Navarro et al. (2009) sugere que os neurônios KND do núcleo arqueado apresentam uma atividade oscilatória rítmica, responsável pela liberação pulsátil de GnRH. Neurônios KND do núcleo arqueado enviam projeções axonais para a eminência mediana, além de apresentarem projeções colaterais e dendritos que permitem interconexões

entre esses neurônios (NAVARRO et al., 2009; WAKABAYASHI et al., 2010). Eles influenciam a atividade de neurônios GnRHérgicos por uma ação direta no pericário desses neurônios ou sobre seus terminais neurosecretórios na eminência mediana (LEHMAN et al., 2010). A ativação dos neurônios KND seria proporcionada por aumento dos estímulos de NKB, ao passo que, a dinorfina teria um efeito inibitório sobre esses neurônios (NAVARRO et al., 2009). Essa atuação da NKB e Dyn seria um mecanismo de autorregulação sobre a liberação pulsátil de kisspeptina, que então, modularia a secreção de GnRH (NAVARRO et al., 2009). Estudos morfológicos mostram que a maioria dos neurônios kisspeptidérgicos do núcleo arqueado expressa receptores para neurokinina B (NK3R) e em menor número, receptores para dinorfina (BURKE et al., 2006), corroborando o mecanismo de autorregulação exercido pela NKB e Dyn. Navarro et al. (2009) propuseram que os neurônios KND regulam a secreção basal de GnRH e LH pois medeiam a retroalimentação negativa exercida por esteroides sexuais sobre a secreção desses hormônios. Neurônios KND respondem ao aumento dos níveis de estradiol ou andrógenos diminuindo a expressão de neurokinina B (DELLOVADE; MERCHENTHALER, 2004; KAUFFMAN et al., 2009; NAVARRO et al., 2011a; RANCE; BRUCE, 1994) e de kisspeptina no ARC (SMITH; CLIFTON; STEINER, 2006), diminuindo assim, a secreção de kisspeptina direta e indiretamente.

Assim, diante do que foi exposto pela revisão da literatura, experimentalmente verifica-se que a administração da dieta hiperlipídica além de promover antecipação da puberdade em modelos animais, a longo prazo também promove resistência à leptina no sistema nervoso central e em tecidos periféricos. Considerando a participação da leptina, kisspeptina, neurokinina B, dinorfina e do CART sobre a função reprodutiva, este trabalho investigou a influência da dieta obesogênica sobre esses moduladores durante o início da puberdade e após a maturação sexual.

2. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a responsividade de neurônios kisspeptidérgicos à leptina em camundongos fêmeas Kiss1-hrGFP.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ingestão alimentar, peso corporal, índices da maturação puberal e sobre a concentração plasmática de leptina, estradiol e LH em camundongos-fêmeas Kiss1-hrGFP.
- 2) Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ativação de STAT3 em neurônios kisspeptidérgicos e neurônios CART de camundongos-fêmeas Kiss1-hrGFP em resposta ao estímulo com leptina, no início da puberdade.
- 3.) Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a coexpressão de neurokinina B e dinorfina em neurônios kisspeptidérgicos de camundongos-fêmeas Kiss1-hrGFP, no início da puberdade.
- 4.) Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ativação de STAT3 em neurônios kisspeptidérgicos de camundongos-fêmeas Kiss1-hrGFP em resposta ao estímulo com leptina, após a maturação sexual.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas Kiss1-hrGFP (21 dias), oriundos de ninhadas com 6 a 7 filhotes, mantidos em estantes ventiladas no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e aclimatados à temperatura ambiental controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h (luz 7:00-19:00h). Os animais foram mantidos em duplas em cada caixa e tratados com ração específica do grupo experimental e água *ad libitum*, exceto nos protocolos especificados abaixo. Os procedimentos experimentais, aos quais os animais foram submetidos, foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (nº107/2013).

Geração de camundongos Kiss1-hrGFP

Foram utilizados camundongos-fêmeas Kiss1-hrGFP (21 dias), cedidos gentilmente pela Profa. Dra. Carol Elias, Ph.D., (Associate Professor of Molecular & Integrative Physiology), University of Michigan, Ann Harbor, MI, USA. O modelo de camundongo transgênico utilizado nesse estudo foi gerado conforme descrito por Cravo et al.,(2013), este modelo de camundongo contém a região codificante do gene *Kiss1* ligada à sequência sinal da *human renilla green fluorescent protein* (hrGFP). A expressão da proteína hrGFP observada na região AVPV, núcleo periventricular anterior (Pe) e no núcleo arqueado (Arc) reflete a habilidade da sequência regulatória do promotor do gene *Kiss1* em promover a sua transcrição. Assim, a expressão de kisspeptina pode ser detectada sem a necessidade de realização da técnica de imunistoquímica. Cravo et al., (2013) realizaram a validação de camundongos Kiss1-hrGFP demonstrando que há co-localização do RNAm de *Kiss1* (hibridização *in situ*) em neurônios imunorreativos a hrGFP no ARC e AVPV/PeN em camundongos fêmeas ovariectomizadas e fêmeas ovariectomizadas com reposição de estrógeno. Além disso, de modo coerente com as mudanças na expressão do gene *Kiss1*, observaram que a reposição de estrógeno resultou na diminuição da expressão de neurônios imunorreativos a hrGFP no ARC e aumento no AVPV/PeN (CRAVO et al., 2013).

3.2 Dieta

Os animais, após o desmame, receberam dieta controle (RD) (Research Diets Inc.- 3,85 kcal/gm sendo 10% lipídeos, 20% de proteína e 70% de carboidrato) ou dieta hiperlipídica (HFD) (Research Diets Inc. (D12492) – 5,24 kcal/g sendo 60% de lipídeos, 20% de proteína e 20% de carboidrato) durante todo o período experimental, após o desmame.

3.3 Procedimentos cirúrgicos

Perfusão cerebral

Em animais anestesiados com ketamina (45mg/Kg de peso corporal)/xilazina (5 mg/kg de peso corporal) foi realizada a perfusão cerebral por meio da infusão, via aorta torácica, de 20ml de solução salina isotônica estéril (NaCl 0,15M)/ heparina (diluição 1:80) seguida pela infusão de 40ml de paraformaldeído (PF) à 4%. O tecido foi pós-fixado em paraformaldeído 4% por 1h e, após este período, foi estocado em uma solução de sacarose 30% à 4°C por quatro dias, e posteriormente realizamos cortes histológicos de 30 µm em criostato, coletando 3 séries de cortes por animal. Os cortes foram armazenados em solução anti-freezing à 4°C até a realização dos procedimentos imunoistoquímicos.

Coleta de sangue

O sangue do tronco foi coletado por decapitação, em tubos contendo heparina, sob gelo. O plasma foi obtido após centrifugação por 30 minutos 3.000 rotações/min, à 4°C e posteriormente estocado à -20°C, até o momento das dosagens.

3.4 Genotipagem de camundongos Kiss1-hrGFP

Após o desmame da ninhada, cada filhote recebeu uma marca na orelha (utilizando um furador) e um número. Em seguida foi retirado um fragmento (5mm) da cauda de cada camundongo e este foi mantido em eppendorf numerado estéril.

Extração do DNA da cauda dos camundongos: Utilizando o Kit REDE-extract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma Aldrich Biotechnology), em cada eppendorf contendo o fragmento da cauda foi adicionado 100 µl da solução de extração e 12,5 µl da solução de preparação do

tecido. Os eppendorfs foram colocados em banho-maria a 94°C por 12 min. Em seguida, foram centrifugados a 4°C, 10.000 rpm, 2min. Ao final, foi adicionado 50 µl da solução de neutralização e os tubos foram agitados por 5 seg.

Reação de PCR: a reação de PCR foi realizada pela adição de 5 µl do Mix REDE-extract –N-Amp PCR, 2,5 µl de água estéril e 0,5 µl dos primers:

M358:5'-GCTCTGGTGAAGTACGAACTCTGA-3' (hrGFP promoter)

M243:5'-AGGTGCGGTTGCCGTACTGGA-3' (hrGFP)

M176:5'-GGTCAGCCTAATTAGCTCTGTCAT-3'(wild type control)

M117:5'-GATCTCCAGCTCCTCCTCTGTCT-3' (wild type control)

Em cada tudo de reação foram adicionados 2 ul do DNA em um volume final de 10 µl e a reação de PCR foi programada conforme descrito abaixo:

1 Ciclo – 94°C X 4 min

35 ciclos- 94°C X 30 seg

62°C X 30 seg

72°C X 45 seg

1 Ciclo - 72°C X 7 min

1 Ciclo - 4°C X infinito

O tamanho das bandas esperadas para identificar animais Wild Type é de 619 pares de bases e animais Kiss1-hrGFP é 321 pares de bases.

3.5 Imunoistoquímica

Secções coronais de 30 µm desde a área pré-optica medial até o final do arqueado do encéfalo das fêmeas Kiss1-hrGFP perfundidas foram obtidas em criostato (Modelo Leica CM1850), segundo as coordenadas do atlas de Paxinos e Franklin (2004): -0,74mm até -2,8 mm, em relação ao bregma e mantidos a -20°C em solução anti-freezing até o dia da realização da técnica de imunofluorescência/imunoistoquímica.

Citoarquitetura dos núcleos quantificados

As fotomicrografias cerebrais ilustrativas do núcleo arqueado (Arc) e núcleo anteroventral periventricular (AVPV) foram identificadas e delimitadas de acordo com o atlas de Paxinos e Franklin (2004). As duplas marcações p-STAT3-Kiss1 e pSTAT3-CART foram contadas nos níveis rostral e caudal do Arc, correspondendo a uma distância a partir da bregma de -1,82 mm e -2,30/-2,54 mm, respectivamente. As duplas marcações Kiss1-Dyn e Kiss1-NKB foram quantificadas no nível rostral do Arc correspondendo a uma distância a partir da bregma de -1,82/-2,06 mm. A quantificação dos neurônios Kiss1-hrGFP do AVPV foi realizada em uma área correspondendo a uma distância a partir da bregma de 0,26 mm.

Expressão de P-STAT3: Para avaliação da p-STAT3 os cortes do núcleo arqueado, foram lavados com TRIS 3x por 5 minutos. A seguir realizou-se o bloqueio da peroxidase (90% de metanol e 10% de peróxido de hidrogênio) por 10 minutos, e os cortes foram lavados com TRIS 3x por 5 minutos. Posteriormente realizamos o bloqueio das ligações inespecíficas (Soro normal de cavalo 5%, triton 0,4%, e Tris) por 1 hora e então os cortes foram incubados por 48 horas com o anticorpo primário (rabbit anti-p-STAT3; Cell signalling Technology) diluído 1:1000 em tampão TRIS, contendo triton (0,4%) e soro normal de cavalo 5%. Passadas as 48 h, os cortes foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpo secundário (Donkey anti-rabbit conjugado com Alexa Fluor 594, Jackson). Em seguida, os cortes foram lavados com tampão TRIS e montados em lâminas e cobertos com Fluoromount (Sigma). A visualização da proteína “repórter” hrGFP (neurônios Kiss-1) foi realizada utilizando-se o comprimento de onda de 394 nm (cor verde) e a marcação para STAT3 com comprimento de onda de 665 (vermelho). A análise das imunomarcações foi realizada utilizando-se um sistema computadorizado que inclui um microscópio Leica conectado a uma câmera digital Leica DC 200 para comparar as imagens. As duplas marcações ou marcações simples foram contadas manualmente, dentro de uma área padrão, usando o software NIH ImageJ (version 1.63). Quantificamos o número de neurônios Kiss1-hrGFP no ARC unilateral e no AVPV bilateralmente. No ARC rostral e caudal quantificamos o número de neurônios expressando p-STAT3, e quantificamos o número de duplas p-STAT3/Kiss1-hrGFP para calcular a porcentagem de neurônios Kiss1-hrGFP que expressam p-STAT3, definido como a

razão (%) entre duplas p-STAT3/Kiss1-hrGFP pelo número de neurônios Kiss1-hrGFP na mesma área.

Duplas marcações Neurokinina B e dinorfina colocalizado com células Kiss1-hrGFP:

Diferentes séries de cortes do ARC do encéfalo de camundongos-fêmeas Kiss-1-hrGFP foram utilizados para dupla marcação Neurokinina B/Kiss1-hrGFP ou dinorfina A/ Kiss1-hrGFP. Os tecidos foram inicialmente lavados com TRIS 3x, por 5 minutos e incubados em tampão Citrato (30 minutos) a 60°C. Os cortes foram novamente lavados 3 vezes no TRIS 1x, por 5 minutos e foram incubados em solução para bloquear as ligações inespecíficas por 1 hora (Soro normal de cavalo 5%, triton 0,4%, e Tris). Em seguida, foram incubados com anticorpo primário anti NKB (rabbit anti-neurokinina B, 1:2500; Bachem) ou anticorpo primário antidinorfina diluído (guinea pig anti prodynorphin, 1:250; Neuromics) por 48 horas a 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram incubados por 1 hora com anticorpo secundário biotilado: donkey anti rabbit ou donkey anti guinea pig (1:500). Após o período de incubação, os cortes foram lavados com TRIS 3x, por 5 minutos e posteriormente incubados com Streptavidina conjugada com a peroxidase (1:250), por 1 hora. Os cortes foram então novamente lavados e realizamos a revelação utilizando a Tiramida conjugada com Alexa Fluor 594 (1:1000) para visualizar a NKB ou tiramida conjugada com Alexa Fluor 350 (1:1000) para visualizar a DYN. A captura das imagens e análise das imunomarcações no ARC para NKB e de DYN foram realizadas pelo sistema da Zeiss LSM 780, AxioObserver, utilizando a objetiva de 63X (óleo) foram obtidas séries de 35 planos ópticos individuais do núcleo arqueado de cada animal.

As imagens de duplas marcações foram adquiridas pelo escaneamento sequencial de cada canal, afim de eliminar possíveis interferências entre eles e assegurar a confiabilidade da análise quantitativa de colocalização. A colocalização entre NKB e neurônios Kiss1-hrGFP, bem como entre DYN e neurônios Kiss1-hrGFP foi analisada em séries 35 planos ópticos individuais do núcleo arqueado de cada animal pelo cálculo dos coeficientes de colocalização de Manders, usando o software NIH ImageJ (version 2.0). Os coeficientes de Manders variam de 0 a 1 e independem da intensidade dos pixel nos canais individuais (ZINCHUK; GROSSENACHER-ZINCHUK, 2009).

Todo o campo da imagem foi utilizado para obter os coeficientes de colocalização de Manders, M1 e M2, para os canais 1 e 2, respectivamente. O coeficiente de Manders M1

representa a fração da marcação em verde (GFP) que se sobrepõe espacialmente com a imunomarcação de DYN ou NKB, sendo descrito como GFP-DYN/GFP ou GFP-NKB/GFP. Já coeficiente de Manders M2 representa a fração da imunomarcação de DYN ou NKB, em azul ou vermelho, respectivamente, que se sobrepõe espacialmente com a marcação em verde (GFP) sendo descrito como DYN-GFP/DYN ou NKB-GFP/NKB. A sobreposição espacial entre Kiss1-GFP/DYN e Kiss1-GFP/NKB foi confirmada pela reconstrução 3D usando a visão ortogonal das imagens obtidas em Z.

Expressão de CART e p-STAT3 e colocalizações em células Kiss1-hrGFP: Os cortes do ARC do encéfalo de camundongos-fêmeas Kiss-1-hrGFP foram utilizadas para a análise de expressão tripla (CART/p-STAT3/Kiss1-hrGFP). Os tecidos foram inicialmente lavados com TRIS 3x, por 5 minutos e realizou-se o bloqueio com Metanol (70% de metanol, 10% de peróxido de hidrogênio e 20% de TRIS 1X) por 10 minutos. Os cortes foram novamente lavados 3 vezes no TRIS 1x, por 5 minutos e foram incubados em solução para bloquear as ligações inespecíficas por 1 hora (Soro normal de cavalo 5%, triton 0,4%, e Tris). Em seguida, foram incubados com anticorpo primário anti p-STAT3(rabbit anti-p-STAT3; Cell signalling Technology; 1:1000) e anticorpo primário anti-CART (goat anti CART; Santa Cruz biotechnology ; 1:500) por 48 horas a 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram incubados por 1 hora com anticorpo secundário: donkey anti rabbit 594 (1:250) e donkey anti goat biotinilado (1:500). Após o período de incubação, os cortes foram lavados com TRIS 3x, por 5 minutos e posteriormente incubados com Streptavidina conjugada com a peroxidase, por 1 hora. Os cortes foram então novamente lavados e realizamos a revelação utilizando a tiramida conjugada com Alexa Fluor 350 (1:1000) para visualizar o CART. A captura das imagens e análise das imunomarcações para CART, p-STAT3 e Kiss1-hrGFP no ARC foram realizadas pelo sistema o sistema da Zeiss LSM 780, AxioObserver, utilizando a objetiva de 63X (óleo), sendo obtidas séries de 16 planos ópticos individuais do núcleo arqueado de cada animal

Dupla marcação CART e p-STAT3: Os cortes do ARC do encéfalo de camundongos-fêmeas Kiss-1-hrGFP foram utilizadas para dupla marcação (CART/p-STAT3). Os tecidos foram inicialmente lavados com TRIS 3x, por 5 minutos e realizou-se o bloqueio com Metanol (70% de metanol, 10% de peróxido de hidrogênio e 20% de TRIS 1X) por 10 minutos. Os cortes foram novamente lavados 3 vezes no TRIS 1x, por 5 minutos e foram

incubados em solução para bloquear as ligações inespecíficas por 1 hora (Soro normal de cavalo 5%, triton 0,4%, e Tris 1X). Em seguida, foram incubados com anticorpo primário anti p-STAT3(rabbit anti-p-STAT3; Cell signalling Technology; 1:1000) por 48 horas a 4°C. Posteriormente, os cortes foram incubados por 1 hora com o anticorpo secundário biotinilado donkey anti rabbit (1:250). Após o período de incubação, os cortes foram lavados com TRIS 3x, por 5 minutos e posteriormente incubados com o complexo Avidina-Biotina (Vectastain ABC; Vector Laboratories), por 1 hora. Depois, os cortes foram incubados com 3-3' diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories), níquel e água oxigenada por 10 minutos. Os cortes foram novamente lavados 3 vezes no TRIS 1x, por 5 minutos e incubados em solução para bloquear as ligações inespecíficas por 1 hora (Soro normal de cavalo 5%, triton 0,4%, e Tris 1X). Em seguida, foram incubados com anticorpo primário anti-CART (goat anti CART; Santa Cruz biotechnology ; 1:500) por 48 horas a 4°C. Após esse período os cortes foram incubados por 1 hora com o anticorpo secundário biotinilado donkey anti goat (1:250). Os cortes, então, foram lavados com TRIS 3x, por 5 minutos e posteriormente incubados com o complexo Avidina-Biotina (Vectastain ABC; Vector Laboratories), por 1 hora. Por fim, os cortes foram incubados com 3-3' diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories) e água oxigenada por 10 minutos. Os cortes foram montados em lâminas e analisados no microscópio Leica conectado a uma câmera digital Leica DC 200. O número de células p-STAT3, CART e colocalizações CART/p-STAT3 foram contados manualmente, dentro de uma área similar, usando o software NIH ImageJ (version 1.63).

3.6 Dosagem de leptina, estradiol e LH no plasma

A dosagem plasmática de leptina e estradiol foi realizada por ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima) utilizando o kit comercial Mouse Leptin (Millipore -Cat. # EZML-82K) para dosagem de leptina e o kit Estradiol SYM (Symbiosys Diagnóstica- Cat. #10181). Para dosagem plasmática de LH utilizamos o método Luminex xMAP, utilizando o kit comercial MILLIPLEX MAP Mouse Pituitary Magnetic Bead Panel (Millipore - Cat. # MPTMAG-49K).

3.7 Análise da Ingestão Alimentar

A ingestão alimentar (g) foi aferida semanalmente (por 6 semanas) pela pesagem da ração no período da manhã, subtraindo a quantidade de ração residual do peso de ração

ofertado na semana anterior (peso da ração ofertada - peso ração residual na semana seguinte = ingestão alimentar(g)/caixa). Os animais foram pesados no mesmo dia da pesagem da ração. A ingestão alimentar e calórica semanal foram corrigidas pela somatória do peso corporal dos 2 animais mantidos na mesma caixa, os valores foram expressos em gramas ou quilocalorias por 30 gramas de peso corporal, conforme calculado nas equações (I) e (II), abaixo:

$$Ingestão\ alimentar\left(\frac{g}{30g\ de\ peso\ corporal}\right)=\frac{Ingestão\ alimentar\ (g) \times 30}{Soma\ do\ peso\ corporal}\quad (I)$$

$$Ingestão\ calórica\left(\frac{kcal}{30g\ de\ peso\ corporal}\right)=\frac{Ingestão\ alimentar\ (g) \times 30}{Soma\ do\ peso\ corporal}\quad (II)$$

Com base no conteúdo calórico de cada ração e na porcentagem de lipídios da dieta regular e da hiperlipídica, (3.2 *Dieta*) calculamos o total de calorias e o total de calorias em lipídeos ingeridas, em cada caixa (2 animais), ao longo das 6 semanas experimentais, bem como o ganho de peso do início até o fim desse período. Assim, foi possível medir a eficiência da ingestão alimentar de cada 2 animais da mesma caixa, dividindo o ganho de peso nesse período pelo total de caloria ingerida.

3.8 Análise do Ciclo Estral

A abertura vaginal é um evento mediado por apoptose, dependente de estrógeno, em que há completa canalização da vagina. É um sinal usado com índice externo do início da puberdade em roedores, pois resulta de um aumento da secreção de estradiol e pode ser induzido pela injeção de estradiol em camundongos juvenis (RODRIGUEZ et al., 1997). Em nosso estudo, a partir dos 25 dias de vida, a abertura vaginal foi monitorada diariamente, no período da manhã, pela exame visual da vulva. O peso corporal foi aferido no dia da abertura vaginal.

O esfregaço vaginal foi coletado entre 8h e 9h da manhã a partir do dia da abertura vaginal e analisado em seguida. A coleta do esfregaço vaginal foi realizada utilizando pipetas plásticas, com soro fisiológico (NaCl 0,9%), que foram superficialmente inseridas na vagina dos camundongos, lavando duas vezes e na terceira vez coletando o fluido vaginal em lâminas de vidro. O material foi analisado em microscópio para a avaliação citológica e determinação

da fase do ciclo de acordo com a predominância de determinados tipos celulares. (MARCONDES et al., 2002). O proestro foi caracterizado pelo predomínio de células epiteliais nucleadas, o estro pelo predomínio de células cornificadas e anucleadas, o diestro I pela presença de leucócitos e células cornificadas na mesma proporção e o diestro II pela predominância de leucócitos (COHEN et al., 2002).

O primeiro estro foi definido como o primeiro dia em que a fêmea apresentou esfregaço vaginal correspondendo ao estro. O início da ciclicidade foi definido como a idade em que a fêmea iniciou o primeiro ciclo regular menor ou igual a seis dias (NELSON et al., 1990). A partir do início da ciclicidade, calculamos a duração do ciclo estral pelo número de dias entre o início de um estro e o início do estro do ciclo seguinte (SALIAN-MEHTA et al., 2014). Analisamos a duração do ciclo estral entre os 40 e 63 dias de vida do animal. A duração de ciclos estrais consecutivos foi utilizada para o cálculo da média da duração do ciclo estral. Ciclos estrais com duração de 4 a 6 dias foram considerados ciclo regulares, já os ciclos menores que 4 e maiores que 6 dias foram considerados como ciclos irregulares (BERNSTEIN et al., 2014).

3.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada usando o programa Statistica (StatSoft, USA). Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA para medidas repetidas para as análises do peso corporal, ingestão alimentar e calórica que incluem o tempo como variável independente e a dieta, seguida do pós-teste Newman-Keuls; ANOVA two-way para as análises hormonais, peso dos órgãos e imunoistoquímica, seguido do pós-teste Newman-Keuls. O pós-teste de Newman-Keuls foi realizado somente quando o teste do ANOVA (F) mostrou interações estatisticamente significantes. O Teste t-Student não pareado foi utilizado para as análises da idade da abertura vaginal, primeiro estro, início da ciclicidade, análise do ciclo estral, ingestão calórica de lipídeos total, eficiência da ingestão alimentar, quantificação de neurônios Kiss1-hrGFP no AVPV, dos coeficientes de Manders e intensidade média de fluorescência, tendo como variável independente o tratamento com HFD. O tempo da abertura vaginal, primeiro estro e início da ciclicidade foram analisados por análise da curva de

sobrevivência e de teste (Mantel Cox) Rank logarítmico. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=5\%$).

3.10 Protocolos Experimentais

Estudo 1. Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ingestão alimentar, peso corporal e índices da maturação puberal

Após o desmame, com 21 dias, as fêmeas Kiss1-hrGFP foram divididas em dois grupos:

Grupo RD – Recebeu a dieta controle

Grupo HFD - Recebeu a dieta hiperlipídica

Avaliamos a ingestão alimentar e peso corporal semanalmente. A partir dos 25 dias de vida, avaliamos diariamente o aparecimento do primeiro índice de maturação puberal, a abertura vaginal (sinal físico externo do início da puberdade Navarro et al., 2005). Após a abertura vaginal, coletamos diariamente o esfregaço vaginal, a fim de registrar a idade do primeiro estro e do início da ciclicidade. A partir do início da ciclicidade, também registramos diariamente o ciclo estral até as fêmeas completarem 63 dias de vida, concluindo 6 semanas de experimento.

Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental do estudo 1.

Estudo 2. Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a concentração plasmática de leptina, LH e estradiol e peso do útero e ovário de camundongos Kiss1-hrGFP fêmeas.

Após o estudo 1 definimos três momentos para coleta de sangue de fêmeas com a dieta regular e hiperlipídica: aos 28 dias (fêmeas consideradas pré-púberes), aos 32 dias (fêmeas no início da puberdade) e no diestro II após completar 63 dias de vida (fêmeas do estudo 1). Neste protocolo experimental, das fêmeas com 28 dias, 100% das fêmeas com dieta regular e 90% das fêmeas com dieta hiperlipídica não apresentavam abertura vaginal. Já das fêmeas com 32 dias, 100% das que receberam dieta hiperlipídica e somente 25% das fêmeas que receberam dieta regular apresentavam abertura vaginal no dia do experimento.

Nessas datas, as fêmeas foram eutanasiadas por decapitação, entre 10 a 12 horas da manhã, e o sangue truncanl foi coletado em tubos de polipropileno, mantidos sob gelo para a dosagem hormonal de estradiol, LH e leptina; o útero e ovários foram removidos e dissecados para pesagem em balança de precisão.

Figura 2 Representação esquemática do protocolo experimental do estudo 2.

Estudo 3 e 4- Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ativação de STAT3 em neurônios kisspeptidérgicos e neurônios CART em resposta ao estímulo com leptina e sobre a coexpressão de Neuroquinina B e Dinorfina em neurônios Kiss1-hrGFP de camundongos fêmeas Kiss1-hrGFP, no início da puberdade.

Camundongos fêmeas Kiss1-hrGFP, com 32 dias de vida, foram divididas em 4 grupos:

Grupo RD (A.V.) + Salina (salina estéril, 100µl, i.p.)

Grupo RD (A.V.) + Leptina (0,5 mg/kg)

Grupo HFD (A.V.) + Salina (salina estéril, 100µl, i.p.)

Grupo HFD (A.V.) + Leptina (0,5 mg/kg)

Aos 32 dias de vida, no dia do experimento final, retirou-se a dieta às 16 horas. Às 17 horas, os animais receberam uma dose de leptina recombinante (Leptin, Mouse Recombinant; *E.coli*; Calbiochem®) intraperitoneal (0,5 mg/kg, 100µl, i.p.) ou veículo (salina estéril, 100µl, i.p.). Quarenta e cinco minutos após a administração de leptina ou salina os animais foram anestesiados com Ketamina (45mg/Kg de peso corporal)/xilazina (5 mg/kg de peso corporal) e perfundidos com PF 4% (Item 3.3 M&M), para coleta do encéfalo das fêmeas Kiss1-hrGFP para posterior procedimento imunoistoquímico (Item 3.5 dos M&M). Neste protocolo experimental, 90% das fêmeas que receberam dieta hiperlipídica e somente 24 % das fêmeas que receberam dieta regular apresentavam abertura vaginal no dia do experimento.

Figura 3. Representação esquemática do protocolo experimental do estudo 3 e 4.

Estudo 5- Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ativação de STAT3, em neurônios kisspeptidérgicos em resposta ao estímulo com leptina após a maturação sexual.

Em outro grupo de fêmeas Kiss1-hrGFP, as fêmeas foram mantidas com a dieta normal ou hiperlipídica por um período de 6 semanas. (P.P.= pós- puberdade).

Grupo RD (P.P.) + Salina (salina estéril, 100µl, i.p.)

Grupo RD (P.P.) + Leptina (0,5 mg/kg)

Grupo HFD (P.P.) + Salina (salina estéril, 100µl, i.p.)

Grupo HFD (P.P.) + Leptina (0,5 mg/kg)

Completadas as seis semanas com RD ou HFD, as fêmeas foram separadas para o experimento no dia em que apresentaram esfregaço vaginal correspondente ao diestro I A dieta foi retirada às 16 h e às 17h, os animais receberam uma dose de leptina recombinante (0,5 mg/kg , 100µl , i.p.) ou salina estéril i.p (100µl , i.p.). Quarenta e cinco minutos após a administração de leptina ou salina os animais foram anestesiados Ketamina (45mg/Kg de peso corporal)/xilazina (5 mg/kg de peso corporal) e perfundidos com PF 4% (Item 3.3 M&M), para coleta de tecido cerebral e posterior procedimento de imunoistoquímico (Item 3.5 dos M&M).

Figura 4. Representação esquemática do protocolo experimental do estudo 5.

4. RESULTADOS

Estudo 1: Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ingestão alimentar, peso corporal e índices da maturação puberal.

Tanto a idade como a administração de dieta hiperlipídica influenciaram o ganho de peso dos animais significativamente (HFD $F_{1,34}=16,99$; $p<0,001$; idade $F_{6,204}=1069,88$; $p<0,0001$; - Interação HFD x idade $F_{6,204}= 7,91$ $p<0,0001$; $n=17-19$), sendo que a HFD promoveu maior ganho de peso a partir dos 28 dias, e este maior ganho de peso se manteve até os 63 dias de vida (**Figura 5.A**).

Figura 5. Avaliação semanal do (A) peso corporal (g), $n=17-19$, (B) ingestão alimentar (g/30g de peso corporal), $n=7-9$, e (C) ingestão calórica (kcal/30 g de peso corporal), $n=7-9$. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; * $p<0,05$ em relação ao grupo RD no mesmo dia pelo Two way ANOVA , medidas repetidas, pós-teste Newman-Keuls. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

A ingestão alimentar (g/ 30g de peso corporal) (**Figura 5.B**) foi menor nos animais que receberam a dieta hiperlipídica ao longo das seis semanas experimentais (HFD:

$F_{1,14}=220,11$, $p < 0,0001$; semana $F_{5,73}=6,21$, $p < 0,0001$; interação HFD x Semana $F_{5,73}= 5,72$ $p < 0,001$; $n=7-9$).

A ingestão calórica (kcal/ 30g de peso corporal) (**Figura 5.C**) passou a ser menor no grupo com dieta hiperlipídica a partir dos 35 dias (após duas semanas de administração da dieta) até os 63 dias de vida (HFD $F_{1,48}=14,61$; $p < 0,01$; Semana $F_{5,48}= 6,43$, $p < 0,0001$; interação HFD x Semana $F_{5,48}=5,61$ $p < 0,001$; $n=7-9$).

A ingestão calórica total de lipídeos (**Figura 6.A**) foi maior no grupo que recebeu a dieta hiperlipídica ($t(15)=20$, $p < 0,0001$, $n=8-9$). A eficiência da ingestão alimentar (**Figura 6.B**), mensurada pela razão entre ganho de peso corporal e ingestão calórica total no período experimental, também foi maior no grupo HFD ($t(15)=4,9$, $p < 0,001$, $n=8-9$).

Figura 6. Avaliação da (A) ingestão calórica de lipídeos total (g), $n=8-9$, (B) Eficiência da ingestão alimentar (Ganho de peso/Caloria ingerida) (g/kcal), $n=8-9$. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; * $p < 0,05$ em relação ao grupo RD pelo teste T-student. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

A idade de abertura vaginal ocorreu entre os dias 31 e 44 nos animais com a dieta regular ($38 \pm 0,67$ dias), já nos animais com a dieta hiperlipídica, a abertura vaginal ocorreu mais precocemente ($t(52)=8,01$ $p < 0,0001$, $n=25-29$) entre os dias 28 a 37 ($32 \pm 0,53$ dias) (**Figura 7.A**), sendo que 50% dos animais com dieta normal apresentaram abertura vaginal aos 38 dias, ao passo que com a HFD, 50% apresentaram abertura vaginal com 31 dias (**Figura 7.C**) ($\chi^2 (1) = 41,82$; $p < 0,0001$, $n=25-29$). O peso no dia da abertura vaginal não diferiu entre os grupos (**Figura 7.B**).

Figura 7. Avaliação da (A) Idade no dia da abertura vaginal (dias), n=25-29, (B) Peso no dia da abertura vaginal, n=11, (C) Porcentagem acumulativa de fêmeas que apresentaram abertura vaginal n=25-29. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; * p<0,05 em relação ao grupo RD pelo teste T-student. * p<0,0001 na curva de sobrevivência pelo Log-rank. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

Houve também antecipação do primeiro estro no grupo HFD ($36,43 \pm 1,445$) em relação ao grupo com dieta regular ($46,40 \pm 2,581$) ($t(10)=3,62$; $p<0,01$, $n=5-7$) (**Figura 8 A e B**), sendo que 50% das fêmeas HFD apresentaram o primeiro estro com 36 dias e 50% das fêmeas com RD apresentaram o primeiro estro aos 47 dias ($\chi^2(1)=6,21$, $p<0,05$, $n=5-7$).

Figura 8. Avaliação da (A) Idade no dia primeiro estro (dias), n=5-7, (B) Porcentagem acumulativa de fêmeas que apresentaram o primeiro estro. n=5-7. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; * p<0,05 em relação ao grupo RD pelo teste T-student. * p<0,0001 na curva de sobrevivência pelo Log-rank. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

O ciclo estral foi avaliado para determinar os efeitos da dieta na maturação reprodutiva. Fêmeas com dieta regular apresentam menor número de ciclos estrais regulares, entre os 40 e 63 dias de vida, do que fêmeas com HFD ($t(8)=3,3$ p<0,05, n=4-6) (**Figura 9.A**). Nesse período, fêmeas com dieta regular exibiram a maior porcentagem do tempo do esfregaço vaginal correspondente ao diestro I e diestro II do que fêmeas com HFD ($t(8) = 3,8$ p<0,01, n=4-6) (**Figura 9.B**). Dessa forma, avaliamos que o início da ciclicidade, (definido como a idade em que o animal apresentou o primeiro ciclo menor ou igual a seis dias) ocorreu mais cedo em animais com HFD ($44,20 \pm 1,654$) que em relação aos animais RD ($57,00 \pm 1,8$) ($t(13)=3,95$; p<0,001, n=7-8) (**Figura 10.A-C**). Sendo assim, 50% das fêmeas HFD apresentaram o início da ciclicidade aos 44 dias e 50% das fêmeas RD com 57 dias ($\chi^2(1) = 10,28$, p< 0,001; n=7-8) (**Figura 10.C**). Importante salientar que 30% das fêmeas RD não apresentaram o início da ciclicidade no período experimental, por isso não se observa na **Figura 10.C** 100% das fêmeas RD apresentando início da ciclicidade, ao completarem 63 dias.

Figura 9. Comparação da ciclicidade de fêmeas com dieta regular (RD) e dieta hiperlipídica (HFD) entre os 40 e 63 dias experimentais. (A) Número de ciclos regulares entre os 40 e 63 dias. (n=4-6) (B) Porcentagem do tempo em que a fêmea apresentou esfregaço vaginal correspondendo ao diestro I e diestro II * $p < 0,05$ em relação ao grupo RD pelo teste T-student. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

Figura 10. Avaliação da (A) Idade no início da ciclicidade (dias), (n=7-8), (B) Porcentagem acumulativa de fêmeas que apresentaram o início da ciclicidade. (n=7-8). HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; * $p < 0,05$ em relação ao grupo RD pelo teste T-student. . * $p < 0,0001$ na curva de sobrevivência pelo Log-rank. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

Estudo 2. Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a concentração plasmática de leptina, LH e estradiol e peso do útero e ovário de camundongos Kiss1-hrGFP fêmeas.

Animais que receberam HFD apresentaram aumento do peso do útero (mg/g de peso corporal) em relação ao grupo RD, aos 28 e aos 32 dias (HFD $F_{1,38}=21,35$, $p < 0,0001$; Idade

$F_{2,38} = 6,615$, $p < 0,05$; $n = 5-8$) (**Figura 11.A**), e aumento do peso do ovário (mg/g de peso corporal) aos 32 dias de vida (**Figura 11.B**), (HFD $F_{1,37} = 16,25$, $p < 0,001$; Idade $F_{2,37} = 30,98$, $P < 0,00001$, $n = 7-10$).

Figura 11. Avaliação do (A) peso do útero (mg/g de peso corporal), $n = 5-8$, (B) peso do ovário (mg/g de peso corporal), $n = 7-10$, aos 28, 32 e 63 dias. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; DII : Diestro II. Letras diferentes representam $p < 0,05$ entre os grupos, após teste de ANOVA Two-Way, pós-teste Newman Keuls. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

Tanto a dieta como a idade influenciaram as concentrações plasmáticas de leptina circulante nos animais que receberam a dieta hiperlipídica (**Figura 12**) (HFD $F_{1,38}=98,99$, $p<0,00001$; Idade $F_{2,38}=24,22$, $p<0,00001$; interação HFD x Idade $F_{2,38}=24,26$, $p<0,00001$; $n=9$). Houve aumento da leptina plasmática em todas as idades nos animais HFD em relação aos animais RD, sendo que aos 63 dias, os animais que receberam HFD por 6 semanas, apresentaram a maior concentração plasmática de leptina circulante em relação aos outros grupos.

Figura 12. Avaliação da concentração plasmática de leptina (ng/mL) aos 28, 32 e 63 dias $n=9$. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; DII : Diestro II. Letras diferentes representam $p<0,05$ entre os grupos, após teste de ANOVA Two-Way, pós-teste Newman Keuls . Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

Nível plasmático basal do hormônio luteinizante (LH) (ng/mL) não foi influenciado pela dieta, somente pela idade (Idade $F_{2,39}=3,98$, $p<0,05$; $n=6-8$) (**Figura 13.A**), no entanto, o pós teste não revelou diferenças estatísticas entre os grupos. Já o nível de plasmático de estradiol (pg/mL) foi influenciado somente pela idade (Idade $F_{2,32}=15,46$; $p<0,00001$; $n=5-7$) (**Figura 13.B**), sendo que os animais com 63 dias de vida apresentaram menores níveis plasmáticos de estradiol.

Figura 13. Avaliação da (A) concentração plasmática de LH (ng/mL), n=6-8 e (B) de estradiol (pg/mL) aos 28, 32 e 63 dias, n=5-7 . HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; DII : Diestro II. Letras diferentes representam $p < 0,05$ entre os grupos, após teste de ANOVA Two-Way, pós-teste Newman Keuls. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

Estudo 3- Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ativação de STAT3 em neurônios kisspeptidérgicos e neurônios CART de camundongos fêmeas Kiss1-hrGFP em resposta ao estímulo com leptina no início da puberdade.

Aos 32 dias de vida, isto é, com a administração da dieta hiperlipídica por 11 dias, o estímulo com leptina e a HFD não alteraram o número de neurônios Kiss1-hrGFP no núcleo arqueado rostral e caudal (**Figura 14.A e Figura 15.A**). No AVPV a HFD também não afetou o número de neurônios Kiss1-hrGFP aos 32 dias de vida pós natal (**Figura 16. A-C**).

A HFD e o estímulo com leptina promoveram aumento da ativação da p-STAT3 no núcleo arqueado rostral (**Figura 14.B**) (HFD $F_{1,20}=10,36$ $p<0,01$; Leptina $F_{1,20}=184,40$ $p=0,0001$; $n=5-7$.) e no arqueado caudal (HFD $F_{1,20}=8,792$, $p<0,01$; Leptina $F_{1,20}=636,9$ $p<0,0001$; $n=5-7$.) (**Figura 15.B**).

A administração de dieta hiperlipídica associada com o estímulo de leptina promoveu aumento da porcentagem de neurônios Kiss1-hrGFP que responderam a este hormônio no núcleo arqueado rostral (Leptina $F_{1,20}=31,22$, $P<0,0001$; interação HFD x Leptina $F_{1,20}=4,537$ $p<0,05$; $n=5-7$.) (**Figura 14.C**) e no núcleo arqueado caudal (Leptina $F_{1,20}=64,35$ $p<0,0001$; HFD $F_{1,20}=10,99$, $p<0,01$; HFD x Leptina $F_{1,20}=5,23$; $p<0,05$; $n=5-7$.) (**Figura 15.C**) em relação aos animais tratados com RD nas respectivas áreas.

As **figuras 17 e 18** apresentam fotomicrografias representativas de imunofluorescência para p-STAT3 e neurônios Kiss1-hrGFP no núcleo arqueado rostral e caudal, respectivamente, de fêmeas com 32 dias.

Figura 14. Avaliação do efeito da dieta hiperlipídica na distribuição de neurônios Kiss1-hrGFP de fêmeas com 32 dias no arqueado rostral (A) Número de neurônios expressando Kiss1-hrGFP (B) Número de células p-STAT3 positivas, (C) porcentagem de duplas p-STAT3 com neurônios Kiss1-GFP em relação ao total de neurônios Kiss1-hrGFP. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; Letras diferentes representam $p < 0,05$ entre os grupos, após teste de ANOVA Two-Way, pós-teste Newman Keuls. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias, $n=5-7$.

Figura 15. Avaliação do efeito da dieta hiperlipídica na distribuição de neurônios Kiss1-hrGFP de fêmeas com 32 dias no arqueado caudal (A) Número de neurônios expressando Kiss1-hrGFP (B) Número de células p-STAT3 positivas, (C) porcentagem de duplas p-STAT3 com neurônios Kiss1-hrGFP em relação ao total de neurônios Kiss1-GFP aos 32 dias,. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; Letras diferentes representam $p < 0,05$ entre os grupos, após teste de ANOVA Two-Way, pós-teste Newman Keuls. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias, $n=5-7$.

Figura 16. Fotomicrografia fluorescente (20X) mostrando a distribuição dos neurônios Kiss1-hrGFP na área periventricular anteroventral de camundongos fêmeas com 32 dias. (A) Animais tratados com dieta regular (B) Animais tratados com dieta hiperlipídica (C) Número de neurônios Kiss1-hrGFP no (n=5) AVPV 3V: Terceiro ventrículo; AVPV: área periventricular anteroventral. Escala de barra: 80 μ m.

Figura 17. Fotomicrografia fluorescente (20X) mostrando o padrão de ativação da p-STAT3 (núcleos vermelhos) e neurônios Kiss1-hrGFP no núcleo arqueado rostral de camundongos fêmeas com 32 dias. (A) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de salina ip.; (B) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg) (C) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de salina ip. (D) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg); Escala de barra: 80µm. No detalhe (40x), observa-se ausência de colocalização da p-STAT3/Kiss1-hrGFP em animais tratados com RD (A-B) e a presença em animais tratados com HFD (C-D) Escala de barra: 40µm; Setas indicam colocalizações p-STAT3/Kiss1-hrGFP. 3V: Terceiro ventrículo; ARC: núcleo arqueado.

Figura 18. Fotomicrografia fluorescente (20X) mostrando o padrão de ativação da p-STAT3 (núcleos vermelhos) e neurônios Kiss1-hrGFP no núcleo arqueado caudal de camundongos fêmeas com 32 dias. (A) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de salina ip.; (B) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg) (C) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de salina ip. (D) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg), Escala de Barra: 80µm; No detalhe (40x), observa-se ausência de colocalização da p-STAT3/Kiss1-hrGFP em animais tratados com RD (A-B) e a presença em animais tratados com HFD (C-D), Escala de Barra: 40µm ; Setas indicam colocalizações p-STAT3/Kiss1-hrGFP. 3V: Terceiro ventrículo; ARC: núcleo arqueado.

A **Figura 19** apresenta fotomicrografias representativas de imunofluorescência para p-STAT3, CART e neurônios Kiss1-hrGFP. Observa-se que animais estimulados com leptina, tanto com a RD como com a HFD, apresentam colocalização da p-STAT3 com CART e que há fibras CART que circundam os neurônios Kiss1-hrGFP.

Nem a dieta hiperlipídica, nem o estímulo com leptina afetaram o nº de neurônios CART no ARC ($p > 0,05$; $n = 4-5$) (**Figura 20.A**) de fêmeas com 32 dias. A dieta hiperlipídica associada com o estímulo de leptina induziu aumento da expressão da p-STAT3 no ARC (HFD: $F_{1,14} = 7,76$, $p < 0,05$; Leptina: $F_{1,14} = 53,39$, $p < 0,0001$; interação HFD x Leptina: $F_{1,14} = 8,08$, $p < 0,05$; $n = 4-5$) (**Figura 20.B**).

Além disso, a dieta hiperlipídica associada com o estímulo de leptina também induziu aumento da ativação da STAT3 em neurônios CART (HFD: $F_{1,14} = 9,71$, $p < 0,01$; Leptina: $F_{1,14} = 20,79$, $p < 0,0001$; interação HFD x Leptina: $F_{1,14} = 9,71$, $p < 0,01$; $n = 4-5$) (**Figura 20.C**) e da porcentagem de neurônios CART que expressaram p-STAT3 em resposta ao estímulo com leptina, expresso como a razão de duplas pelo total de neurônios CART, em porcentagem (Leptina: $F_{1,14} = 19,12$, $p < 0,001$; interação HFD x Leptina: $F_{1,14} = 5,41$, $p < 0,01$) (**Figura 20.D**).

A **Figura 21** apresenta fotomicrografias representativas da imunomarcação para CART (citoplasma marrom) e o padrão de ativação da p-STAT3 (núcleos escuros) no núcleo arqueado de camundongos fêmeas Kiss1-hrGFP com 32 dias.

Figura 19. Fotomicrografias fluorescentes (63X) mostrando imunomarcacão para CART (em azul), o padrão de ativação da p-STAT3 (núcleos vermelhos) e neurônios Kiss1-hrGFP no núcleo arqueado camundongos fêmeas com 32 dias. **(A)** Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de salina ip.; **(B)** Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg) **(C)** Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de salina ip. **(D)** Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg); Setas largas indicam colocalização p-STAT3/Kiss1-hrGFP, setas longas e estreitas indicam colocalização p-STAT3/CART e setas curtas e estreitas indicam fibras CART envolvendo neurônios Kiss1-hrGFP; ARC: núcleo arqueado. As imagens são projeções de intensidade máxima de uma série de 16 planos ópticos individuais. Escala de barra: 20 μ m.

Figura 20. Avaliação quantitativa do efeito da dieta hiperlipídica na distribuição de neurônios CART e de células p-STAT3 positivas no ARC de fêmeas com 32 dias (A) número de neurônios CART (B) número de células p-STAT3 positivas (C) Número de duplas (colocalização) entre CART e p-STAT3 (D) Porcentagem de duplas CART e p-STAT3 em relação ao número total de neurônios CART aos 32 dias., (n=4-5) HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; Letras diferentes representam $p < 0,05$ entre os grupos, após teste de ANOVA Two-Way, pós-teste Newman Keuls. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

Figura 21. Fotomicrografia de imunoistoquímica (20X) mostrando imunomarcagem para CART (citoplasma marrom), o padrão de ativação da p-STAT3 (núcleos escuros) no núcleo arqueado camundongos Kiss1-hrGFP fêmeas com 32 dias. (A) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de salina ip.; (B) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg) (C) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de salina ip. (D) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg); Escala de barra: 80µm. No detalhe (40x), setas indicam colocalizações p-STAT3/CART, ARC, Escala de barra: 40µm; núcleo arqueado; 3V : terceiro ventrículo.

Estudo 4. Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a coexpressão de Neuroquinina B e Dinorfina em neurônios Kiss1-hrGFP de fêmeas durante o início da puberdade.

Os coeficientes de Mander para a imunomarcação de GFP-DYN/GFP e GFP-NKB/GFP, representam a sobreposição de pixel colocados no canal verde (GFP) expressos como uma fração do número total de pixel desse canal. Já os coeficientes de Manders de DYN-GFP/DYN e NKB-GFP/NKB, representam a sobreposição de pixel colocados no canal azul e vermelho, respectivamente, expressos como uma fração do número total de pixel de cada canal.

Não verificamos diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; $n=5-6$) nos coeficientes de colocalização de Manders GFP-DYN/GFP (**Figura 22.A**), DYN-GFP/DYN (**Figura 22.B**), GFP-NKB/GFP (**Figura 23.A**), e NKB-GFP/NKB (**Figura 23.B**).

Figura 22. Coeficiente de Manders indicando o índice de colocalização de (A) GFP em relação à dinorfina (B) e de dinorfina em relação ao GFP em fêmeas com 32 dias. $n=5-6$. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; DYN: dinorfina; NKB: neuroquinina B. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

Figura 23. Coeficiente de Manders indicando o índice de colocalização de (A) GFP em relação à neuroquinina B (B) e da neuroquinina B em relação ao GFP em fêmeas com 32 dias. n=5-6. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular ; DYN: dinorfina; NKB: neuroquinina B. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias.

A intensidade média de fluorescência da imunomarcacão para dinorfina e neuroquinina B no ARC rostral (**Figura 24.A e B**) não diferiu entre os grupos com dieta regular e dieta hiperlipídica.

A **Figura 25** apresenta fotomicrografias representativas de fluorescência para dinorfina, pontos em azul, e neurônios Kiss1-hrGFP na região do ARC de animais com dieta regular e hiperlipídica. Fotomicrografias representativas de fluorescência para a neuroquinina B são apresentadas na **Figura 26**, que demonstram uma intensa imunomarcacão em vermelho no ARC de fêmeas com 32 dias, com dieta regular e hiperlipídica, bem como os neurônios Kiss1-hrGFP na mesma região. A visão ortogonal das imagens confocais confirmam a sobreposição espacial dos neurônios Kiss1-hrGFP com a dinorfina (**Figura 27**) e neuroquinina B (**Figura 28**) em fêmeas no início da puberdade, independente da dieta.

Figura 24. Intensidade média de fluorescência da (A) dinorfina (B) neuroquinina B no núcleo arqueado em fêmeas com 32 dias. n=5-6. HFD: grupo dieta hiperlipídica; RD: grupo dieta regular; DYN: dinorfina; NKB: neuroquinina B. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias .

Figura 25 . Fotomicrografia fluorescente (63X) mostrando imunomarcção para Dinorfina em azul (C-D) e neurônios Kiss1-hrGFP (A-B) em verde e a sobreposição das imagens (E-F) do arqueado rostral de fêmeas (32 dias) tratadas com (A-C-E) dieta regular (B-D-F) dieta hiperlipídica. As imagens são projeções de intensidade máxima de uma série de 35 planos ópticos individuais. Escala de barra: 20 μ m.

Figura 26 . Fotomicrografia fluorescente (63X) mostrando imunomarcção para neuroquinina B em vermelho (C-D) e neurônios Kiss1-hrGFP (A-B) em verde e a sobreposição das imagens (E-F) do arqueado rostral de fêmeas (32 dias) tratadas com (A-C-E) dieta regular (RD) (B-D-F) dieta hiperlipídica (HFD). As imagens são projeções de intensidade máxima de uma série de 35 planos ópticos individuais. Escala de barra: 20 μ m.

Figura 27. Imagens confocais representativas (63X) do núcleo arqueado rostral de cada grupo (**A e F**) e a visão ortogonal mostrando a sobreposição espacial de neurônios Kiss1-hrGFP com dinorfina (Azul) em fêmeas no início da puberdade (32 dias) que receberam dieta regular (RD) (**A-E**) e dieta hiperlipídica (HFD) (**F-J**). A relação espacial entre **B-C-D** e entre **G-H-I** são representadas nas figuras **E** e **J**, respectivamente. As linhas verdes, vermelhas e azuis indicam a posição em que as superfícies ortogonais se encontram. As barras representam 20 μm nas figuras **A e F** e 5 μm nas figuras **B-D e G-H**.

Figura 28. Imagens confocais representativas (63X) do núcleo arqueado rostral de cada grupo (**A e F**) e a visão ortogonal mostrando a sobreposição espacial de neurônios Kiss1-hrGFP com a neuroquinina B (vermelho) em fêmeas no início da puberdade (32 dias) que receberam dieta regular (RD) (**A-E**) e dieta hiperlipídica (HFD) (**G-J**). A relação espacial entre **B-C-D** e entre **G-H-I** são representadas nas figuras **E** e **J**, respectivamente. As linhas verdes, vermelhas e azuis indicam a posição em que as superfícies ortogonais se encontram. As barras representam 20 μm nas figuras **A e F** e 5 μm nas figuras **B-D e G-H**.

Estudo 5- Efeitos da dieta hiperlipídica sobre a ativação de STAT3, em neurônios kisspeptidérgicos em resposta ao estímulo com leptina após a maturação sexual.

A administração da dieta hiperlipídica por 6 semanas e o estímulo com leptina não afetaram o número de neurônios Kiss1-hrGFP no arqueado rostral e caudal (dieta $p>0,05$; estímulo $p>0,05$; $n=4-6$) (**Figura 29.A e Figura 30.A**). Além disso, a dieta hiperlipídica não influenciou o número de neurônios Kiss1-hrGFP na região AVPV ($p>0,05$; $n=8$) (**Figura 31**).

Animais tratados com a HFD e estimulados com leptina ip. apresentaram menor número de células p-STAT3 positivas no núcleo arqueado rostral (**Figura 29.B**) (Leptina $F_{1,17}=24,63$, $p<0,0001$; interação HFD x Leptina $F_{1,17}=5,48$, $p<0,05$; $n=4-6$) e no núcleo arqueado caudal (**Figura 30.B**) (Leptina $F_{1,15}=21,17$, $p<0,001$; interação HFD x Leptina $F_{1,15}=5,41$, $p<0,05$; $n=4-6$).

Somente o estímulo com a leptina influenciou a porcentagem de neurônios Kiss1-hrGFP que expressaram p-STAT3 no núcleo arqueado rostral em relação aos animais que receberam salina ip. (**Figura 29.C**) (Leptina $F_{1,14}= 8,99$, $p<0,01$) e caudal (**Figura 30.C**) (Leptina $F_{1,15}= 17,24$ $p<0,001$; $n=4-6$).

As **figuras 32 e 33** apresentam fotomicrografias representativas de imunofluorescência para p-STAT3 e neurônios Kiss1-hrGFP no núcleo arqueado rostral e caudal, respectivamente, de fêmeas com 63 dias. Qualitativamente as **figuras 32 e 33** demonstram a menor ativação da p-STAT3 em animais que receberam a HFD ao serem estimulados com a leptina, e os insertos apresentam as colocalizações de p-STAT3 com neurônios Kiss1-hrGFP.

Figura 29. Avaliação do efeito da dieta hiperlipídica na distribuição de neurônios Kiss1-hrGFP no arqueado rostral, em camundongos fêmeas com 63 dias (Diestro I)(A) Número de neurônios expressando Kiss1-hrGFP (B) Número de células p-STAT3 positivas, (C) porcentagem de duplas p-STAT3 com neurônios Kiss1-hrGFP em relação ao total de neurônios Kiss1-hrGFP. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; Letras diferentes representam $p < 0,05$ entre os grupos, após teste de ANOVA Two-Way, pós-teste Newman Keuls. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias, $n=4-6$.

Figura 30. Avaliação do efeito da dieta hiperlipídica na distribuição de neurônios Kiss1-hrGFP em camundongos fêmeas com 63 dias (Diestro I) no núcleo Arqueado caudal (A) Número de neurônios expressando Kiss1-hrGFP (B) Número de células p-STAT3 positivas, (C) porcentagem de duplas p-STAT3 com neurônios Kiss1-hrGFP em relação ao total de neurônios Kiss1-hrGFP. HFD: grupo dieta hiperlipídica RD: grupo dieta regular; Letras diferentes representam $p < 0,05$ entre os grupos, após teste de ANOVA Two-Way, pós-teste Newman Keuls. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão das médias, $n=4-6$.

Figura 31. Fotomicrografia fluorescente (20X) mostrando a distribuição dos neurônios Kiss1-hrGFP na área periventricular anteroventral de camundongos fêmeas com 63 dias (Diestro I). (A) Animais tratados com dieta regular (B) Animais tratados com dieta hiperlipídica (C) Número de neurônios Kiss1-hrGFP no AVPV (n=8), Escala de barra: 80 μ m. 3V: Terceiro ventrículo; AVPV: área periventricular anteroventral.

Figura 32. Fotomicrografia fluorescente (20X) mostrando o padrão de ativação da p-STAT3 (núcleos vermelhos) e neurônios Kiss1-hrGFP no núcleo arqueado rostral de camundongos fêmeas com 63 dias (Diestro I). (A) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de salina ip.; (B) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg) (C) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de salina ip. (D) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg), Escala de barra: 80µm ; No detalhe (40x), setas indicam colocalizações de p-STAT3/Kiss1-hrGFP. 3V: Terceiro ventrículo; ARC: núcleo arqueado, Escala de barra: 40µm.

Figura 33. Fotomicrografia fluorescente (20X) mostrando o padrão de ativação da p-STAT3 (núcleos vermelhos) e neurônios Kiss1-hrGFP no núcleo arqueado caudal de camundongos fêmeas com 63 dias (Diestro I). (A) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de salina ip.; (B) Animais tratados com dieta regular e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg) (C) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de salina ip. (D) Animais tratados com dieta hiperlipídica e que receberam injeção de leptina ip. (0,5 mg/kg), Escala de barra: 80µm ; No detalhe (40x), setas indicam colocalizações de p-STAT3/Kiss1-hrGFP. 3V: Terceiro ventrículo; ARC: núcleo arqueado, Escala de barra: 40µm.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou em camundongos fêmeas, que a dieta hiperlipídica promove antecipação da maturação puberal associada com aumento da ingestão calórica de lipídios e aliada ao aumento da eficiência da ingestão alimentar e do peso corporal. Foi observado aumento das concentrações de leptina circulante, bem como aumento do peso do útero e do ovário aos 32 dias, sem alterações nos níveis basais de estradiol e LH. Durante o início da puberdade, a dieta hiperlipídica induziu aumento da responsividade de neurônios Kiss1 e de neurônios que expressam CART à leptina no ARC, sugerindo que este efeito contribua para o desenvolvimento sexual precoce observado nesses animais. Por outro lado, verificamos, que após seis semanas de administração da dieta hiperlipídica, esta não influenciou a responsividade dos neurônios Kiss1-hrGFP à leptina, mas promoveu resistência parcial a este hormônio no ARC. A relação e relevância entre esses achados serão discutidos a seguir.

Fêmeas Kiss1-hrGFP tratadas com dieta hiperlipídica apresentaram aumento do peso corporal a partir dos 28 dias, e este ganho de peso se manteve até os 63 dias de vida. No entanto, esse ganho de peso não foi associado ao aumento da ingestão alimentar (g/30g de peso corporal) nem à ingestão calórica (kcal/30g de peso corporal), uma vez que a avaliação desses parâmetros semanalmente mostrou redução quando comparados com o grupo da dieta regular.

Nossa hipótese para o ganho de peso observado está provavelmente envolvida com a ingestão calórica total de lipídeos (kcal) ao longo do experimento. No grupo que recebeu a dieta hiperlipídica, a eficiência da alimentação (ganho de peso total/ingestão calórica total) foi aumentada, demonstrando que o ganho de peso corporal nesse grupo não resultou da hiperfagia ou do total de calorias ingeridas, e sim da composição de macronutrientes da dieta. Storlien et al., (1986) demonstraram a importância da composição da dieta no ganho de peso, por meio da comparação entre uma dieta rica em carboidratos com a dieta hiperlipídica (contendo a mesma quantidade calórica por grama de ração). Verificou-se que a dieta hiperlipídica foi eficiente em aumentar a massa adiposa em ratos. Além disso, esses autores demonstraram que a predominância de lipídeos na dieta induziu uma diminuição na termogênese pós-prandial e acúmulo de lipídeos corporal, associados com resistência à insulina. Parekh et al., (1998) também relataram que há maior eficiência da ingestão

alimentar em camundongos da linhagem C57BL/6 quando comparada com a linhagem A/J, de tal forma que, a composição de macronutrientes da dieta e não a hiperfagia influenciam o ganho de peso dessa linhagem quando submetidos à HFD.

Estudos em humanos demonstram que há relação entre o peso crítico, a adiposidade corporal, a menarca e a manutenção de ciclos ovulatórios regulares (FRISCH; MCARTHUR, 1974). Nos últimos 30 anos observou-se que o início da puberdade tem ocorrido mais precocemente em meninas, o que pode estar relacionado com a prevalência da obesidade infantil no mesmo período (KAPLOWITZ, 2008). Por outro lado, em mulheres, a perda de peso pode resultar em amenorréia, ao passo que, a recuperação do peso a um nível mínimo pode restaurar os ciclos menstruais (FRISCH; MCARTHUR, 1974). Confirmando as observações em mulheres, estudos de Frisch et al., (1975), Brill e Moenter., (2009), Li et al., (2012), Sánchez-Garrido et al., (2013) demonstraram a antecipação da abertura vaginal e do primeiro estro em roedores-fêmeas tratados com dieta hiperlipídica (24,6% de lipídeos) quando comparado a roedores mantidos com uma dieta de baixo teor de lipídeos (5,0%). Além de corroborar com os estudos da literatura, nosso estudo demonstrou que a HFD é capaz de antecipar não só a abertura vaginal e o primeiro estro, como também o início da ciclicidade em camundongos-fêmeas.

Estudos da literatura sugerem que fatores metabólicos estão associados a eventos que participariam acelerando o processo de maturação sexual. Tem sido sugerido que a leptina, cuja secreção é aumentada em decorrência do aumento da adiposidade atue estimulando a atividade do eixo reprodutivo, facilitando o início da puberdade. Assim, a leptina tem sido reconhecida como um fator permissivo para o início da puberdade em humanos e em animais. Essa ação permissiva é evidenciada por estudos que mostram que a deficiência da leptina não só causa obesidade, mas também promove atraso no início da puberdade e hipogonadismo, que pode ser restaurada pela administração de leptina exógena (MONTAGUE et al., 1997; FAROOQI et al., 1999). Adicionalmente, Cheung et al., (1997) demonstraram que a administração de leptina, diariamente, antecipa o 1º estro e a abertura vaginal em animais com restrição alimentar. Segundo estes autores, os efeitos da leptina na ativação do sistema reprodutivo estão relacionados com o nível plasmático deste hormônio, que ao atingir um determinado limiar, pode contribuir para a ativação do eixo reprodutivo. A administração de leptina diariamente também adianta a abertura vaginal, primeiro estro e ciclicidade em

camundongos-fêmeas (AHIMA et al., 1997). De modo similar, Chehab et al. (1997), demonstram que a administração diária de leptina em camundongos-fêmeas acelera a função reprodutiva, abertura vaginal, primeiro estro, a maturação dos órgãos reprodutivos e diminui os níveis hormonais de LH e estradiol.

Em nosso trabalho, observamos aumento da leptina plasmática em animais do grupo HFD, aos 28, 32 e 63 dias quando comparado com animais tratados com dieta controle. Os animais HFD com 63 dias apresentaram um aumento significativo da leptina plasmática em relação aos animais HFD com 28 e 32 dias, pois o maior tempo de exposição à dieta hiperlipídica (seis semanas) promoveu aumento do ganho de peso corporal e aumento da adiposidade. Li et al. (2012) mostraram que a antecipação da abertura vaginal em ratas que recebem a HFD também está relacionada com a elevação precoce dos níveis plasmáticos de leptina.

Desse modo, sugere-se que o aumento precoce dos níveis de leptina nos animais HFD pode resultar em aumento da ação central da leptina, portanto do tônus excitatório sobre o eixo reprodutivo, estimulando a reativação da secreção do GnRH. É importante considerar que outros fatores periféricos envolvidos com a adiposidade podem estar envolvidos na reativação do eixo reprodutivo durante a puberdade, como por exemplo a insulina. A ausência da sinalização da insulina no sistema nervoso central resulta em comprometimento da fertilidade (BRÜNING et al., 2000) e atraso na puberdade (QIU et al., 2013), além disso, já se demonstrou que a insulina é capaz de ativar a secreção de GnRH e LH *in vitro* (BURCELIN et al., 2003). A antecipação da reativação do eixo gonadal e, por consequência, do processo de maturação puberal nos animais HFD, nos propiciou avaliar os parâmetros e a ocorrência precoce de eventos dependentes da secreção de estrógeno: a abertura vaginal, primeiro estro, início da ciclicidade e aumento do peso do útero e ovário aos 32 dias. Os resultados não mostraram alterações nos níveis plasmáticos basais de estradiol e LH.

Os níveis basais de LH plasmático aumentam na puberdade (MEIJS ROELOFS; KRAMER; SANDER, 1983) com aumento da frequência dos pulsos de secreção de LH (URBANSKI; OJEDA, 1985; LI et al., 2012). Li et al. (2012), verificaram aumento da frequência de pulsos de secreção de LH no período da tarde em animais pré-púberes tratados com HFD. Esses autores verificaram também que a média da amplitude dos pulsos de LH e a

média dos níveis de LH aos 28 e 32 dias, de animais alimentados com HFD, não apresentou alterações (LI et al., 2012). Nossos resultados diferem dos resultados de Li et al. (2012) e Urbanski e Ojeda (1985) pelo método e horário de coleta de sangue utilizados, esses autores coletaram o sangue no período da tarde e realizaram coletas seriadas. Por outro lado, nossos dados são compatíveis com o que foi observado pelo estudo de Sánchez-garrido et al, (2013) e Iwasa et al., (2015), no qual a dieta hiperlipídica também não influenciou os níveis basais de LH em animais oriundos de ninhadas normais.

Com relação aos níveis de estradiol, a literatura mostra que há um progressivo aumento dos níveis de estradiol ao longo do desenvolvimento puberal em meninas (APTER, 1980; NORJAVAARA et al., 1996) e em modelos animais, incluindo ratos (OJEDA E SKINNER, 2006). Jasik e Lustig (2008) propuseram que o estrógeno tem um papel fundamental no início e progressão da puberdade e que os níveis plasmáticos desse hormônio estão associados com o excesso de tecido adiposo. O aumento do tecido adiposo pode levar ao aumento de estrógeno circulante de diversas maneiras. A síntese periférica de E1 e E2 pode ocorrer via aromatização de andrógenos que ocorre em adipócitos (BÉLANGER et al., 2002). Além disso, há baixos níveis de SHBG, globulina ligadora de hormônio sexual, na obesidade o que leva aos altos níveis de estrógeno e de andrógenos livres na circulação (APTER et al., 1984; MCCARTNEY et al., 2006). Além disso, altos níveis de leptina contribuem para antecipar os pulsos geradores de GnRH promovendo aumento dos níveis de estrógeno precocemente (MAQSOOD et al., 2007). O metabolismo de estradiol pode ser modulado por fatores ambientais como a dieta, sendo que dietas com excesso de proteína estimulam a metabolização estrogênica no fígado, ao passo que uma dieta hiperlipídica estimula a conversão para metabólitos estrogênicos ativos (LUSTIG, et al., 1989 apud JASIK; LUSTIG, 2008). Jasik e Lustig (2008) sugerem, então, que a obesidade resulta em altos níveis de estrógeno promovendo a telarca e progressão puberal precoce.

Diferentemente, o estudo de Klein et al.,(1998) que estudou grupos de meninas obesas e não obesas não mostrou relação entre o aumento da adiposidade com o aumento dos níveis de estrógeno. Neste estudo, a média de 24 horas dos níveis de estradiol esteve correlacionada significativamente com a idade óssea, mas não diferiu entre crianças obesas e não obesas no mesmo estágio puberal. Além disso, não houve correlação dos níveis de estradiol com a quantidade de tecido adiposo e índice de massa corporal. Em ratos, Li et al. (2012) observam

aumento dos níveis de estradiol durante a tarde, em animais que receberam HFD após os desmame. Nossos resultados contrastam com os de Li et al. (2012) em modelo de obesidade no início da puberdade, uma vez que não verificamos diferenças significativas nos níveis de estrógeno, apesar dos resultados indicarem a abertura vaginal, primeiro estro precoce e aumento do peso do útero e do ovário. Possivelmente não detectamos diferenças devido ao horário da coleta que foi diferente do grupo de Li et al. (2012) que realizou a coleta no período da tarde em ratos.

Em nosso trabalho observamos que em fêmeas com 32 dias, a dieta hiperlipídica aumentou a ativação da STAT3 e promoveu um discreto aumento na porcentagem de neurônios Kiss1-hrGFP expressando p-STAT3 após o estímulo com leptina, no núcleo arqueado rostral e caudal. Nossa hipótese é de que esses achados se associam ao aumento de peso corporal e da leptina plasmática, quando comparado com animais da mesma idade tratados com dieta controle. Dessa forma, é possível que o aumento da leptina plasmática circulante nesses animais possa aumentar a ativação do eixo reprodutivo via neurônios kisspeptidérgicos ou por interneurônios, que ao serem ativados, seriam capazes de ativar neurônios envolvidos com a regulação do eixo gonadal.

Em modelo de redução da ninhada, que resulta em sobrepeso e início precoce da puberdade, observa-se aumento da sensibilidade hipotalâmica à leptina em ratas no período da peripuberdade, com aumento dos níveis hipotalâmicos de RNAm para POMC e para LepR e da fosforilação de STAT3 em resposta ao estímulo com leptina no hipotálamo (CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2015). Assim, sugerimos que o aumento da ativação da STAT3 no ARC de fêmeas no início da puberdade que receberam a HFD e apresentam aumento de peso em relação ao grupo com dieta regular pode resultar do aumento da sensibilidade hipotalâmica à leptina, o que poderia potencializar as ações desse hormônio no eixo reprodutivo no sistema nervoso central.

A ação direta da leptina em neurônios kisspeptidérgicos do ARC foi descrita por Cravo et al. (2011), que verificaram que aproximadamente 15% dos neurônios Kiss1-hrGFP do ARC expressam p-STAT3 após estímulo com leptina em camundongos-fêmeas adultas. Já Louis et al. (2011) verificaram que 5-6% de neurônios Kiss-ir no ARC expressam p-STAT3 induzida pela leptina. Adicionalmente, a administração de leptina foi associada com o

aumento da expressão de RNAm do gene *Kiss1* em modelo animal *ob/ob* e *in vitro* (LUQUE; KINEMAN; TENA-SEMPERE, 2007). E segundo o estudo de Hu et al.(2015), que demonstraram que a redução da expressão da kisspeptina no ARC resulta em redução da pulsatilidade de secreção de LH, redução da amplitude do pico de LH e irregularidades no ciclo estral, os neurônios kisspeptidérgicos do núcleo arqueado estariam envolvidos na regulação da geração de pulsos de GnRH e na amplificação do pico de LH (HU et al., 2015). Considerando os estudos de Cravo et al. (2011) Hu et al.(2015), Louis et al. (2011) e Luque et al., (2007), é possível sugerir que em camundongas-fêmeas adultas a leptina possa interagir com neurônios kisspeptidérgicos do ARC, direta ou indiretamente, para modular a liberação de GnRH e consequentemente o pico de LH e contribuir para a regularidade do ciclo estral (HU et al., 2015).

Cravo et al. (2013) realizaram experimentos para reativar a expressão do receptor da leptina (LepR) em neurônios Kiss de animais *LepR null* (que não expressam receptor de leptina), gerando os animais Kiss1-CRE LepR null. Verificaram que esses animais não apresentaram maturação reprodutiva e nem houve melhora no fenótipo metabólico em relação aos animais *LepR null*. Além disso, observaram que a ausência da maturação reprodutiva em animais adultos com a reexpressão de LepR especificamente em neurônios kisspeptidérgicos manteve o número de neurônios Kiss1 no ARC e AVPV semelhante aos animais pré-púberes selvagens. Ademais, não se constatou ativação da STAT3 em neurônios Kiss em fêmeas adultas e pré-púberes Kiss1-CRE LepR null estimuladas com leptina, indicando que a expressão funcional de LepR em neurônios kisspeptidérgicos depende da maturação reprodutiva completa, o que não ocorre nesse modelo. Em animais selvagens adultos, Cravo et al. (2013), observaram que há um aumento da expressão de LepR em neurônios Kiss1 de camundongos fêmeas, quando comparados com animais pré-púberes. Dessa forma, esses autores concluíram que a sinalização mediada pelo LepR em neurônios Kiss1 deve ocorrer após a maturação sexual e que esses neurônios não são mediadores diretos da ação da leptina no eixo reprodutivo durante a puberdade.

No presente trabalho observamos que animais com 32 dias tratados com HFD apresentaram um discreto aumento da responsividade dos neurônios Kiss1 à leptina. Apesar disso, tanto em animais tratados com a dieta regular (RD) quanto com a HFD, a porcentagem de neurônios Kiss1 que responderam à leptina foi baixa, variando de 0 a 10,4% no núcleo

arqueado rostral e de 0 a 4,7% no núcleo arqueado caudal. A literatura ainda não apresenta claramente quão efetiva é a contribuição da ação direta da leptina sobre essa pequena parte dos neurônios kisspeptidérgicos, mas, conforme demonstrado anteriormente por Cravo et al. (2013) a ação da leptina sobre neurônios Kiss1 deve ocorrer indiretamente antes da maturação puberal e somente a ação da leptina em neurônios Kiss1 não é suficiente para o desenvolvimento reprodutivo.

Adicionalmente, Donato et al., (2011) utilizando camundongos com deleção seletiva de receptores para leptina em neurônios Kiss1 verificaram que tanto machos como fêmeas não apresentavam alteração na maturação sexual ou na reprodução, demonstrando assim, que a sinalização direta da leptina sobre os neurônios Kiss1 pode não ser essencial para a função reprodutiva normal. Além disso, esses autores demonstraram, também, que o papel da leptina em induzir o início da puberdade pode ser mediado por neurônios do núcleo pré-mamilar ventral (PMV), não envolvendo a sinalização da leptina em neurônios Kiss-1 do ARC.

O estudo de Louis et al.,(2011) demonstrou que há baixa colocalização entre LepR e neurônios kisspeptidérgicos no ARC (5-6%), porém também demonstrou que neurônios que expressam LepR possuem contato sináptico com neurônios kisspeptidérgicos do AVPV e ARC, o que reforça a possível ação indireta que a leptina exerce sobre essas populações neuronais. Outra evidência de que a contribuição da ação direta da leptina em neurônios kisspeptidérgicos seja pequena em camundongos é o estudo eletrofisiológico realizado por Cravo et al. (2013), no qual somente 10% dos neurônios Kiss do ARC foram despolarizados pelo estímulo com este hormônio, em camundongos adultos. Diferente do que foi constatado em cobaias, nas quais demonstrou-se que a leptina induz despolarização em grande parte dos neurônios Kiss1 do ARC mediada por canais TRPC (QIU et al., 2011b).

Considerando os trabalhos de Donato et al. (2011), Cravo et al. (2013) e Louis et al.,(2011) , buscamos investigar o papel da leptina na regulação da atividade de neurônios Kiss1 indiretamente, mediada por outros neurônios, em nosso modelo. A primeira evidência é de que a leptina é capaz de estimular neurônios POMC/CART do ARC (ELIAS et al., 1998; 1999). Adicionalmente, o estudo de True et al., (2013) demonstrou, em ratos, que os neurônios Kiss1 do ARC e AVPV recebem inervação de fibras POMC/CART. Além disso, esses autores mostraram que o CART estimula o aumento do potencial de ação de disparo de

neurônios Kiss1. Nesse sentido, buscamos investigar a relação entre neurônios CART e Kiss1-hrGFP em animais estimulados com leptina no início da puberdade. Observamos que em camundongos-fêmeas no início da puberdade, estimulados com leptina, tanto com a RD como com a HFD, apresentam colocalização da p-STAT3 com CART e que há fibras CART que circundam os neurônios Kiss1-hrGFP, como já demonstrado em ratos por True et al. (2013), sugerindo um possível papel dos neurônios CART em mediar os efeitos da leptina sobre neurônios kisspeptidérgicos. É importante considerar também que neurônios CART do ARC enviam projeções diretas para neurônios GnRHérgicos (TRUE et al., 2013) e, portanto, poderiam estimular o eixo reprodutivo. Além disso, a expressão do RNAm de CART é sensível ao estado metabólico do organismo, sendo diminuída em condições de restrição calórica (TRUE et al., 2013) e aumentada em condições de sobrepeso de animais alimentados com HFD, podendo refletir os níveis de leptina na circulação (WORTLEY et al., 2004). A estimulação de neurônios CART pela leptina no ARC parece estar envolvida com a regulação do peso corporal, evitando o acúmulo do excesso de tecido adiposo, promovendo mobilização dos lipídios armazenados (WORTLEY et al., 2004).

Verificamos uma maior ativação da STAT3 em neurônios que expressam CART no ARC de fêmeas com HFD, durante o início da puberdade (32 dias) em resposta ao estímulo com leptina. Dessa forma, é possível sugerir que a administração da HFD em animais no período do início da puberdade contribui para antecipar a puberdade pelo aumento da leptina circulante, que por sua vez correlaciona-se com um aumento da ativação de neurônios CART no ARC (ELIAS et al., 1998). Nossa hipótese é a de que os neurônios CART, além de seu papel em regular o balanço energético, podem estimular o eixo reprodutivo, via neurônios Kiss1 ou diretamente, via estimulação de neurônios GnRHérgicos (LEBRETHON et al., 2000b, 2000a; PARENT et al., 2000). No entanto, estudos complementares devem ser realizados para avaliar a relação entre HFD, puberdade precoce e a possível ação dos neurônios CART no eixo gonadal nesse período.

Em contraste com neurônios kisspeptidérgicos do ARC, neurônios kisspeptidérgicos do AVPV não expressam receptor para leptina, logo, não respondem ao estímulo com leptina pela fosforilação da STAT3 ou alteração do potencial de membrana (CRAVO et al., 2011, 2013; LOUIS et al., 2011). No entanto, é possível que sejam influenciados indiretamente pela leptina e outros fatores metabólicos, uma vez que estudos com traçadores neuronais

evidenciam a existência de conexões recíprocas entre neurônios kisspeptidérgicos do ARC e AVPV (HOONG YIP et al., 2015; YEO; HERBISON, 2011). Hoong Yip et al. (2015) demonstraram que há fibras do ARC que se projetam para o AVPV e estão próximas ao corpo celular dos neurônios kisspeptidérgicos desta área. A inervação recíproca entre os neurônios kisspeptidérgicos dessas áreas pode exercer um papel na regulação global que a kisspeptina exerce sobre os neurônios GnRH e na atividade do eixo reprodutivo (HOONG YIP et al., 2015).

Considerando uma série de estudos que apontam a importância da população KND no início da puberdade (KAUFFMAN et al., 2009; NAKAHARA et al., 2013; NAVARRO et al., 2012) investigamos como a dieta hiperlipídica influencia a coexpressão desses neuropeptídeos no núcleo arqueado. Os neurônios KND do ARC expressam kisspeptina, neuroquinina B e dinorfina A e formam uma rede de neurônios interconectada por numerosas projeções colaterais, essa população neuronal tem importante papel na geração dos pulsos de GnRH, através de sua capacidade de gerar um potente sinal de saída, pela secreção de kisspeptina, que por sua vez estimula neurônios GnRHérgicos. A NKB e Dyn exercem uma autorregulação sobre a atividade de neurônios KND; a NKB estimula enquanto a dinorfina inibe a secreção de kisspeptina. (NAVARRO et al., 2009; TENA-SEMPERE, 2013). A expressão de NKB e DYN no ARC, assim como a de kisspeptina, está sujeita ao feedback negativo exercido pelos esteroides sexuais (CHOLANIAN et al., 2014; NAVARRO et al., 2009, 2011b; WAKABAYASHI et al., 2010). Apesar disso, a expressão de NKB ao longo do desenvolvimento parece ser menos sensível à inibição estimulada pelo estradiol (GILL et al., 2012). O tratamento com estrógeno é capaz de diminuir a excitabilidade de neurônios *Tac2-EGFP* do ARC de camundongas ovariectomizadas, que pode estar relacionado com o papel dos neurônios KND em mediar a supressão da secreção pulsátil de LH induzida pelo estradiol (CHOLANIAN et al., 2014).

Em nosso modelo observamos que houve coexpressão de neuroquinina B e dinorfina em neurônios KISS1-hrGFP no núcleo arqueado, em fêmeas no início da puberdade. Na literatura, há relato da coexpressão de NKB e DYN, bem como de seus respectivos receptores, em neurônios kisspeptidérgicos por meio de hibridização *in situ* em camundongos fêmeas ovariectomizadas (NAVARRO et al., 2009), e por imunistoquímica em caprinos (WAKABAYASHI et al., 2010), ovelhas (GOODMAN et al., 2007) e em roedores (KALLÓ

et al., 2012; SAWAI et al., 2012), no entanto, o nosso estudo é primeiro a demonstrar a colocalização por imunofluorescência em camundongos fêmeas no período do início da puberdade.

Sabe-se que a NKB tem um importante papel no desenvolvimento puberal, uma vez que mutações em seu gene ou de seu receptor, *TAC3* e *TACR3*, respectivamente, resultam no fenótipo de hipogonadismo hipogonadotrófico em humanos (TOPALOGU et al., 2009), e a deleção do gene *Tac2* em camundongos fêmeas promove atraso na maturação sexual e anormalidades no início da ciclicidade (TRUE et al., 2015). Além disso, há um progressivo aumento na expressão de RNAm para *Tac2* e *Tacr3* ao longo da maturação pós-natal, ocorrendo um pico de expressão da *Tac2* no início da puberdade e uma estabilização dos níveis de expressão da *Tacr3* na transição peripuberal (GILL et al., 2012; NAVARRO et al., 2012).

A importância da NKB e da DYN na progressão da puberdade e no controle da secreção pulsátil de GnRH e LH, é demonstrada por trabalhos utilizando antagonistas e agonistas de seus receptores de membrana, NK3R e KOR, respectivamente (GRACHEV et al., 2012; LI et al., 2014; MOSTARI et al., 2013; NAKAHARA et al., 2013; NAVARRO et al., 2012; WAKABAYASHI et al., 2010). A injeção intracerebroventricular do agonista de NK3R, senktide, induz aumento dos níveis de LH, tanto em fêmeas pré-púberes (GRACHEV et al., 2012; NAVARRO et al., 2012) como em fêmeas adultas, no diestro (NAVARRO et al., 2012). Já o bloqueio da sinalização via NK3R no início da puberdade provoca atraso no início da puberdade (LI et al., 2014; NAVARRO et al., 2012) e atraso no aumento da frequência de pulsos de LH (LI et al., 2014) sugerindo que a sinalização da NKB em seu receptor tem importante papel no controle do início da puberdade e está associada com o pulso gerador de GnRH.

No estudo de Nakahara et al., (2013) verificaram que quarenta dias de infusão intraperitoneal, por minipump osmótico, do antagonista do receptor da dinorfina (KOR), nor-binaltorfimina, ou do agonista de NK3R, senktide, promoveu avanço do início da puberdade, avaliado pela abertura vaginal e do primeiro estro em ratas. Esse efeito esteve associado com a antecipação da secreção pulsátil de LH em ratas pré-púberes induzida tanto pelo antagonista de KOR como pelo o agonista de NK3R, sendo que o antagonista de KOR promoveu significativo

aumento da frequência de pulso de LH nessa fase. Dessa forma, Nakahara et al., (2013) sugere que a sinalização da DYN- KOR pode estar relacionada à inibição da secreção de GnRH e LH no período pré-púbere, ao passo que, a sinalização da NKB-NK3R pode estimular a secreção pulsátil de GnRH e LH durante o início da puberdade (NAKAHARA et al., 2013). Apesar deste trabalho não avaliar o sítio de antagonismo do receptor KOR e de agonismo do receptor NK3R, os autores sugerem que a sinalização de DYN-KOR e NKB-NK3R em neurônios KNDy no ARC podem modular a secreção pulsátil de kisspeptina, que por sua vez atua em neurônios GnRHérgicos, promovendo a secreção pulsátil de GnRH.

O papel estimulatório da NKB na secreção pulsátil de LH depende dos níveis estrogênicos; em animais intactos a administração icv. de senktide estimula a secreção pulsátil de LH (KINSEY-JONES et al., 2012; NAKAHARA et al., 2013), ao passo que em animais ovariectomizados a administração icv. de senktide promove inibição da secreção pulsátil de LH (KINSEY-JONES et al., 2012; NAVARRO et al., 2009, 2011a; SANDOVAL-GUZMÁN; RANCE, 2004). Kinsey-jones et al., (2012) sugeriram que a NKB exerce seus efeitos de suprimir a secreção de LH por ativar cascatas autócrinas e parácrinas na sinalização da Dyn/KOR dentro do ARC.

Com relação ao efeito da dieta hiperlipídica na expressão da NKB, a literatura mostra que puberdade precoce em ratos induzida pela administração da HFD tem associação com o aumento precoce da expressão de *Tac2* no hipotálamo acompanhada por um aumento da frequência de pulsos de LH (LI et al., 2012). Segundo Li et al. (2014) a sinalização de NKB-NK3R pode estar envolvida na aceleração da frequência de pulsos de LH nesse modelo experimental, uma vez que o antagonista do receptor de NKB (NK3R) retarda a puberdade precoce induzida pela HFD e atrasa o aumento da frequência de pulsos de LH. Em nosso estudo a dieta hiperlipídica e o consequente aumento de leptina circulante, não alteraram o grau de colocalização da NKB e DYN em neurônios kisspeptidérgicos no início da puberdade. A dieta hiperlipídica também não afetou a imunorreatividade à dinorfina e à neuroquinina no ARC, medida pela intensidade média de fluorescência.

Nossos dados não corroboram os achados de Li et al.(2012;2014) possivelmente pela diferente análise realizada. A metodologia utilizada por Li et al., (2012) avaliou a expressão de NKB indiretamente, pela expressão do RNAm da *Tac2*, ao passo que no presente estudo

avaliamos a expressão da forma proteica da NKB, por imunofluorescência, sendo importante considerar que o efeito da dieta hiperlipídica em aumentar a expressão de RNAm da *Tac2* (LI et al., 2012) não implica, necessariamente, em aumento da expressão proteica de NKB. Por outro lado, Navarro et al. (2012) demonstraram diminuição da expressão de RNAm da NKB em condições de balanço energético negativo associado com atraso na puberdade (NAVARRO et al. 2012) o que corrobora os resultados de Li et al. (2014, 2012), em que a expressão de NKB é sensível ao status metabólico do organismo.

Com relação a dinorfina, não há estudos específicos sobre o efeito do balanço energético positivo em sua expressão no ARC e as possíveis consequências na maturação sexual (TENA-SEMPERE, 2013), porém, segundo Vucetic et al. (2011), a administração da HFD por 15 semanas não afetou a expressão hipotalâmica de RNAm de *Pdyn*. Ademais, True et al. (2011) demonstraram que nem a restrição calórica nem a restauração da leptinemia nessa condição, alteraram a expressão de RNAm para *Pdyn*. As observações de True et al. (2011) e Vucetic et al. (2011) em conjunto com nossos dados, que mostram que a HFD não influenciou a expressão da Dyn em neurônios Kiss1-hrGFP, sugerem que a expressão de DYN no ARC não é sensível ao status metabólico do organismo, de modo que, pode não estar envolvida com a puberdade precoce induzida pela dieta hiperlipídica. No entanto, não se pode excluir o fato de que os métodos e análises utilizados por True et al. (2011) e Vucetic et al. (2011) e pelo nosso trabalho podem não ser suficientemente sensíveis pra detectar as diferenças na expressão da DYN induzidas por alterações no balanço energético.

Assim, pela metodologia adotada em nosso trabalho, não detectamos efeito da dieta hiperlipídica e do aumento de peso corporal e leptina plasmática, associados à administração dessa dieta, sobre a expressão da DYN e NKB no ARC. No entanto, estudos adicionais que possibilitem a determinação proteica quantitativa, por outra metodologia, permitirão uma análise mais detalhada, estabelecendo mais claramente os efeitos da HFD sobre a expressão desses peptídeos no início da puberdade.

Adicionalmente, independente da dieta, observamos um menor índice de colocalização da DYN em neurônios Kiss1-hrGFP quando comparado com o mesmo índice de colocalização da NKB nesses neurônios. Essas observações realizadas em animais no início da puberdade estão de acordo com o progressivo aumento da expressão de NKB até a maturação puberal

(GILL et al., 2012; GRACHEV et al., 2012; LI et al., 2014; NAVARRO et al., 2012) e o papel da DYN em restringir a maturação puberal (NAKAHARA et al., 2013). Sugerindo que a maior colocalização da NKB em relação à DYN em neurônios Kiss1-hrGFP, independente da dieta, em fêmeas no início da puberdade, pode estar envolvido com a progressão da maturação sexual.

Por fim, ao avaliar o efeito da HFD sobre a responsividade dos neurônios kisspeptidérgicos à leptina após a maturação sexual, verificamos que a dieta hiperlipídica promoveu uma redução da expressão da p-STAT3 em resposta ao estímulo com leptina no ARC. Estudos demonstraram que a administração da HFD pode induzir mudanças sobre a resposta central e periférica à leptina ao longo do tempo (LIN et al., 2000; MÜNZBERG; FLIER; BJØRBÆK, 2004). Em camundongos, Lin et al.(2000) descreveram que inicialmente o tratamento com HFD (1 semana) não afetou a resposta à leptina exógena, seguido de um período (após 8 semanas) em que houve aumento da produção de leptina e redução da ingestão alimentar associado com insensibilidade periférica à leptina. Por um tempo mais prolongado (19 semanas) a HFD aumentou a ingestão alimentar e reduziu a sensibilidade central à leptina.

Nossos resultados corroboram o estudo de Lin et al. (2000), em que o tratamento com HFD por 8 semanas promoveu aumento da leptina circulante, controlando o excesso do aumento da adiposidade corporal por induzir hipofagia. Apesar disso, o aumento da adiposidade corporal continuou a ocorrer com aparente ganho na eficiência energética que se contrapõe ao sistema de regulação do peso corporal. Os estudos de Lin et al. (2000) verificaram resistência periférica, mas não central à leptina. Resultados semelhantes foram demonstrados por Munzberg et al.(2004), no qual a HFD por 4 semanas induziu uma redução da expressão da p-STAT3 em resposta ao estímulo com leptina especificamente no ARC de camundongos machos, associado com um aumento da expressão da SOCS3, que contrarregula a sinalização da leptina na célula.

Os altos níveis circulantes de leptina em animais tratados com HFD por 6 semanas, observado em nosso trabalho e por outros estudos (LEVIN e DUNN-MEYNELL, 2002; MÜNZBERG et al., 2004) indicam que existe uma dessensibilização do receptor hipotalâmico de leptina. Foi sugerido também que a redução da ação central da leptina pode ser resultado

de alterações no seu transporte através da barreira hematoencefálica e alterações na sinalização do receptor da leptina (EL-HASCHIMI et al., 2000; MÜNZBERG; MYERS, 2005). Tendo em vista a resistência à leptina, alguns trabalhos mostram que o excesso de leptina também afeta a expressão de kisspeptina (AHN et al., 2012; QUENNELL et al., 2011). Ahn et al. (2012) demonstraram que o excesso de leptina pode suprimir o eixo reprodutivo em camundongos púberes pela inibição da expressão de kisspeptina.

Modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica em camundongos-fêmeas da linhagem DBA/2J apresentaram diminuição da expressão de RNAm para Kiss1 no ARC e na região periventricular rostral do terceiro ventrículo (RP3V), ao passo que em camundongos-fêmeas da linhagem C57BL/6J os níveis de RNAm para Kiss1 não foram alterados nessas mesmas estruturas. Camundongas DBA/2J são mais sensíveis à indução de hipogonadismo hipotalâmico induzido pela dieta hiperlipídica que os da linhagem C57BL/6J, sendo que os primeiros apresentaram uma resistência central à sinalização pela leptina no ARC e um comprometimento na liberação de GnRH e na indução do pico pré-ovulatório de LH. Além disso, apresentaram diminuição não só da expressão de RNAm para kisspeptina, como também do número de células Kiss1 (QUENNELL et al., 2011).

Por outro lado, corroborando nossos resultados, em que não houve alteração do sistema kisspeptidérgico em fêmeas HFD com 63 dias, Luque *et al.* (2007) e Quennell et al., (2011) mostraram que em camundongos C57BL/6J machos e fêmeas, respectivamente, a dieta hiperlipídica promoveu significativo ganho de peso e aumento da leptina plasmática, mas não houve alterações nos níveis hipotalâmicos de RNAm para kisspeptina. Quennell et al., (2011) propõe que fêmeas da linhagem C57BL/6J são menos susceptíveis à infertilidade induzida pela dieta, o que corrobora nossos resultados obtidos com fêmeas da linhagem Kiss1-hrGFP, que apresentam em seu background genético a linhagem C57BL/6J. Contudo, para melhor conhecimento do efeito da dieta hiperlipídica sobre a regulação do eixo gonadal estudos adicionais são necessários, utilizando modelos com diferentes linhagens, duração e período de exposição à mesma.

Assim, as fêmeas com 63 dias tratadas por 6 semanas com HFD apresentaram um aumento de 9,52% do peso corporal relacionado ao aumento da ingestão calórica de lipídeos, o que resultou em aumento significativo dos níveis de leptina circulante. O aumento da leptina

circulante está associado com a indução da resistência a leptina observada no ARC, revelado pela diminuição da ativação da p-STAT3 após o estímulo com leptina. Apesar disso, não houve alteração da responsividade dos neurônios Kiss1-hrGFP à leptina no ARC e nem alteração no número de neurônios Kiss1-hrGFP no ARC e no AVPV. A integridade do sistema kisspeptidérgico e da sua resposta à leptina podem estar associados à manutenção do ciclo estral regular nessas fêmeas até os 63 dias de vida.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que:

- A dieta hiperlipídica após o desmame antecipa a puberdade em fêmeas Kiss1-hrGFP. Este efeito esteve associado com o aumento dos níveis plasmáticos de leptina e aumento da ativação de STAT3 no ARC, em resposta ao estímulo com leptina. Além disso, houve um discreto aumento da responsividade dos neurônios Kiss1-hrGFP à leptina nesse modelo, cuja relevância fisiológica necessita mais investigações.
- A puberdade precoce induzida pela HFD pode estar associada com o aumento da ação central da leptina, que ao estimular o sistema kisspeptidérgico, direta ou indiretamente via neurônios CART, pode aumentar o tônus excitatório sobre o eixo reprodutivo.
- A dieta hiperlipídica após o desmame não afetou a coexpressão de neuroquinina B e de dinorfina em neurônios kisspeptidérgicos de camundongos fêmeas Kiss1-hrGFP com 32 dias.
- A administração da dieta hiperlipídica por seis semanas, após o desmame, promoveu aumento dos níveis plasmáticos de leptina associado à redução da ativação da STAT3 em resposta ao estímulo com leptina no ARC. Todavia, não houve alteração da responsividade dos neurônios Kiss1-hrGFP a este hormônio nem alteração do número de neurônios Kiss1-hrGFP no ARC e no AVPV. A integridade do sistema kisspeptidérgico e da sua resposta à leptina pode estar associada à manutenção do ciclo estral regular nas fêmeas que receberam a HFD do desmame até os 63 dias de vida.

7. BIBLIOGRAFIA

AHIMA, R. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 14 Suppl 5, p. 242S–249S, ago. 2006.

AHIMA, R. S.; DUSHAY, J.; FLIER, S. N.; PRABAKARAN, D.; FLIER, J. S. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 3, p. 391–5, 1 fev. 1997.

AHIMA, R. S.; PRABAKARAN, D.; FLIER, J. S. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 5, p. 1020–7, 1 mar. 1998.

AHIMA, R. S.; PRABAKARAN, D.; MANTZOROS, C.; QU, D.; LOWELL, B.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J. S. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. **Nature**, v. 382, n. 6588, p. 250–252, 18 jul. 1996.

AHMED, M. L.; ONG, K. K.; DUNGER, D. B. Childhood obesity and the timing of puberty. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 20, n. 5, p. 237–42, jul. 2009.

AHN, S. Y.; YANG, S. W.; LEE, H. J.; BYUN, J. S.; OM, J. Y.; SHIN, C. H. Excess of leptin inhibits hypothalamic KiSS-1 expression in pubertal mice. **Korean journal of pediatrics**, v. 55, n. 9, p. 337–43, set. 2012.

AKSGLAEDE, L.; SØRENSEN, K.; PETERSEN, J. H.; SKAKKEBAEK, N. E.; JUUL, A. Recent decline in age at breast development: the Copenhagen Puberty Study. **Pediatrics**, v. 123, n. 5, p. e932–9, maio 2009.

APTER, D. Serum steroids and pituitary hormones in female puberty: a partly longitudinal study. **Clinical endocrinology**, v. 12, n. 2, p. 107–20, fev. 1980.

APTER, D. The role of leptin in female adolescence. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 997, p. 64–76, nov. 2003.

APTER, D.; BOLTON, N. J.; HAMMOND, G. L.; VIHKO, R. Serum sex hormone-binding globulin during puberty in girls and in different types of adolescent menstrual cycles. **Acta endocrinologica**, v. 107, n. 3, p. 413–9, nov. 1984.

BALTHASAR, N.; DALGAARD, L. T.; LEE, C. E.; YU, J.; FUNAHASHI, H.; WILLIAMS, T.; FERREIRA, M.; TANG, V.; MCGOVERN, R. A.; KENNY, C. D.; CHRISTIANSEN, L. M.; EDELSTEIN, E.; CHOI, B.; BOSS, O.; ASCHKENASI, C.; ZHANG, C.; MOUNTJOY, K.; KISHI, T.; ELMQUIST, J. K.; LOWELL, B. B. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. **Cell**, v. 123, n. 3, p. 493–505, 4 nov. 2005.

BANKS, A. S.; DAVIS, S. M.; BATES, S. H.; MYERS, M. G. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 19, p. 14563–72, 12 maio 2000.

BANKS, W. A. Is obesity a disease of the blood-brain barrier? Physiological, pathological, and evolutionary considerations. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 10, p. 801–9, jan. 2003.

BANKS, W. A. The many lives of leptin. **Peptides**, v. 25, n. 3, p. 331–338, mar. 2004.

BARASH, I. A.; CHEUNG, C. C.; WEIGLE, D. S.; REN, H.; KABIGTING, E. B.; KUIJPER, J. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 3144–7, jul. 1996.

BASKIN, D. G.; SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J.; WOODS, S. C.; PORTE, D.; BREININGER, J. F.; JONAK, Z.; SCHAEFER, J.; KROUSE, M.; BURGHARDT, C.; CAMPFIELD, L. A.; BURN, P.; KOCHAN, J. P. Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, v. 47, n. 3, p. 353–62, mar. 1999.

BATES, S. H.; KULKARNI, R. N.; SEIFERT, M.; MYERS, M. G. Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. **Cell metabolism**, v. 1, n. 3, p. 169–78, mar. 2005.

BATES, S. H.; MYERS, M. G. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 14, n. 10, p. 447–52, dez. 2003.

BECKER, D. J.; ONGEMBA, L. N.; BRICHARD, V.; HENQUIN, J. C.; BRICHARD, S. M. Diet- and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue. **FEBS letters**, v. 371, n. 3, p. 324–8, 11 set. 1995.

BÉLANGER, C.; LUU-THE, V.; DUPONT, P.; TCHERNOF, A. Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 34, n. 11-12, p. 737–45, jan. .

BENCE, K. K.; DELIBEGOVIC, M.; XUE, B.; GORGUN, C. Z.; HOTAMISLIGIL, G. S.; NEEL, B. G.; KAHN, B. B. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. **Nature medicine**, v. 12, n. 8, p. 917–24, ago. 2006.

BERNSTEIN, L. R.; MACKENZIE, A. C. L.; KRAEMER, D. C.; MORLEY, J. E.; FARR, S.; CHAFFIN, C. L.; MERCHENTHALER, I. Shortened Estrous Cycle Length, Increased FSH Levels, FSH Variance, Oocyte Spindle Aberrations, and Early Declining Fertility in Aging Senescence-Accelerated Mouse Prone-8 (SAMP8) Mice: Concomitant Characteristics of Human Midlife Female Reproductive Aging. **Endocrinology**, v. 155, n. May, p. 2287–2300, 2014.

BIRO, F. M.; WIEN, M. Childhood obesity and adult morbidities. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 5, p. 1499S–1505S, maio 2010.

BJØRBAEK, C.; ELMQUIST, J. K.; FRANTZ, J. D.; SHOELSON, S. E.; FLIER, J. S. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. **Molecular cell**, v. 1, n. 4, p. 619–25, mar. 1998.

BJØRBAEK, C.; KAHN, B. B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. **Recent progress in hormone research**, v. 59, p. 305–31, jan. 2004.

BJØRBAEK, C.; UOTANI, S.; DA SILVA, B.; FLIER, J. S. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32686–95, 19 dez. 1997.

BJORBAK, C.; LAVERY, H. J.; BATES, S. H.; OLSON, R. K.; DAVIS, S. M.; FLIER, J. S.; MYERS, M. G. SOCS3 Mediates Feedback Inhibition of the Leptin Receptor via Tyr985. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40649–40657, 3 out. 2000.

BOURET, S. G. Organizational actions of metabolic hormones. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 34, n. 1, p. 18–26, jan. 2013.

BOWMAN, S. A.; GORTMAKER, S. L.; EBBELING, C. B.; PEREIRA, M. A.; LUDWIG, D. S. Effects of fast-food consumption on energy intake and diet quality among children in a national household survey. **Pediatrics**, v. 113, n. 1 Pt 1, p. 112–8, jan. 2004.

BRAILOIU, G. C.; DUN, S. L.; OHSAWA, M.; YIN, D.; YANG, J.; CHANG, J. K.; BRAILOIU, E.; DUN, N. J. KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. **The Journal of comparative neurology**, v. 481, n. 3, p. 314–29, 17 jan. 2005.

BRILL, D. S.; MOENTER, S. M. Androgen receptor antagonism and an insulin sensitizer block the advancement of vaginal opening by high-fat diet in mice. **Biology of reproduction**, v. 81, n. July, p. 1093–1098, 2009.

BRÜNING, J. C.; GAUTAM, D.; BURKS, D. J.; GILLETTE, J.; SCHUBERT, M.; ORBAN, P. C.; KLEIN, R.; KRONE, W.; MÜLLER-WIELAND, D.; KAHN, C. R. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, n. 5487, p. 2122–5, 22 set. 2000.

BURCELIN, R.; THORENS, B.; GLAUSER, M.; GAILLARD, R. C.; PRALONG, F. P. Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4484–91, 1 out. 2003.

BURKE, M. C.; LETTS, P. A.; KRAJEWSKI, S. J.; RANCE, N. E. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. **The Journal of comparative neurology**, v. 498, n. 5, p. 712–26, 10 out. 2006.

CAGAMPANG, F. R.; MAEDA, K.; YOKOYAMA, A.; OTA, K. Effect of food deprivation on the pulsatile LH release in the cycling and ovariectomized female rat. **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 22, n. 5, p. 269–72, maio 1990.

CASTELLANO, J. M.; BENTSEN, A. H.; SÁNCHEZ-GARRIDO, M. A.; RUIZ-PINO, F.; ROMERO, M.; GARCIA-GALIANO, D.; AGUILAR, E.; PINILLA, L.; DIÉGUEZ, C.; MIKKELSEN, J. D.; TENA-SEMPERE, M. Early metabolic programming of puberty onset: Impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. **Endocrinology**, v. 152, n. September, p. 3396–3408, 2011.

CASTELLANO, J. M.; NAVARRO, V. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; NOGUEIRAS, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; VAZQUEZ, M. J.; VIGO, E.; CASANUEVA, F. F.; AGUILAR, E.; PINILLA, L.; DIEGUEZ, C.; TENA-SEMPERE, M. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3917–25, set. 2005.

CASTELLANO, J. M.; NAVARRO, V. M.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, R.; ROA, J.; VIGO, E.; PINEDA, R.; DIEGUEZ, C.; AGUILAR, E.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Expression of Hypothalamic KiSS-1 System and Rescue of Defective Gonadotropic Responses by Kisspeptin in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2602–2610, 25 ago. 2006.

CASTRO-GONZÁLEZ, D.; FUENTE-MARTÍN, E.; SÁNCHEZ-GARRIDO, M. A.; ARGENTE-ARIZÓN, P.; TENA-SEMPERE, M.; BARRIOS, V.; CHOWEN, J. A.; ARGENTE, J. Increased Prepubertal Body Weight Enhances Leptin Sensitivity in Proopiomelanocortin and Neuropeptide Y Neurons Prior to Puberty Onset in Female Rats. **Endocrinology**, v. 156, n. April, p. en.2014–1759, 2015.

CHEHAB, F. F. Early Onset of Reproductive Function in Normal Female Mice Treated with Leptin. **Science**, v. 275, n. 1997, p. 88–90, 1997.

CHEHAB, F. F.; LIM, M. E.; LU, R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nature genetics**, v. 12, n. 3, p. 318–20, mar. 1996.

CHEN, H.; CHARLAT, O.; TARTAGLIA, L. A.; WOOLF, E. A.; WENG, X.; ELLIS, S. J.; LAKEY, N. D.; CULPEPPER, J.; MOORE, K. J.; BREITBART, R. E.; DUYK, G. M.; TEPPER, R. I.; MORGENSTERN, J. P. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 491–5, 9 fev. 1996.

CHENG, A.; UETANI, N.; SIMONCIC, P. D.; CHAUBEY, V. P.; LEE-LOY, A.; MCGLADE, C. J.; KENNEDY, B. P.; TREMBLAY, M. L. Attenuation of Leptin Action and Regulation of Obesity by Protein Tyrosine Phosphatase 1B. **Developmental Cell**, v. 2, n. 4, p. 497–503, abr. 2002.

CHEUNG, C. C.; THORNTON, J. E.; KUIJPER, J. L.; WEIGLE, D. S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 855–8, fev. 1997.

CHOLANIAN, M.; KRAJEWSKI-HALL, S. J.; LEVINE, R. B.; MCMULLEN, N. T.; RANCE, N. E. Electrophysiology of arcuate neurokinin B neurons in female Tac2-EGFP transgenic mice. **Endocrinology**, v. 155, n. April, p. 2555–2565, 2014.

CLARKSON, J.; HERBISON, A. E. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5817–25, dez. 2006.

COHEN, P. E.; ZHU, L.; NISHIMURA, K.; POLLARD, J. W. Colony-stimulating factor 1 regulation of neuroendocrine pathways that control gonadal function in mice. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1413–22, abr. 2002.

COLEMAN, D. L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. **Diabetologia**, v. 14, n. 3, p. 141–8, mar. 1978.

COLL, A. P.; YEO, G. S. H.; FAROOQI, I. S.; O'RAHILLY, S. SnapShot: the hormonal control of food intake. **Cell**, v. 135, n. 3, p. 572.e1–2, 31 out. 2008.

CONSIDINE, R. V.; SINHA, M. K.; HEIMAN, M. L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T. W.; NYCE, M. R.; OHANNESIAN, J. P.; MARCO, C. C.; MCKEE, L. J.; BAUER, T. L. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **The New England journal of medicine**, v. 334, n. 5, p. 292–5, 1 fev. 1996.

COUCEYRO, P. R.; KOYLU, E. O.; KUCHAR, M. J. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 12, n. 4, p. 229–41, maio 1997.

COUTURIER, C.; JOCKERS, R. Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26604–11, 18 jul. 2003.

COWLEY, M. A.; SMART, J. L.; RUBINSTEIN, M.; CERDÁN, M. G.; DIANO, S.; HORVATH, T. L.; CONE, R. D.; LOW, M. J. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 480–4, 24 maio 2001.

CRAVO, R. M.; FRAZAO, R.; PERELLO, M.; OSBORNE-LAWRENCE, S.; WILLIAMS, K. W.; ZIGMAN, J. M.; VIANNA, C.; ELIAS, C. F. Leptin Signaling in Kiss1 Neurons Arises after Pubertal Development. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

CRAVO, R. M.; MARGATHO, L. O.; OSBORNE-LAWRENCE, S.; DONATO, J.; ATKIN, S.; BOOKOUT, A. L.; ROVINSKY, S.; FRAZÃO, R.; LEE, C. E.; GAUTRON, L.; ZIGMAN, J. M.; ELIAS, C. F. Characterization of Kiss1 neurons using transgenic mouse models. **Neuroscience**, v. 173, p. 37–56, 26 jan. 2011.

CUI, Y.; HUANG, L.; ELEFTERIOU, F.; YANG, G.; SHELTON, J. M.; GILES, J. E.; OZ, O. K.; POURBAHRAMI, T.; LU, C. Y. H.; RICHARDSON, J. A.; KARSENTY, G.; LI, C.

Essential role of STAT3 in body weight and glucose homeostasis. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 1, p. 258–69, jan. 2004.

DARWIN, C. The variation of animals and plants under domestication. **Animals**, v. 1, p. 1–411, 1868.

DAVISON, K. K.; SUSMAN, E. J.; BIRCH, L. L. Percent body fat at age 5 predicts earlier pubertal development among girls at age 9. **Pediatrics**, v. 111, n. 4 Pt 1, p. 815–21, abr. 2003.

DE ROUX, N.; GENIN, E.; CAREL, J.-C.; MATSUDA, F.; CHAUSSAIN, J.-L.; MILGROM, E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 19, p. 10972–6, 16 set. 2003.

DELLOVADE, T. L.; MERCHENTHALER, I. Estrogen regulation of neurokinin B gene expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor alpha. **Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 736–42, fev. 2004.

DEVOS, R.; GUISEZ, Y.; VAN DER HEYDEN, J.; WHITE, D. W.; KALAI, M.; FOUNTOULAKIS, M.; PLAETINCK, G. Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 29, p. 18304–10, 18 jul. 1997.

DONATO, J.; CRAVO, R. M.; FRAZÃO, R.; ELIAS, C. F. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. **Neuroendocrinology**, v. 93, p. 9–18, 2011a.

DONATO, J.; CRAVO, R. M.; FRAZÃO, R.; GAUTRON, L.; SCOTT, M. M.; LACHEY, J.; CASTRO, I. A.; MARGATHO, L. O.; LEE, S.; LEE, C.; RICHARDSON, J. A.; FRIEDMAN, J.; CHUA, S.; COPPARI, R.; ZIGMAN, J. M.; ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 1, p. 355–368, 2011b.

DONATO, J.; SILVA, R. J.; SITA, L. V.; LEE, S.; LEE, C.; LACCHINI, S.; BITTENCOURT, J. C.; FRANCI, C. R.; CANTERAS, N. S.; ELIAS, C. F. The ventral premammillary nucleus links fasting-induced changes in leptin levels and coordinated luteinizing hormone secretion. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 16, p. 5240–50, 22 abr. 2009.

DOUGLASS, J.; MCKINZIE, A. A.; COUCEYRO, P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 15, n. 3 Pt 2, p. 2471–81, mar. 1995.

DUNGER, D. B.; AHMED, M. L.; ONG, K. K. Early and late weight gain and the timing of puberty. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 254–255, p. 140–5, 25 jul. 2006.

DUNN, S. L.; BJÖRNHOLM, M.; BATES, S. H.; CHEN, Z.; SEIFERT, M.; MYERS, M. G. Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 19, n. 4, p. 925–38, 2 abr. 2005.

EBLING, F. J. P. The neuroendocrine timing of puberty. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 129, n. 6, p. 675–83, jun. 2005.

ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, W.; COLLINS, S.; LOY, A. L.; NORMANDIN, D.; CHENG, A.; HIMMS-HAGEN, J.; CHAN, C. C.; RAMACHANDRAN, C.; GRESSER, M. J.; TREMBLAY, M. L.; KENNEDY, B. P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science (New York, N.Y.)**, v. 283, n. 5407, p. 1544–8, 5 mar. 1999.

EL-HASCHIMI, K.; PIERROZ, D. D.; HILEMAN, S. M.; BJØRBÆK, C.; FLIER, J. S. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 12, p. 1827–1832, 2000.

ELIAS, C. F.; ASCHKENASI, C.; LEE, C.; KELLY, J.; AHIMA, R. S.; BJØRBAEK, C.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**, v. 23, n. 4, p. 775–86, ago. 1999.

ELIAS, C. F.; LEE, C. E.; KELLY, J. F.; AHIMA, R. S.; KUHAR, M.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 432, n. 1, p. 1–19, 26 mar. 2001.

ELIAS, C. F.; LEE, C.; KELLY, J.; ASCHKENASI, C.; AHIMA, R. S.; COUCEYRO, P. R.; KUHAR, M. J.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Leptin Activates Hypothalamic CART Neurons Projecting to the Spinal Cord. **Neuron**, v. 21, n. 6, p. 1375–1385, dez. 1998.

ELIAS, C. F.; PUROHIT, D. Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 841–862, 2013.

ELMQUIST, J. K.; BJØRBAEK, C.; AHIMA, R. S.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **The Journal of comparative neurology**, v. 395, n. 4, p. 535–47, 15 jun. 1998.

ENRIORI, P. J.; EVANS, A. E.; SINNAYAH, P.; JOBST, E. E.; TONELLI-LEMOES, L.; BILLES, S. K.; GLAVAS, M. M.; GRAYSON, B. E.; PERELLO, M.; NILLNI, E. A.; GROVE, K. L.; COWLEY, M. A. Diet-Induced Obesity Causes Severe but Reversible Leptin Resistance in Arcuate Melanocortin Neurons. **Cell Metabolism**, v. 5, n. March, p. 181–194, 2007a.

ENRIORI, P. J.; EVANS, A. E.; SINNAYAH, P.; JOBST, E. E.; TONELLI-LEMOES, L.; BILLES, S. K.; GLAVAS, M. M.; GRAYSON, B. E.; PERELLO, M.; NILLNI, E. A.; GROVE, K. L.; COWLEY, M. A. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin

resistance in arcuate melanocortin neurons. **Cell metabolism**, v. 5, n. 3, p. 181–94, mar. 2007b.

EULING, S. Y.; HERMAN-GIDDENS, M. E.; LEE, P. A.; SELEVAN, S. G.; JUUL, A.; SØRENSEN, T. I. A.; DUNKEL, L.; HIMES, J. H.; TEILMANN, G.; SWAN, S. H. Examination of US puberty-timing data from 1940 to 1994 for secular trends: panel findings. **Pediatrics**, v. 121 Suppl, p. S172–91, fev. 2008.

FAROOQI, I. S.; JEBB, S. A.; LANGMACK, G.; LAWRENCE, E.; CHEETHAM, C. H.; PRENTICE, A. M.; HUGHES, I. A.; MCCAMISH, M. A.; O'RAHILLY, S. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 12, p. 879–84, 16 set. 1999.

FAROOQI, I. S.; MATARESE, G.; LORD, G. M.; KEOGH, J. M.; LAWRENCE, E.; AGWU, C.; SANNA, V.; JEBB, S. A.; PERNA, F.; FONTANA, S.; LECHLER, R. I.; DEPAOLI, A. M.; O'RAHILLY, S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **The Journal of clinical investigation**, v. 110, n. 8, p. 1093–103, out. 2002.

FEI, H.; OKANO, H. J.; LI, C.; LEE, G. H.; ZHAO, C.; DARNELL, R.; FRIEDMAN, J. M. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 13, p. 7001–5, 24 jun. 1997.

FRANKS, S. Polycystic ovary syndrome in adolescents. **International journal of obesity (2005)**, v. 32, n. 7, p. 1035–41, jul. 2008.

FRISCH, R. E. Pubertal adipose tissue: is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. **Federation proceedings**, v. 39, n. 7, p. 2395–400, 15 maio 1980.

FRISCH, R. E.; HEGSTED, D. M.; YOSHINAGA, K. Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 10, p. 4172–4176, 1975.

FRISCH, R. E.; HEGSTED, D. M.; YOSHINAGA, K. Carcass components at first estrus of rats on high-fat and low-fat diets: body water, protein, and fat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 1, p. 379–83, jan. 1977.

FRISCH, R. E.; MCARTHUR, J. W. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. **Science (New York, N.Y.)**, v. 185, n. 4155, p. 949–51, 13 set. 1974.

FRISCH, R. E.; REVELLE, R. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. **Science (New York, N.Y.)**, v. 169, p. 397–399, 1970.

FRISCH, R. E.; WYSHAK, G.; VINCENT, L. Delayed menarche and amenorrhea in ballet dancers. **The New England journal of medicine**, v. 303, n. 1, p. 17–9, 3 jul. 1980.

FRÜHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. **The Biochemical journal**, v. 393, n. Pt 1, p. 7–20, 1 jan. 2006.

FULTON, S.; RICHARD, D.; WOODSIDE, B.; SHIZGAL, P. Food restriction and leptin impact brain reward circuitry in lean and obese Zucker rats. **Behavioural brain research**, v. 155, n. 2, p. 319–29, 6 dez. 2004.

FULTON, S.; WOODSIDE, B.; SHIZGAL, P. Modulation of brain reward circuitry by leptin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5450, p. 125–8, 7 jan. 2000.

GAO, Q.; WOLFGANG, M. J.; NESCHEN, S.; MORINO, K.; HORVATH, T. L.; SHULMAN, G. I.; FU, X.-Y. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4661–6, 30 mar. 2004.

GARCÍA-GALIANO, D.; VAN INGEN SCHENAU, D.; LEON, S.; KRAJNC-FRANKEN, M. A. M.; MANFREDI-LOZANO, M.; ROMERO-RUIZ, A.; NAVARRO, V. M.; GAYTAN, F.; VAN NOORT, P. I.; PINILLA, L.; BLOMENRÖHR, M.; TENA-SEMPERE, M. Kisspeptin signaling is indispensable for neurokinin B, but not glutamate, stimulation of gonadotropin secretion in mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 1, p. 316–28, jan. 2012.

GARN, S. M.; HASKELL, J. A. Fat and growth during childhood. **Science (New York, N.Y.)**, v. 130, n. 3390, p. 1711–2, 18 dez. 1959.

GILL, J. C.; NAVARRO, V. M.; KWONG, C.; NOEL, S. D.; MARTIN, C.; XU, S.; CLIFTON, D. K.; CARROLL, R. S.; STEINER, R. A.; KAISER, U. B. Increased neurokinin B (Tac2) expression in the mouse arcuate nucleus is an early marker of pubertal onset with differential sensitivity to sex steroid-negative feedback than Kiss1. **Endocrinology**, v. 153, n. 10, p. 4883–93, out. 2012.

GONZALEZ, L. C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M.; AGUILAR, E. Leptin(116-130) stimulates prolactin and luteinizing hormone secretion in fasted adult male rats. **Neuroendocrinology**, v. 70, n. 3, p. 213–20, set. 1999.

GOODMAN, R. L.; COOLEN, L. M.; ANDERSON, G. M.; HARDY, S. L.; VALENT, M.; CONNORS, J. M.; FITZGERALD, M. E.; LEHMAN, M. N. Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2959–67, jun. 2004.

GOODMAN, R. L.; LEHMAN, M. N.; SMITH, J. T.; COOLEN, L. M.; DE OLIVEIRA, C. V. R.; JAFARZADEHSHIRAZI, M. R.; PEREIRA, A.; IQBAL, J.; CARATY, A.; CIOFI, P.; CLARKE, I. J. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. **Endocrinology**, v. 148, n. 12, p. 5752–60, dez. 2007.

GOTTSCH, M. L.; CUNNINGHAM, M. J.; SMITH, J. T.; POPA, S. M.; ACOHIDO, B. V.; CROWLEY, W. F.; SEMINARA, S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. A role for

kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. **Endocrinology**, v. 145, n. 9, p. 4073–7, set. 2004.

GRACHEV, P.; LI, X. F.; LIN, Y. S.; HU, M. H.; ELSAMANI, L.; PATERSON, S. J.; MILLAR, R. P.; LIGHTMAN, S. L.; O'BYRNE, K. T. GPR54-dependent stimulation of luteinizing hormone secretion by neurokinin B in prepubertal rats. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e44344, jan. 2012.

GUEORGUIEV, M.; GÓTH, M. L.; KORBONITS, M. Leptin and puberty: a review. **Pituitary**, v. 4, n. 1-2, p. 79–86, jan. .

HARDIE, L. J.; RAYNER, D. V.; HOLMES, S.; TRAYHURN, P. Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 223, n. 3, p. 660–5, 25 jun. 1996.

HARVEY, J.; SOLOVYOVA, N.; IRVING, A. Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. **Progress in lipid research**, v. 45, n. 5, p. 369–78, set. 2006.

HE, Q.; KARLBERG, J. Bmi in childhood and its association with height gain, timing of puberty, and final height. **Pediatric research**, v. 49, n. 2, p. 244–51, fev. 2001.

HERMAN-GIDDENS, M. E.; SLORA, E. J.; WASSERMAN, R. C.; BOURDONY, C. J.; BHAPKAR, M. V.; KOCH, G. G.; HASEMEIER, C. M. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. **Pediatrics**, v. 99, n. 4, p. 505–12, abr. 1997.

HOHMANN, J. G.; TEAL, T. H.; CLIFTON, D. K.; DAVIS, J.; HRUBY, V. J.; HAN, G.; STEINER, R. A. Differential role of melanocortins in mediating leptin's central effects on feeding and reproduction. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 278, n. 1, p. R50–9, jan. 2000.

HOONG YIP, S.; BOEHM, U.; HERBISON, A. E.; CAMPBELL, R. E. Conditional viral tract-tracing delineates the projections of the distinct kisspeptin neuron populations to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the mouse. **Endocrinology**, p. en20151131, 9 abr. 2015.

HU, M. .; LI, X. F.; MCCAUSLAND, B.; LI, S. Y.; GRESHAM, R.; KINSEY-JONES, J. S.; GARDINER, J. V.; SAM, A. H.; BLOOM, S. R.; POSTON, L.; LIGHTMAN, S. L.; MURPHY, K. G.; O'BYRNE, K. T. Relative importance of the arcuate and anteroventral periventricular kisspeptin neurons in control of puberty and reproductive function in female rats. **Endocrinology**, n. April, p. en.2014–1655, 2015.

IHLE, J. N.; KERR, I. M. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. **Trends in genetics : TIG**, v. 11, n. 2, p. 69–74, fev. 1995.

IRWIG, M. S.; FRALEY, G. S.; SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V.; POPA, S. M.; CUNNINGHAM, M. J.; GOTTSCH, M. L.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Kisspeptin

activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. **Neuroendocrinology**, v. 80, n. 4, p. 264–72, jan. 2004.

IWASA, T.; MATSUZAKI, T.; MUNKHZAYA, M.; TUNGALAGSUVD, A.; YAMASAKI, M.; KUWAHARA, A.; YASUI, T.; IRAHARA, M. The effects of prenatal undernutrition and postnatal high-fat diet on hypothalamic Kiss1 mRNA and serum leptin levels. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 42, p. 76–79, 2015.

JAHNS, L.; SIEGA-RIZ, A. M.; POPKIN, B. M. The increasing prevalence of snacking among US children from 1977 to 1996. **The Journal of pediatrics**, v. 138, n. 4, p. 493–8, abr. 2001.

JASIK, C. B.; LUSTIG, R. H. Adolescent obesity and puberty: The “perfect storm”. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1135, p. 265–279, 2008.

JIANG, L.; YOU, J.; YU, X.; GONZALEZ, L.; YU, Y.; WANG, Q.; YANG, G.; LI, W.; LI, C.; LIU, Y. Tyrosine-dependent and -independent actions of leptin receptor in control of energy balance and glucose homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 47, p. 18619–24, 25 nov. 2008.

KALLÓ, I.; VIDA, B.; DELI, L.; MOLNÁR, C. S.; HRABOVSKY, E.; CARATY, A.; CIOFI, P.; COEN, C. W.; LIPOSITS, Z. Co-Localisation of Kisspeptin with Galanin or Neurokinin B in Afferents to Mouse GnRH Neurones. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 6, p. 464–476, 2012.

KAPLOWITZ, P. B. Link between body fat and the timing of puberty. **Pediatrics**, v. 121 Suppl , p. S208–S217, 2008.

KASZUBSKA, W.; FALLS, H. D.; SCHAEFER, V. G.; HAASCH, D.; FROST, L.; HESSLER, P.; KROEGER, P. E.; WHITE, D. W.; JIROUSEK, M. R.; TREVILLYAN, J. M. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 195, n. 1-2, p. 109–118, set. 2002.

KAUFFMAN, A. S.; NAVARRO, V. M.; KIM, J.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Sex differences in the regulation of Kiss1/NKB neurons in juvenile mice: implications for the timing of puberty. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 297, n. 5, p. E1212–21, 1 nov. 2009.

KENNEDY, B. Y. G. C.; MITRA, J. BODY WEIGHT AND FOOD INTAKE AS INITIATING FACTORS FOR PUBERTY IN THE RAT From the M . R . C . Department of Experimental Medicine , University of Cambridge In a preceding paper (Kennedy & Mitra , 1963) evidence was presented that the ventromedial nuclei. p. 408–418, 1963.

KINSEY-JONES, J. S.; GRACHEV, P.; LI, X. F.; LIN, Y. S.; MILLIGAN, S. R.; LIGHTMAN, S. L.; O’BYRNE, K. T. The inhibitory effects of neurokinin B on GnRH pulse generator frequency in the female rat. **Endocrinology**, v. 153, n. January, p. 307–315, 2012.

KIRTLEY, D.; MAHER, R. Effect of an isocaloric high fat diet on initiation of puberty in Osborne-Mendel rats. **Biology of reproduction**, v. 21, n. 2, p. 331–8, set. 1979.

KLEIN, K. O.; LARMORE, K. A.; DE LANCEY, E.; BROWN, J. M.; CONSIDINE, R. V.; HASSINK, S. G. Effect of obesity on estradiol level, and its relationship to leptin, bone maturation, and bone mineral density in children. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 83, n. 10, p. 3469–3475, 1998.

KOYLU, E. O.; COUCEYRO, P. R.; LAMBERT, P. D.; LING, N. C.; DESOUZA, E. B.; KUHAR, M. J. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. **Journal of neuroendocrinology**, v. 9, n. 11, p. 823–33, nov. 1997.

KRISCH, B.; LEONHARDT, H. The functional and structural border of the neurohemal region of the median eminence. **Cell and tissue research**, v. 192, n. 2, p. 327–39, 5 set. 1978.

KRISTENSEN, P.; JUDGE, M. E.; THIM, L.; RIBEL, U.; CHRISTJANSEN, K. N.; WULFF, B. S.; CLAUSEN, J. T.; JENSEN, P. B.; MADSEN, O. D.; VRANG, N.; LARSEN, P. J.; HASTRUP, S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, v. 393, n. 6680, p. 72–6, 7 maio 1998.

LAMBERT, P. D.; COUCEYRO, P. R.; MCGIRR, K. M.; DALL VECHIA, S. E.; SMITH, Y.; KUHAR, M. J. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 29, n. 4, p. 293–8, ago. 1998.

LEBRETHON, M. C.; AGANINA, A.; FOURNIER, M.; GÉRARD, A.; PARENT, A. S.; BOURGUIGNON, J. P. Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. **Journal of neuroendocrinology**, v. 19, n. 3, p. 181–8, mar. 2007.

LEBRETHON, M. C.; VANDERSMISSEN, E.; GÉRARD, A.; PARENT, A. S.; BOURGUIGNON, J. P. Cocaine and amphetamine-regulated-transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on the rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator in vitro. **Journal of neuroendocrinology**, v. 12, n. 5, p. 383–5, maio 2000a.

LEBRETHON, M. C.; VANDERSMISSEN, E.; GÉRARD, A.; PARENT, A. S.; JUNIEN, J. L.; BOURGUIGNON, J. P. In vitro stimulation of the prepubertal rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator by leptin and neuropeptide Y through distinct mechanisms. **Endocrinology**, v. 141, n. 4, p. 1464–9, abr. 2000b.

LEE, D. K.; NGUYEN, T.; O'NEILL, G. P.; CHENG, R.; LIU, Y.; HOWARD, A. D.; COULOMBE, N.; TAN, C. P.; TANG-NGUYEN, A. T.; GEORGE, S. R.; O'DOWD, B. F. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. **FEBS letters**, v. 446, n. 1, p. 103–7, 5 mar. 1999.

LEE, G. H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J. M.; CARROLL, K. M.; DARVISHZADEH, J. G.; LEE, J. I.; FRIEDMAN, J. M. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 632–5, 15 fev. 1996a.

LEE, J. H.; MIELE, M. E.; HICKS, D. J.; PHILLIPS, K. K.; TRENT, J. M.; WEISSMAN, B. E.; WELCH, D. R. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 23, p. 1731–7, 4 dez. 1996b.

LEE, J. M.; APPUGLIESE, D.; KACIROTI, N.; CORWYN, R. F.; BRADLEY, R. H.; LUMENG, J. C. Weight status in young girls and the onset of puberty. **Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. e624–30, mar. 2007.

LEHMAN, M. N.; COOLEN, L. M.; GOODMAN, R. L. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 151, n. 8, p. 3479–89, ago. 2010.

LESLIE, R. A.; SANDERS, S. J.; ANDERSON, S. I.; SCHUHLER, S.; HORAN, T. L.; EBLING, F. J. Appositions between cocaine and amphetamine-related transcript- and gonadotropin releasing hormone-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the Siberian hamster. **Neuroscience letters**, v. 314, n. 3, p. 111–4, 16 nov. 2001.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 283, p. R941–R948, 2002.

LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A.; BANKS, W. A. Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 286, n. 1, p. R143–50, jan. 2004.

LI, S. Y.; LI, X. F.; HU, M. H.; SHAO, B.; POSTON, L.; LIGHTMAN, S. L.; O'BYRNE, K. T. Neurokinin B Receptor Antagonism Decreases Luteinising Hormone Pulse Frequency and Amplitude and Delays Puberty Onset in the Female Rat. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, n. 12, p. 521–527, 2014.

LI, X. F.; LIN, Y. S.; KINSEY-JONES, J. S.; O'BYRNE, K. T. High-fat diet increases LH pulse frequency and kisspeptin-neurokinin B expression in puberty-advanced female rats. **Endocrinology**, v. 153, n. September, p. 4422–4431, 2012.

LIN, S.; THOMAS, T. C.; STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 24, p. 639–646, 2000.

LOUIS, G. W.; GREENWALD-YARNELL, M.; PHILLIPS, R.; COOLEN, L. M.; LEHMAN, M. N.; MYERS, M. G. Molecular mapping of the neural pathways linking leptin to the neuroendocrine reproductive axis. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2302–10, jun. 2011.

LUQUE, R. M.; KINEMAN, R. D.; TENA-SEMPERE, M. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4601–11, out. 2007.

LUSTIG, R., H.L. BRADLOW & J. FISHMAN. Estrogen metabolism in disorders of nutrition and dietary composition. In **The Menstrual Cycle and Its Disorders**. K. Pirke, W. Wuttke & U. Schweiger, Eds. Springer-Verlag. Berlin 1989.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R. E.; LEE, G. H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature medicine**, v. 1, n. 11, p. 1155–61, nov. 1995.

MAISONET, M.; CHRISTENSEN, K. Y.; RUBIN, C.; HOLMES, A.; FLANDERS, W. D.; HERON, J.; ONG, K. K.; GOLDING, J.; MCGEEHIN, M. A.; MARCUS, M. Role of prenatal characteristics and early growth on pubertal attainment of British girls. **Pediatrics**, v. 126, n. 3, p. e591–600, set. 2010.

MAQSOOD, A. R.; TRUEMAN, J. A.; WHATMORE, A. J.; WESTWOOD, M.; PRICE, D. A.; HALL, C. M.; CLAYTON, P. E. The relationship between nocturnal urinary leptin and gonadotrophins as children progress towards puberty. **Hormone research**, v. 68, n. 5, p. 225–30, jan. 2007.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609–614, nov. 2002.

MATHENY, M.; SHAPIRO, A.; TÜMER, N.; SCARPACE, P. J. Region-specific diet-induced and leptin-induced cellular leptin resistance includes the ventral tegmental area in rats. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 2-3, p. 480–487, 2011.

MCCARTNEY, C. R.; PRENDERGAST, K. A.; CHHABRA, S.; EAGLESON, C. A.; YOO, R.; CHANG, R. J.; FOSTER, C. M.; MARSHALL, J. C. The association of obesity and hyperandrogenemia during the pubertal transition in girls: obesity as a potential factor in the genesis of postpubertal hyperandrogenism. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 91, n. 5, p. 1714–22, maio 2006.

MCCONAHY, K. L.; SMICKLAS-WRIGHT, H.; MITCHELL, D. C.; PICCIANO, M. F. Portion size of common foods predicts energy intake among preschool-aged children. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 6, p. 975–9, jun. 2004.

MEIJS ROELOFS, H. M. A.; KRAMER, P.; SANDER, H. J. Changes in serum concentration of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty. **Journal of Endocrinology**, v. 98, n. 2, p. 241–249, 1 ago. 1983.

MESSAGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; MA, D.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; THRESHER, R. R.; MALINGE, I.; LOMET, D.; CARLTON, M. B. L.; COLLEDGE, W. H.; CARATY, A.; APARICIO, S. A. J. R. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing

hormone release via G protein-coupled receptor 54. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1761–6, 1 fev. 2005.

MONTAGUE, C. T.; FAROOQI, I. S.; WHITEHEAD, J. P.; SOOS, M. A.; RAU, H.; WAREHAM, N. J.; SEWTER, C. P.; DIGBY, J. E.; MOHAMMED, S. N.; HURST, J. A.; CHEETHAM[**NUM**], C. H.; EARLEY[**NUM**], A. R.; BARNETT, A. H.; PRINS, J. B.; O'RAHILLY, S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. v. 387, n. 6636, p. 903–908, 26 jun. 1997.

MONTE, O.; LONGUI, C. A.; CALLIARI, L. E. P. Puberdade precoce: dilemas no diagnóstico e tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 4, p. 321–330, ago. 2001.

MORI, H.; HANADA, R.; HANADA, T.; AKI, D.; MASHIMA, R.; NISHINAKAMURA, H.; TORISU, T.; CHIEN, K. R.; YASUKAWA, H.; YOSHIMURA, A. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. **Nature medicine**, v. 10, n. 7, p. 739–43, jul. 2004.

MORRIS, D. L.; RUI, L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 297, n. 6, p. E1247–59, dez. 2009.

MOSTARI, P.; IEDA, N.; DEURA, C.; MINABE, S.; YAMADA, S.; UENOYAMA, Y.; MAEDA, K.; TSUKAMURA, H. dynorphin-kappa opioid receptor signaling partly mediates estrogen negative feedback effect on LH pulses in female rats. **The Journal of reproduction and development**, v. 59, n. 3, p. 266–72, jan. 2013.

MOULT, P. R.; MILOJKOVIC, B.; HARVEY, J. Leptin reverses long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses. **Journal of neurochemistry**, v. 108, n. 3, p. 685–96, fev. 2009.

MOUNZIH, K.; LU, R.; CHEHAB, F. F. Leptin Treatment Rescues the Sterility of Genetically Obese ob/ob Males 1. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 1190–1193, mar. 1997.

MUIR, A. I.; CHAMBERLAIN, L.; ELSHOURBAGY, N. A.; MICHALOVICH, D.; MOORE, D. J.; CALAMARI, A.; SZEKERES, P. G.; SARAU, H. M.; CHAMBERS, J. K.; MURDOCK, P.; STEPLEWSKI, K.; SHABON, U.; MILLER, J. E.; MIDDLETON, S. E.; DARKER, J. G.; LARMINIE, C. G.; WILSON, S.; BERGSMA, D. J.; EMSON, P.; FAULL, R.; PHILPOTT, K. L.; HARRISON, D. C. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 31, p. 28969–75, 3 ago. 2001.

MÜNZBERG, H.; FLIER, J. S.; BJØRBÆK, C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 11, p. 4880–4889, 2004.

MÜNZBERG, H.; HUO, L.; NILLNI, E. A.; HOLLENBERG, A. N.; BJØRBAEK, C. Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. **Endocrinology**, v. 144, n. 5, p. 2121–31, maio 2003.

MÜNZBERG, H.; MYERS, M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 566–70, maio 2005.

NAGATANI, S.; GUTHIKONDA, P.; THOMPSON, R. C.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K. I.; FOSTER, D. L. Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. **Neuroendocrinology**, v. 67, n. 6, p. 370–6, jun. 1998.

NAKAHARA, T.; UENOYAMA, Y.; IWASE, A.; OISHI, S.; NAKAMURA, S.; MINABE, S.; WATANABE, Y.; DEURA, C.; NOGUCHI, T. Chronic Peripheral Administration of Kappa-Opioid Receptor Antagonist Advances Puberty Onset Associated with Acceleration of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion in Female Rats. v. 59, n. 5, 2013.

NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R.; TOVAR, S.; ROA, J.; MAYEN, A.; NOGUEIRAS, R.; VAZQUEZ, M. J.; BARREIRO, M. L.; MAGNI, P.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Characterization of the Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p. 156–163, jan. 2005.

NAVARRO, V. M.; CASTELLANO, J. M.; MCCONKEY, S. M.; PINEDA, R.; RUIZ-PINO, F.; PINILLA, L.; CLIFTON, D. K.; TENA-SEMPERE, M.; STEINER, R. A. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 300, n. November 2010, p. E202–E210, 2011a.

NAVARRO, V. M.; GOTTSCH, M. L.; CHAVKIN, C.; OKAMURA, H.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 38, p. 11859–66, 23 set. 2009.

NAVARRO, V. M.; GOTTSCH, M. L.; WU, M.; GARCÍA-GALIANO, D.; HOBBS, S. J.; BOSCH, M. A.; PINILLA, L.; CLIFTON, D. K.; DEARTH, A.; RONNEKLEIV, O. K.; BRAUN, R. E.; PALMITER, R. D.; TENA-SEMPERE, M.; ALREJA, M.; STEINER, R. A. Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. **Endocrinology**, v. 152, n. November, p. 4265–4275, 2011b.

NAVARRO, V. M.; RUIZ-PINO, F.; SANCHEZ-GARRIDO, M. A.; GARCIA-GALIANO, D.; HOBBS, S. J.; MANFREDI-LOZANO, M.; LEON, S.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; CASTELLANO, J. M.; CLIFTON, D. K.; PINILLA, L.; STEINER, R. A.; TENA-SEMPERE, M. Role of Neurokinin B in the Control of Female Puberty and Its Modulation by Metabolic Status. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 7, p. 2388–2397, 2012.

NELSON, J. F.; KARELUS, K.; FELICIO, L. S.; JOHNSON, T. E. Genetic influences on the timing of puberty in mice. **Biology of reproduction**, v. 42, p. 649–655, 1990.

NORJAVAARA, E.; ANKARBERG, C.; ALBERTSSON-WIKLAND, K. Diurnal rhythm of 17 beta-estradiol secretion throughout pubertal development in healthy girls: evaluation by a

sensitive radioimmunoassay. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 81, n. 11, p. 4095–102, nov. 1996.

O'MALLEY, D.; MACDONALD, N.; MIZIELINSKA, S.; CONNOLLY, C. N.; IRVING, A. J.; HARVEY, J. Leptin promotes rapid dynamic changes in hippocampal dendritic morphology. **Molecular and cellular neurosciences**, v. 35, n. 4, p. 559–72, ago. 2007.

OERTER, K. E.; URIARTE, M. M.; ROSE, S. R.; BARNES, K. M.; CUTLER, G. B. Gonadotropin secretory dynamics during puberty in normal girls and boys. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 71, n. 5, p. 1251–8, nov. 1990.

OJEDA, S. R.; DUBAY, C.; LOMNICZI, A.; KAIDAR, G.; MATAGNE, V.; SANDAU, U. S.; DISSEN, G. A. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 324, n. 1-2, p. 3–11, 5 ago. 2010.

OJEDA SR, SKINNER MK. Puberty in the rat. In: Neill JD, editor. **The Physiology of Reproduction**. 3. Academic Press/Elsevier; San Diego: 2006. pp. 2061–2126.

ORGANIZATION, W. H. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **World Health Organization technical report series**, v. 916, p. i–viii– 1–149– backcover, 2003.

OSWAL, A.; YEO, G. Leptin and the Control of Body Weight: A Review of Its Diverse Central Targets, Signaling Mechanisms, and Role in the Pathogenesis of Obesity. **Obesity**, v. 18, n. 2, p. 221–229, 30 jul. 2009.

PAREKH, P. I.; PETRO, A. E.; TILLER, J. M.; FEINGLOS, M. N.; SURWIT, R. S. Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. **Metabolism**, v. 47, n. 9, p. 1089–1096, set. 1998.

PARENT, A. S.; LEBRETHON, M. C.; GÉRARD, A.; VANDERSMISSEN, E.; BOURGUIGNON, J. P. Leptin effects on pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from the adult rat hypothalamus and interaction with cocaine and amphetamine regulated transcript peptide and neuropeptide Y. **Regulatory peptides**, v. 92, n. 1-3, p. 17–24, 25 ago. 2000.

PARFITT, D. B.; CHURCH, K. R.; CAMERON, J. L. Restoration of pulsatile luteinizing hormone secretion after fasting in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): dependence on size of the refeed meal. **Endocrinology**, v. 129, n. 2, p. 749–56, ago. 1991.

PATTERSON, M.; MURPHY, K. G.; THOMPSON, E. L.; PATEL, S.; GHATEI, M. A.; BLOOM, S. R. Administration of Kisspeptin-54 into Discrete Regions of the Hypothalamus Potently Increases Plasma Luteinising Hormone and Testosterone in Male Adult Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 5, p. 349–354, maio 2006.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. [s.l.: s.n.]. v. 2nd

PERUZZO, B.; PASTOR, F. E.; BLÁZQUEZ, J. L.; SCHÖBITZ, K.; PELÁEZ, B.; AMAT, P.; RODRÍGUEZ, E. M. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. **Experimental brain research**, v. 132, n. 1, p. 10–26, maio 2000.

PIELECKA-FORTUNA, J.; CHU, Z.; MOENTER, S. M. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1979–86, abr. 2008.

PINTO, S. Rapid Rewiring of Arcuate Nucleus Feeding Circuits by Leptin. **Science**, v. 304, n. 5667, p. 110–115, 2 abr. 2004.

PLANT, T. M.; BARKER-GIBB, M. L. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. **Human reproduction update**, v. 10, n. 1, p. 67–77, jan. .

QIU, J.; FANG, Y.; BOSCH, M. A.; RØNNEKLEIV, O. K.; KELLY, M. J. Guinea pig kisspeptin neurons are depolarized by leptin via activation of TRPC channels. **Endocrinology**, v. 152, n. April, p. 1503–1514, 2011a.

QIU, J.; FANG, Y.; BOSCH, M. A.; RØNNEKLEIV, O. K.; KELLY, M. J. Guinea pig kisspeptin neurons are depolarized by leptin via activation of TRPC channels. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1503–14, abr. 2011b.

QIU, X.; DOWLING, A. R.; MARINO, J. S.; FAULKNER, L. D.; BRYANT, B.; BRÜNING, J. C.; ELIAS, C. F.; HILL, J. W. Delayed puberty but normal fertility in mice with selective deletion of insulin receptors from kiss1 cells. **Endocrinology**, v. 154, n. 3, p. 1337–1348, 2013.

QUENNEL, J. H.; HOWELL, C. S.; ROA, J.; AUGUSTINE, R. A.; GRATTAN, D. R.; ANDERSON, G. M. Leptin deficiency and diet-induced obesity reduce hypothalamic kisspeptin expression in mice. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1541–50, abr. 2011.

RANCE, N. E.; BRUCE, T. R. Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 4, p. 337–45, out. 1994.

RODRIGUEZ, I.; ARAKI, K.; KHATIB, K.; MARTINOU, J. C.; VASSALLI, P. Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. **Developmental biology**, v. 184, n. 1, p. 115–21, 1 abr. 1997.

ROHNER-JEANRENAUD, F.; CRAFT, L. S.; BRIDWELL, J.; SUTER, T. M.; TINSLEY, F. C.; SMILEY, D. L.; BURKHART, D. R.; STATNICK, M. A.; HEIMAN, M. L.; RAVUSSIN, E.; CARO, J. F. Chronic central infusion of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART 55-102): effects on body weight homeostasis in lean and high-fat-fed obese rats. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 26, n. 2, p. 143–9, fev. 2002.

RONDINI, T. A.; BADDINI, S. P.; SOUSA, L. F.; BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript neurons project to areas

expressing gonadotropin releasing hormone immunoreactivity and to the anteroventral periventricular nucleus in male and female rats. **Neuroscience**, v. 125, n. 3, p. 735–748, 2004.

ROSENFELD, R. L.; LIPTON, R. B.; DRUM, M. L. Thelarche, pubarche, and menarche attainment in children with normal and elevated body mass index. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 84–8, 1 jan. 2009.

S, A. R.; J, D.; N, F. S.; D, P.; JS, F. Leptin accelerate the onset of puberty in normal female mice. **Endocrinol Metabol**, v. 99, p. 391–5, 1997.

SALIAN-MEHTA, S.; XU, M.; PIERCE, A.; BLIESNER, B.; TOBET, S.; WIERMAN, M. E. Loss of Growth arrest specific gene 6 (Gas6) results in altered GnRH neuron migration, delayed vaginal opening and sexual maturation in mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 393, n. 1-2, p. 164–170, ago. 2014.

SÁNCHEZ-GARRIDO, M. A.; CASTELLANO, J. M.; RUIZ-PINO, F.; GARCIA-GALIANO, D.; MANFREDI-LOZANO, M.; LEON, S.; ROMERO-RUIZ, A.; DIÉGUEZ, C.; PINILLA, L.; TENA-SEMPERE, M. Metabolic programming of puberty: Sexually dimorphic responses to early nutritional challenges. **Endocrinology**, v. 154, n. September, p. 3387–3400, 2013.

SANDOVAL-GUZMÁN, T.; RANCE, N. E. Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. **Brain research**, v. 1026, n. 2, p. 307–12, 12 nov. 2004.

SANTORO, N.; LASLEY, B.; MCCONNELL, D.; ALLSWORTH, J.; CRAWFORD, S.; GOLD, E. B.; FINKELSTEIN, J. S.; GREENDALE, G. A.; KELSEY, J.; KORENMAN, S.; LUBORSKY, J. L.; MATTHEWS, K.; MIDGLEY, R.; POWELL, L.; SABATINE, J.; SCHOCKEN, M.; SOWERS, M. F.; WEISS, G. Body size and ethnicity are associated with menstrual cycle alterations in women in the early menopausal transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2622–31, jun. 2004.

SASAKI, A.; YASUKAWA, H.; SHOUDA, T.; KITAMURA, T.; DIKIC, I.; YOSHIMURA, A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29338–47, 22 set. 2000.

SASAKI, A.; YASUKAWA, H.; SUZUKI, A.; KAMIZONO, S.; SYODA, T.; KINJYO, I.; SASAKI, M.; JOHNSTON, J. A.; YOSHIMURA, A. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 4, n. 6, p. 339–51, jun. 1999.

SAWAI, N.; IJIMA, N.; TAKUMI, K.; MATSUMOTO, K.; OZAWA, H. Immunofluorescent histochemical and ultrastructural studies on the innervation of kisspeptin/neurokinin B neurons to tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus of rats. **Neuroscience research**, v. 74, n. 1, p. 10–6, set. 2012.

SCHNEIDER, J. E. Energy balance and reproduction. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p. 289–317, abr. 2004.

SCHULZ, R.; WILHELM, A.; PIRKE, K. M.; GRAMSCH, C.; HERZ, A. Beta-endorphin and dynorphin control serum luteinizing hormone level in immature female rats. **Nature**, v. 294, n. 5843, p. 757–9, 24 dez. 1981.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–71, 6 abr. 2000.

SEMINARA, S. B.; MESSENGER, S.; CHATZIDAKI, E. E.; THRESHER, R. R.; ACIERNO, J. S.; SHAGOURY, J. K.; BO-ABBAS, Y.; KUOHUNG, W.; SCHWINOF, K. M.; HENDRICK, A. G.; ZAHN, D.; DIXON, J.; KAISER, U. B.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F.; O'RAHILLY, S.; CARLTON, M. B. L.; CROWLEY, W. F.; APARICIO, S. A. J. R.; COLLEDGE, W. H. The GPR54 gene as a regulator of puberty. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 17, p. 1614–27, 23 out. 2003.

SHAHAB, M.; MASTRONARDI, C.; SEMINARA, S. B.; CROWLEY, W. F.; OJEDA, S. R.; PLANT, T. M. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 6, p. 2129–34, 8 fev. 2005.

SMITH, J. T.; ACOHIDO, B. V.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. **Journal of neuroendocrinology**, v. 18, n. 4, p. 298–303, abr. 2006.

SMITH, J. T.; CLARKE, I. J. Kisspeptin expression in the brain: catalyst for the initiation of puberty. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 8, n. 1, p. 1–9, mar. 2007.

SMITH, J. T.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 131, n. 4, p. 623–30, 1 abr. 2006.

SMITH, J. T.; CUNNINGHAM, M. J.; RISSMAN, E. F.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3686–92, set. 2005a.

SMITH, J. T.; DUNGAN, H. M.; STOLL, E. A.; GOTTSCH, M. L.; BRAUN, R. E.; EACKER, S. M.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Differential Regulation of KiSS-1 mRNA Expression by Sex Steroids in the Brain of the Male Mouse. **Endocrinology**, v. 146, n. 7, p. 2976–2984, 1 jul. 2005b.

SØRENSEN, K.; MOURITSEN, A.; AKSGLAEDE, L.; HAGEN, C. P.; MOGENSEN, S. S.; JUUL, A. Recent secular trends in pubertal timing: Implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 77, p. 137–145, 2012.

SPIEGELMAN, B. M.; FLIER, J. S.; ISRAEL, B.; MEDICAL, D. Obesity and the Regulation of Energy Balance. v. 104, p. 531–543, 2001.

STERNSON, S. M.; SHEPHERD, G. M. G.; FRIEDMAN, J. M. Topographic mapping of VMH → arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 1356–1363, 18 set. 2005.

STORLIEN, L. H.; JAMES, D. E.; BURLEIGH, K. M.; CHISHOLM, D. J.; KRAEGEN, E. W. Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. **The American journal of physiology**, v. 251, n. 2, p. E576–E583, 1986.

TANAKA, T. G.; SIQUEIRA, D. F.; ANGELIERI, F.; SCANAVINI, M. A. Puberdade precoce e tardia: aspectos importantes no contexto da clínica ortodôntica. **Ortodontia**, v. 41, n. n.esp, p. 275–281, [s.d.].

TANIGUCHI, T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5208, p. 251–5, 14 abr. 1995.

TARTAGLIA, L. A. The Leptin Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 10, p. 6093–6096, 7 mar. 1997.

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS, G. G.; WOOL, E. A.; MONROE, C. A.; TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1263–71, 29 dez. 1995.

TENA-SEMPERE, M. Brain crosstalk in puberty and adolescence. p. 121–135, 2013.

TERASAWA, E.; KURIAN, J. R.; GUERRIERO, K. A.; KENEALY, B. P.; HUTZ, E. D.; KEEN, K. L. Recent Discoveries on the Control of GnRH Neurons in Nonhuman Primates. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 7, p. no–no, maio 2010.

TOPALOGLU, A. K.; REIMANN, F.; GUCLU, M.; YALIN, A. S.; KOTAN, L. D.; PORTER, K. M.; SERIN, A.; MUNGAN, N. O.; COOK, J. R.; OZBEK, M. N.; IMAMOGLU, S.; AKALIN, N. S.; YUKSEL, B.; O'RAHILLY, S.; SEMPLER, R. K. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. **Nature genetics**, v. 41, n. 3, p. 354–8, mar. 2009.

TORTORIELLO, D. V.; MCMINN, J.; CHUA, S. C. Dietary-Induced Obesity and Hypothalamic Infertility in Female DBA/2J Mice. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1238–1247, mar. 2004.

TRAYHURN, P.; BING, C. Appetite and energy balance signals from adipocytes. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1471, p. 1237–49, 29 jul. 2006.

TROIANO, R. P.; FLEGAL, K. M. Overweight Children and Adolescents: Description, Epidemiology, and Demographics. **Pediatrics**, v. 101, n. Supplement_2, p. 497–504, 1 mar. 1998.

TRUE, C.; KIRIGITI, M. A.; KIEVIT, P.; GROVE, K. L.; SMITH, M. S. Leptin is not the critical signal for kisspeptin or luteinising hormone restoration during exit from negative energy balance. **Journal of neuroendocrinology**, v. 23, n. 11, p. 1099–112, nov. 2011.

TRUE, C.; NASRIN ALAM, S.; COX, K.; CHAN, Y.-M.; SEMINARA, S. Neurokinin B is critical for normal timing of sexual maturation but dispensable for adult reproductive function in female mice. **Endocrinology**, n. February, p. en.2014–1862, 2015.

TRUE, C.; VERMA, S.; GROVE, K. L.; SMITH, M. S. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is a potent stimulator of gnRH and kisspeptin cells and may contribute to negative energy balance-induced reproductive inhibition in females. **Endocrinology**, v. 154, n. C, p. 2821–2832, 2013.

TUNG, Y.-C. L.; MA, M.; PIPER, S.; COLL, A.; O'RAHILLY, S.; YEO, G. S. H. Novel leptin-regulated genes revealed by transcriptional profiling of the hypothalamic paraventricular nucleus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 47, p. 12419–26, 19 nov. 2008.

UDAGAWA, J.; HASHIMOTO, R.; SUZUKI, H.; HATTA, T.; SOTOMARU, Y.; HIOKI, K.; KAGOHASHI, Y.; NOMURA, T.; MINAMI, Y.; OTANI, H. The role of leptin in the development of the cerebral cortex in mouse embryos. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 647–58, fev. 2006.

URBANSKI, H. F.; OJEDA, S. R. The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. **Endocrinology**, v. 117, n. 2, p. 644–9, ago. 1985.

VAN DE WALL, E.; LESHAN, R.; XU, A. W.; BALTHASAR, N.; COPPARI, R.; LIU, S. M.; JO, Y. H.; MACKENZIE, R. G.; ALLISON, D. B.; DUN, N. J.; ELMQUIST, J.; LOWELL, B. B.; BARSH, G. S.; DE LUCA, C.; MYERS, M. G.; SCHWARTZ, G. J.; CHUA, S. C. Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1773–85, abr. 2008.

VAN HECK, M.; COMPTON, D. S.; FRANCE, C. F.; TEDESCO, R. P.; FAWZI, A. B.; GRAZIANO, M. P.; SYBERTZ, E. J.; STRADER, C. D.; DAVIS, H. R. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, p. 385–390, 1997.

VRANG, N. Anatomy of hypothalamic CART neurons. **Peptides**, v. 27, n. 8, p. 1970–80, ago. 2006.

VUCETIC, Z.; KIMMEL, J.; REYES, T. M. Chronic high-fat diet drives postnatal epigenetic regulation of μ -opioid receptor in the brain. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 6, p. 1199–206, 16 maio 2011.

WAHAB, F.; ULLAH, F.; CHAN, Y.-M.; SEMINARA, S. B.; SHAHAB, M. Decrease in hypothalamic Kiss1 and Kiss1r expression: a potential mechanism for fasting-induced

suppression of the HPG axis in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme**, v. 43, n. 2, p. 81–5, fev. 2011.

WAKABAYASHI, Y.; NAKADA, T.; MURATA, K.; OHKURA, S.; MOGI, K.; NAVARRO, V. M.; CLIFTON, D. K.; MORI, Y.; TSUKAMURA, H.; MAEDA, K.-I.; STEINER, R. A.; OKAMURA, H. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 8, p. 3124–3132, 2010.

WANG, J.; OBICI, S.; MORGAN, K.; BARZILAI, N.; FENG, Z.; ROSSETTI, L. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. **Diabetes**, v. 50, n. 12, p. 2786–91, dez. 2001.

WANG, Y.; LOBSTEIN, T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity. **International journal of pediatric obesity : IJPO : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 1, n. 1, p. 11–25, jan. 2006.

WANG, Z. W.; ZHOU, Y. T.; KAKUMA, T.; LEE, Y.; HIGA, M.; KALRA, S. P.; DUBE, M. G.; KALRA, P. S.; UNGER, R. H. Comparing the hypothalamic and extrahypothalamic actions of endogenous hyperleptinemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 18, p. 10373–8, 31 ago. 1999.

WARREN, M. P. The effects of exercise on pubertal progression and reproductive function in girls. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 51, n. 5, p. 1150–7, nov. 1980.

WATANOBE, H.; SUDA, T.; WIKBERG, J. E. S.; SCHIÖTH, H. B. Evidence That Physiological Levels of Circulating Leptin Exert a Stimulatory Effect on Luteinizing Hormone and Prolactin Surges in Rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 1, p. 162–165, 16 set. 1999.

WEIGLE, D. S.; DUELL, P. B.; CONNOR, W. E.; STEINER, R. A.; SOULES, M. R.; KUIJPER, J. L. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 82, n. 2, p. 561–5, fev. 1997.

WHITE, D. W.; KUROPATWINSKI, K. K.; DEVOS, R.; BAUMANN, H.; TARTAGLIA, L. A. Leptin Receptor (OB-R) Signaling: CYTOPLASMIC DOMAIN MUTATIONAL ANALYSIS AND EVIDENCE FOR RECEPTOR HOMO-OLIGOMERIZATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 7, p. 4065–4071, 14 fev. 1997.

WÓJCIK-GLĄDYSZ, A.; WAŃKOWSKA, M.; MISZTAŁ, T.; ROMANOWICZ, K.; POLKOWSKA, J. Effect of intracerebroventricular infusion of leptin on the secretory activity of the GnRH/LH axis in fasted prepubertal lambs. **Animal reproduction science**, v. 114, n. 4, p. 370–83, set. 2009.

WORTLEY, K. E.; CHANG, G. Q.; DAVYDOVA, Z.; FRIED, S. K.; LEIBOWITZ, S. F. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the arcuate nucleus stimulates lipid metabolism to control body fat accrual on a high-fat diet. **Regulatory Peptides**, v. 117, p. 89–99, 2004.

XU, A. W.; STE-MARIE, L.; KAELEN, C. B.; BARSH, G. S. Inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 in proopiomelanocortin (Pomc) neurons causes decreased pomc expression, mild obesity, and defects in compensatory refeeding. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 72–80, jan. 2007.

YAMANAKA, A.; BEUCKMANN, C. T.; WILLIE, J. T.; HARA, J.; TSUJINO, N.; MIEDA, M.; TOMINAGA, M.; YAGAMI, K. ICHI; SUGIYAMA, F.; GOTO, K.; YANAGISAWA, M.; SAKURAI, T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. **Neuron**, v. 38, n. 5, p. 701–13, 5 jun. 2003.

YEO, S.-H.; HERBISON, A. E. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2387–99, jun. 2011.

YU, W. H.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; MCCANN, S. M. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. **Endocrinology**, v. 138, n. 11, p. 5055–8, nov. 1997.

YURA, S.; OGAWA, Y.; SAGAWA, N.; MASUZAKI, H.; ITOH, H.; EBIHARA, K.; AIZAWA-ABE, M.; FUJII, S.; NAKAO, K. Accelerated puberty and late-onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice overexpressing leptin. **The Journal of clinical investigation**, v. 105, n. 6, p. 749–55, mar. 2000.

ZABOLOTNY, J. M.; BENICE-HANULEC, K. K.; STRICKER-KRONGRAD, A.; HAJ, F.; WANG, Y.; MINOKOSHI, Y.; KIM, Y.-B.; ELMQUIST, J. K.; TARTAGLIA, L. A.; KAHN, B. B.; NEEL, B. G. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. **Developmental cell**, v. 2, n. 4, p. 489–95, abr. 2002.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425–32, 1 dez. 1994.

ZINCHUK, V.; GROSSENBACHER-ZINCHUK, O. Recent advances in quantitative colocalization analysis: Focus on neuroscience. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 3, p. 125–172, 2009.